



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 507**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/97** (2006.01)

**A61K 8/64** (2006.01)

**A61K 36/31** (2006.01)

**A61Q 19/02** (2006.01)

**A61Q 5/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05760048 .8**

96 Fecha de presentación : **21.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1776082**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2007**

54

Título: **Uso de un hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas como principio activo despigmentante para la preparación de una composición cosmética y/o farmacéutica.**

30

Prioridad: **21.04.2004 FR 04 04192**

73

Titular/es: **SOCIÉTÉ D'EXTRACTION DES  
PRINCIPES ACTIFS S.A. (VINCIENCE)  
655 route du Pin Montard -Bp 212-  
06904 Sofia Antipolis, FR**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2009**

72

Inventor/es: **Dal Farra, Claude;  
Domloge, Nouha y  
Peyronel, Dominique**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2009**

74

Agente: **Fernández Prieto, Ángel**

ES 2 318 507 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de un hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas como principio activo despigmentante para la preparación de una composición cosmética y/o farmacéutica.

5 La invención se refiere al ámbito de la cosmética y de la farmacéutica, en particular al ámbito de la dermatología. La presente invención tiene por objeto el uso de una cantidad eficaz de un hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas, como agente blanqueador y/o despigmentante de la piel, para la preparación de una composición terapéutica para blanquear y/o despigmentar, así como el uso no terapéutico de dicho hidrolizado para blanquear y/o despigmentar.

15 El color de la piel y del cabello de los mamíferos se debe a la influencia de diferentes factores, factores genéticos, por supuesto, y también medioambientales tales como la exposición al sol por ejemplo. Este color depende esencialmente de la presencia de un pigmento específico, la melanina. En efecto, la melanina desempeña una función fundamental en la determinación del color de la piel. La sintetizan amplias células dendríticas: los melanocitos, células localizadas en la unión dermoepidérmica. La melanina existe en dos diferentes formas: la feomelanina, pigmento de color amarillo, y la eumelanina de color negro. Son las diferentes proporciones y el tamaño de estos pigmentos, sin olvidar los carotenoides y la microcirculación sanguínea, los que dan a la piel su gran diversidad de colores.

20 Ambas clases de melaninas se sintetizan a partir de un mismo aminoácido, la tirosina. Esta síntesis depende de una enzima clave, la tirosinasa, que transforma la tirosina en DOPA y después en DOPAquinona. De dicha DOPAquinona nacen la feomelanina o la eumelanina. En presencia de cisteína, un aminoácido rico en azufre, la DOPAquinona se transformará en CisteinilDOPA, intermedio de la síntesis de feomelanina. Mientras que en ausencia de cisteína, se formará indol 5-6 quinona y se sintetizará eumelanina. Los melanocitos transfieren después la melanina a las células adyacentes, es decir los queratinocitos.

30 La producción de melanina, así como su transporte, se regulan gracias a diferentes factores tales como, por ejemplo, las radiaciones UV, las hormonas o los productos químicos. Así, un aumento de la exposición a las radiaciones UV, provoca la síntesis de pigmentos y en consecuencia un oscurecimiento de la piel. Pueden aparecer perturbaciones más o menos importantes de esta pigmentación. Éstas se manifiestan, por ejemplo, en pecas, lunares, manchas difusas tales como las manchas del embarazo, el cloasma así como en otros trastornos hiperpigmentarios como el lentigo, por ejemplo. Además, el envejecimiento puede modular la pigmentación cutánea. Así ciertas personas pueden ver aparecer manchas en la piel, más o menos oscuras o coloradas, que se traducen en zonas de coloraciones heterogéneas que forman manchas de senescencia.

35 El uso de un inhibidor o regulador de la síntesis de melanina, así como de cualquier otro producto despigmentante y/o blanqueador, es particularmente interesante pues en cosmetología y/o dermatología. Este uso es interesante para obtener una verdadera despigmentación de la piel, como en el caso del blanqueamiento de la piel muy pigmentada o también de inhibición de zonas cutáneas hiperpigmentadas que provocan un aspecto anti estético de la piel; también es interesante, en determinadas aplicaciones que tienden a aclarar la tez, dar luminosidad a la piel o resplandor a los tejidos superficiales.

45 Hasta hoy se propusieron numerosas moléculas, pero muy pocas se usan verdaderamente porque muchas de ellas presentan problemas de irritación, incluso de toxicidad. Entre dichas moléculas se pueden mencionar derivados del fenol tales como la hidroquinona y el resorcinol que inhiben una serie de reacciones de la conversión de la L-tirosina en melanina por inhibición de la actividad de la tirosinasa (Takano, 1984). También se pueden mencionar el ácido L-ascórbico y sus derivados, el ascorbil acetato de magnesio, el ácido kójico o también el ácido láctico. Para resolver este problema se pusieron a punto nuevos productos y moléculas. Así el documento GB 1349955 describe una composición blanqueadora que contiene hidroquinona, un agente descamante y un corticoesteroide antiinflamatorio. El documento EP98401360 describe el uso de sulfitos o metalsulfitos en una composición cosmética con actividad despigmentante.

55 Así, apareció un cierto número de sustancias introducidas en productos cosméticos o farmacéuticos. Sin embargo, se necesitan más progresos para poder disponer de productos aptos para resolver estos problemas de manera satisfactoria. En particular subsiste la necesidad de una composición despigmentante y/o blanqueadora que, aunque convenientemente tolerada por la piel, sea más eficaz que las composiciones arriba mencionadas.

60 Así, el problema técnico que los inventores tuvieron que resolver fue encontrar una nueva sustancia, aceptable del punto de vista cosmético o farmacéutico, capaz de tener una verdadera actividad blanqueadora y/o despigmentante en la piel, y que no tenga efectos secundarios indeseables, tales como reacciones de toxicidad o irritación cutánea, por ejemplo.

65 Los inventores consiguieron elegir sustancias específicas que presentan propiedades notables al aplicarlas en la piel. En particular descubrieron que un hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas tiene propiedades notables en la piel y, más particularmente, propiedades blanqueadoras. En efecto, este compuesto permite inhibir significativamente la síntesis de melanina de las células de la piel.

Los vegetales de la familia de las crucíferas (latinizada en Cruciferae) se reúnen en una amplia familia que cuenta con unas 3200 especies divididas en 375 géneros en el mundo. Las crucíferas también se llaman Brassicaceae. Estas

plantas se encuentran principalmente en las zonas templadas del hemisferio norte y más particularmente en la cuenca mediterránea. Las crucíferas toman su nombre de la disposición en cruz de sus sépalos y pétalos. Son plantas herbáceas, vivaces, anuales y a menudo bienales. Sus raíces son pivotantes y tuberosas. El follaje es alterno, con estípulas reducidas y caducas, incluso ausentes. La fruta es una silicua, su forma, su longitud o también su espesor sirven para el reconocimiento de las especies. Las semillas se desprenden progresivamente; están desprovistas de albumen, siendo las reservas esencialmente de origen lipídico. Como plantas pertenecientes a esta familia, se pueden mencionar plantas de grandes cultivos, oleaginosas, tal como la colza (*Brassica napus*, var. *Oleifera*); plantas alimenticias como todas las variedades de “col” (del género *Brassica*); condimentos tal como la mostaza (del género *Sinapis*); o también plantas de interés ornamental tales como el alhelí o el canastillo (del género *Alyssum*).

En documentos anteriores ya se propusieron composiciones cosméticas que contienen extractos de Brassicaceae. Así por ejemplo la patente FR 2802417 describe una preparación cosmética y/o farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un extracto de Brassicaceae y un cuerpo graso y/o emulsionantes. Sin embargo, que la solicitante sepa, nunca ha sido descrito en el arte anterior el uso de un hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas, como agente blanqueador y/o despigmentante en cosmética y/o dermatología y/o farmacéutica.

Así, según un primer aspecto, la presente invención tiene por objeto el uso de una cantidad eficaz de un hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas como principio activo blanqueador para la preparación de una composición terapéutica para blanquear y/o despigmentar, así como su uso no terapéutico para blanquear y/o despigmentar. Según un modo de realización de la invención particularmente preferente, el hidrolizado es un hidrolizado de proteínas fermentadas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas.

El término “hidrolizado” representa cualquier sustancia que haya sido sometida a una hidrólisis. La hidrólisis se define como la división de una molécula por una molécula de agua. La hidrólisis puede ser enzimática o química, preferentemente según la invención, la hidrólisis es enzimática. Un hidrolizado de proteínas representa, pues, el producto obtenido tras hidrólisis de las proteínas de las plantas. La hidrólisis de las proteínas, más o menos fuerte, permite obtener un hidrolizado que contiene, sea péptidos con pesos moleculares variables, sea aminoácidos. Las proteínas así hidrolizadas se examinaron por sus propiedades en el ámbito de la cosmética y dermatología.

Preferentemente según la invención, el hidrolizado de proteínas se prepara a partir de proteínas fermentadas, es decir, a partir de proteínas que se sometieron a una etapa de fermentación. Cuando se hable de fermentación, se hace referencia a una transformación de las sustancias orgánicas mediante la acción de microorganismos. Preferentemente según la invención, los microorganismos utilizados son levaduras y más particularmente levaduras del género *Rhizopus*, *Aspergillus* o *Penicillium*.

El hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas tiene que entenderse como un hidrolizado de por lo menos un vegetal perteneciente a la familia de las crucíferas. Claro está que dicho hidrolizado puede prepararse a partir de por lo menos uno cualquiera de los numerosos géneros y especies pertenecientes a la familia de las crucíferas. Según un modo de realización ventajoso de la invención, la planta utilizada para obtener el hidrolizado de proteínas fermentadas, perteneciente a la familia de las crucíferas, es la colza (*Brassica napus*). Preferentemente el hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas se obtiene a partir de la semilla de dichos vegetales. Así, según un método de realización preferente de la invención, el hidrolizado de proteínas se obtiene a partir de las semillas de colza.

Se puede usar cualquier método de extracción o purificación conocido por un experto en la materia para preparar el hidrolizado según la invención. En una primera etapa, por ejemplo, se pueden deslipidizar semillas de crucíferas, tales como semillas de colza, por medio de un simple prensado y/o la acción de un disolvente orgánico clásico (como un alcohol, un hexano o acetona por ejemplo). Después del secado del producto así obtenido, se obtiene un residuo enriquecido con proteínas comúnmente llamado “torta”. Después se realiza ventajosamente una etapa de fermentación a partir de dicha torta.

Según otra técnica se puede contemplar la realización de la extracción de una fracción protéica obtenida a partir de dicha torta, dicha fracción protéica servirá después de sustrato para la fermentación. La etapa de extracción de las proteínas propiamente dichas se realiza en medio acuoso, neutro o básico. Preferentemente, según la invención, la extracción de las proteínas se realizará en medio acuoso, ligeramente básico, y en caliente. Las proteínas se recuperarán por precipitación o concentración.

La etapa de fermentación se realiza preferentemente con levaduras, y preferentemente con levaduras de los géneros *Rhizopus*, *Aspergillus* o *Penicillium*. En el medio de fermentación, el extracto de colza, fuente de materias nitrogenadas, se suplementa con azúcares (glucosos), así como con diversos elementos necesarios para el crecimiento de las levaduras, tales como aminoácidos y sales minerales, por ejemplo. Se puede añadir una pequeña concentración de alcohol o glicerol. El cultivo se efectúa en un fermentador con agitación lenta (10 a 60 revoluciones por minuto), a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C y con un pH que varía de 5 a 7,5, siendo constante el flujo de aire. La duración de esta etapa es muy variable. En efecto, puede variar de doce horas a veinte días. Después, el medio de cultivo se somete a un tratamiento térmico, es decir a una temperatura comprendida entre 80°C y 135°C.

La etapa final de hidrólisis de las proteínas se realiza con proteasas de origen vegetal tal como, por ejemplo, la papaína o bromelaína; o también con enzimas llamadas “industriales” tales como las alcalasas, la Flavourzyme... El

## ES 2 318 507 T3

medio de cultivo así hidrolizado se centrifuga, se filtra hasta la obtención de un hidrolizado de proteínas fermentadas de crucíferas.

Este hidrolizado se disuelve en uno o distintos disolventes. En particular, se pueden mencionar disolventes acuosos. Cuando se hable de disolventes acuosos, se hace referencia a cualquier disolvente constituido total o parcialmente por agua. Se puede mencionar el propio agua, los disolventes hidroalcohólicos en cualquier proporción o también los disolventes constituidos por agua y un compuesto tal como el propilenglicol o el butilenglicol en cualquier proporción.

Los hidrolizados de proteínas fermentadas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas se analizan por su proporción de compuestos de naturaleza protéica. Cuando se hable de compuestos de naturaleza protéica, se hace referencia a los fragmentos de proteínas, los péptidos y los aminoácidos libres presentes en la mezcla. Los péptidos, aminoácidos y fragmentos de proteínas se dosifican según las técnicas clásicas bien conocidas por el especialista. Así, según un modo de realización ventajoso de la invención, el hidrolizado contiene una cantidad de compuestos de naturaleza protéica que representan entre un 30 y un 90% del peso total de la materia seca, más particularmente esta cantidad está comprendida entre un 50 y un 80% del peso total de la materia seca.

Preferentemente según la invención, el hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas es un hidrolizado de proteínas fermentadas, es decir, que éstas se sometieron a una etapa de fermentación.

El agente activo según la invención, o la composición que lo contiene permitirá aclarar, incluso blanquear, la piel. Inicialmente la piel puede tener más o menos color o ser más o menos oscura; este color tiene un origen natural o se debe a la influencia de factores exteriores, tales como las radiaciones UV o la edad por ejemplo. Además, el agente activo según la invención, o la composición que lo contiene, permitirá borrar de manera más o menos directa las manchas pigmentarias de la piel y/o permitirá despigmentar los pelos y/o el cabello. Permitirá así aclarar las zonas hiperpigmentadas, es decir las zonas cutáneas que contienen una gran cantidad de melanina. Cuando se hable de manchas pigmentarias de la piel, se hace referencia a todas las modificaciones de la pigmentación de la piel que se traducen en un oscurecimiento general o un oscurecimiento localizado, formando así manchas más o menos oscuras. Estas modificaciones pueden ser de origen natural o inducidas por diferentes agentes como, por ejemplo, las radiaciones UV o también los productos químicos. Estos trastornos de orden pigmentario pueden manifestarse en pecas, lunares o manchas difusas tales como manchas del embarazo, el cloasma, así como en otros trastornos hiperpigmentarios como el lentigo, por ejemplo. Perturbaciones de esta pigmentación, más o menos importantes, también pueden aparecer naturalmente con el envejecimiento. Así algunas personas pueden ver aparecer manchas más o menos oscuras y/o coloradas en la piel, que confieren a la piel zonas de coloraciones heterogéneas que forman manchas de senescencia. Más generalmente el hidrolizado según la invención permite regular la pigmentación cutánea.

El activo según la invención es un agente activo blanqueador o despigmentante eficaz que actúa, entre otras cosas, inhibiendo la formación de melanina en los melanocitos. Así, según otro aspecto, la invención se refiere al uso de un hidrolizado de proteínas fermentadas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas, tal como se define más arriba, con el fin de inhibir y/o disminuir la actividad de la tirosinasa, y/o inhibir y/o disminuir la síntesis de melanina.

La invención se refiere al uso de una composición cosmética y/o a la preparación de una composición dermatológica que contiene un activo despigmentante con el fin de obtener una aclaración de la piel o con el fin de tratar las manchas pigmentarias. La composición según la invención puede ser una composición cosmética y/o dermatológica y/o farmacéutica. Preferentemente según la invención, la composición es una composición cosmética ya que se destina a mejorar el aspecto y las cualidades cutáneas generales del individuo que la usa.

Más particularmente, esta composición está adaptada a un uso destinado a blanquear y/o decolorar la piel, despigmentar los pelos y/o el cabello, o tratar las manchas pigmentarias de la piel. Preferentemente, la composición según la invención es una composición cosmética y/o dermatológica adaptada a la administración por vía tópica cutánea, que comprende un medio aceptable desde el punto de vista cosmético o dermatológico. Claro está que la invención se destina a los mamíferos en general y, más particularmente, a los seres humanos.

La cantidad eficaz de principio activo corresponde a la cantidad necesaria para obtener el resultado deseado. Según un modo de realización ventajoso de la invención, el susodicho hidrolizado de proteínas está presente, en las composiciones de la invención, en una concentración comprendida entre unos 0,0001% y 20% y preferentemente en una concentración comprendida entre unos 0,01 y 10% en peso con respecto al peso total de la composición final.

Según un modo de realización ventajoso de la invención, el susodicho hidrolizado se disuelve previamente en uno o distintos disolventes aceptables desde el punto de vista cosmético o farmacéutico como el agua, el etanol, el propanol o el isopropanol, el propilenglicol, el butilenglicol, el dipropilenglicol, los diglicoles etoxilados o propoxilados o cualquier mezcla de estos disolventes. Según otro modo de realización ventajoso de la invención, el susodicho hidrolizado se disuelve previamente en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas o se absorbe en polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales como los talcos y bentonitas, y más generalmente se disuelve en, o se fija a, cualquier vector aceptable del punto de vista cosmético o farmacéutico.

Cualquiera que sea la forma de la invención, la composición según la invención puede ingerirse, inyectarse o aplicarse en la piel (en cualquier zona cutánea del cuerpo), el cabello, las uñas o las mucosas. Según el modo de administración, la composición según la invención puede presentarse en cualquier forma galénica normalmente utilizada.

## ES 2 318 507 T3

Preferentemente las composiciones según la presente invención se presentarán en una forma galénica adaptada a la administración por vía tópica cutánea. Esto abarca todas las formas cosméticas o dermatológicas. Por lo tanto dichas composiciones han de contener un medio aceptable desde el punto de vista cosmético, es decir compatible con la piel, los pelos o el cabello.

5 En particular dichas composiciones pueden presentarse en forma de solución acuosa, hidroalcohólica o aceitosa; de emulsión aceite en agua, agua en aceite o emulsiones múltiples; también pueden presentarse en forma de cremas, suspensiones o también polvos, adaptados a una aplicación en la piel, las mucosas, los labios y/o el cabello. Estas composiciones pueden ser más o menos fluidas y tener el aspecto de una crema, loción, leche, suero, pomada, champú,  
10 gel, pasta o espuma. También pueden presentarse en forma sólida, tal como un stick, o aplicarse en la piel en forma de aerosol. Pueden utilizarse como producto de tratamiento y/o producto de maquillaje de la piel.

Estas composiciones comprenden, además, cualquier aditivo que suela usarse en el campo de aplicación considerado así como los aditivos necesarios para su formulación, tales como disolventes, espesantes, diluyentes, antioxidantes,  
15 colorantes, filtros solares, agentes autobronceadores, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes de olor, activos cosméticos o farmacéuticos, aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos esenciales, tensioactivos, polímeros filmógenos, etc. En todo caso el especialista se asegurará de que estos aditivos así como sus proporciones se elijan como para no perjudicar las propiedades ventajosas deseadas de la composición según la invención. Estos aditivos pueden por ejemplo corresponder a entre un 0,01 y un 20% del peso total de la composición. Cuando la composición  
20 de la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar entre un 5 y un 80% en peso y preferentemente entre un 5 y un 50% en peso con respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición se eligen entre los que suelen usarse en el ámbito considerado. Por ejemplo pueden usarse en una proporción que va de un 0,3 a un 30% en peso, con respecto al peso total de la composición. Claro está que el experto en la materia elegirá los eventuales compuestos adicionales, activos o no activos, y/o su cantidad, de modo que la  
25 correspondiente adición no altere, o no altere sensiblemente, las propiedades ventajosas de la mezcla.

Las composiciones según la invención encuentran su aplicación, en particular, como composición cosmética o farmacéutica para la piel, y también como composición cosmética para el cabello y/o los pelos. Encuentran una aplicación peculiar a modo de producto de despigmentación y/o decoloración de la piel y/o los pelos. La composición  
30 elaborada según la invención también puede ser una composición que permite luchar contra las manchas pigmentarias de la piel.

Según la invención, a la composición se pueden añadir, entre otras cosas, distintos agentes activos destinados en particular a la prevención y/o el tratamiento de los trastornos de orden pigmentario. Además, la composición  
35 según la invención, puede asociar al hidrolizado de proteínas. tal como se define más arriba, otros agentes activos que favorezcan su acción. Así, se pueden añadir agentes activos que tienen una acción queratolítica, es decir, agentes descamantes que tienen una acción exfoliante tales como por ejemplo los alfa-hidroxiácidos y los beta-hidroxiácidos. Estos agentes actúan de manera eficaz en los mecanismos de la pigmentación.

40 Según otro aspecto, la composición según la invención puede ser una composición contra el sol, es decir, una composición que ayuda a la protección contra la radiación del sol. Así, puede ser ventajoso añadir a la composición según la invención activos que ayudan a la protección contra el sol, tales como filtros solares por ejemplo.

Las composiciones objeto de la invención encuentran su aplicación en un gran número de tratamientos en particular cosméticos o dermatológicos. Pueden constituir una composición cosmética, en particular para el tratamiento,  
45 la protección, el desmaquillaje y/o la limpieza de la piel y/o del cabello, y/o para el maquillaje de la piel, de los labios, de las pestañas y/o del cuerpo. La composición según la invención también puede consistir en preparaciones sólidas, que comprenden también jabones o pastillas de limpieza. La composición también puede envasarse en forma de composición para aerosol incluyendo también un agente propulsor a presión.

50 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a aclarar la piel y/o los pelos. La invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a tratar los trastornos de la pigmentación de la piel. Dichos procedimientos de tratamiento cosmético de la piel y/o del  
55 cabello consisten en aplicar en la superficie de la piel, los pelos o el cabello, una cantidad eficaz de un hidrolizado de proteínas de plantas de la familia de las crucíferas tal como se define más arriba, con el fin de obtener la acción deseada. Preferentemente, el procedimiento consiste en aplicar en la superficie de la piel, los pelos y el cabello, una cantidad eficaz de un hidrolizado de proteínas fermentadas de plantas de la familia de las crucíferas, tal como se define más arriba.

60 Modos de realización específicos de este procedimiento de tratamiento cosmético resultan también de la descripción anterior. El procedimiento de tratamiento cosmético de la invención puede ponerse en práctica, en particular, al aplicar las composiciones cosméticas tales como se definen más arriba, según la técnica de uso habitual de dichas composiciones, por ejemplo: aplicación de cremas, geles, sueros, lociones, leches, champús o de composiciones contra  
65 el sol, en la piel o el cabello, o también aplicación de pasta dental en las encías.

Aparecerán más claramente otras características y ventajas de la invención en los ejemplos dados a modo ilustrativo y no limitativo.

## ES 2 318 507 T3

### Ejemplo 1

#### *Preparación de un hidrolizado de proteínas fermentadas de vegetales pertenecientes al género de las crucíferas*

5 En una primera etapa, se deslipidiza 1 kg de las semillas de colza por acción de un disolvente orgánico: el hexano. Tras secado del producto, se obtiene un residuo enriquecido con proteínas (la torta). A continuación se realiza una etapa de fermentación.

El medio de cultivo de la fermentación está constituido:

- 10 - por una torta de colza en una concentración de 18 g/l,
- por glucosa en una concentración de 20 g/l,
- 15 - por cloruro de sodio en una concentración de 4 g/l,
- por  $K_2HPO_4$  en una concentración de 2 g/l.

20 Este medio tiene un pH de 6,5. En él se siembran levaduras del género *Rhysopus*. El cultivo se efectúa en un fermentador, con agitación lenta (30 revoluciones por minuto) a 30°C durante 24 horas. La mezcla se pone después en autoclave durante veinte minutos a 120°C y se hidroliza después, por adición de una enzima: la papaína, a 60°C durante 4 horas con agitación. Esta mezcla se calienta después a 80°C, se centrifuga y se filtra hasta la obtención de una solución límpida. Después se concentra al vacío y se filtra de nuevo en filtros de placas y después en un cartucho esterilizante.

25 Entonces se obtiene un hidrolizado de color pardo con una titulación de 30 g/l de compuestos de naturaleza protéica. Es decir que se obtiene un hidrolizado que contiene una cantidad de compuestos de naturaleza protéica que representa unos 65% del peso total de la materia seca. Dicho hidrolizado se vuelve a disolver en dipropilenglicol.

30 Sin embargo, se puede efectuar una etapa de extracción de una fracción protéica a partir de la torta, previamente a la fermentación; esta fracción protéica servirá después de sustrato para la fermentación. Dicha extracción se realiza con ayuda de una solución acuosa, básica (con un pH 11) y en caliente (50°C), con agitación constante durante una hora. El medio de extracción se lleva después a un pH de unos 3 o 4, gracias a una solución ácida, preferentemente gracias a un ácido mineral (ácido clorhídrico o sulfúrico). Se forma un precipitado de naturaleza protéica que se recoge por centrifugación y filtración. Esta mezcla se pone de nuevo en suspensión para servir de sustrato para la fermentación.

### Ejemplo 2

#### *Puesta de relieve del efecto despigmentante del extracto del ejemplo 1 por medio de ensayos ex vivo*

40 La actividad despigmentante del hidrolizado según el ejemplo 1 se evidenció en una muestra de piel.

Se toman biopsias de 6 mm de diámetro en muestras de piel humana. Estas biopsias se mantienen vivas *ex vivo* por cultivo en presencia de un medio específico (DMEM 1 g/L, HAMF12, SVF y antibióticos) en insertos colocados en placas de 6 pozos. Entonces se tratan las biopsias con el activo a una concentración de 1%, según diferentes condiciones. Para cada una de las condiciones también se realizan controles, es decir sin la aplicación de activo.

- Condición A: el activo se aplicó durante 5 días a razón de 2 aplicaciones por día.
- 50 - Condición B: se realiza una irradiación de la piel de 100 mJ/cm<sup>2</sup>, el activo se aplica después, 2 veces en 24 horas.
- Condición C: se realiza un pretratamiento con el activo durante 24 horas (2 aplicaciones), seguido de 4 días de cultivo sin aplicación, se realiza una irradiación de 100 mJ/cm<sup>2</sup> y el activo se aplica después, 2 veces en 55 24 horas.
- Condición D: se realiza un pretratamiento con el activo durante 24 horas (2 aplicaciones), seguido de una irradiación de 100 mJ/cm<sup>2</sup>, el activo se aplica después durante 2 días (2 aplicaciones).
- 60 - Condición E: se realiza un pretratamiento con el activo durante 24 horas (2 aplicaciones), seguido de una irradiación de 100 mJ/cm<sup>2</sup>, el activo se aplica después durante 5 días (2 aplicaciones).

Se realiza histológicamente una evaluación cuantitativa de la cantidad de melanina presente en la epidermis de las muestras de piel, con un microscopio óptico, después de una coloración según el método de Fontana-Masson.

65 Se colocan las biopsias de piel en la parafina y se efectúan secciones histológicas de 4 μm de espesor. Entonces se coloran estas secciones con la técnica de Fontana-Masson: las láminas se desparafinan, se hidratan y se tratan con una solución de amoníaco de plata. Tras pasar dos minutos por el microondas las láminas se aclaran, se tratan con sodio

## ES 2 318 507 T3

tiosulfato, se aclaran de nuevo y se contracoloran con hematoxilina, antes de deshidratarse y montarse en láminas, lo que permite la visualización con microscopio óptico de la melanina presente en la epidermis.

La visualización con microscopio óptico de la cantidad de melanina permitió distinguir tres clases de pigmentación de la piel:

(+): Piel muy pigmentada, es decir que presenta una importante carga de melanina (depósito homogéneo).

(-): Piel bastante pigmentada, es decir que presenta una moderada carga de melanina (granos difusos de melanina, depósito no homogéneo).

(--): Piel poco pigmentada o no pigmentada.

Los resultados se recopilan en el cuadro a continuación:

Condiciones:	Sin activo	Con activo
A	-	--
B	+	-
C	+	--
D	+	-
E	+	--

Estos resultados permiten concluir que, en ausencia de irradiación de los UVB (condición A), el activo disminuye el índice de melanina en comparación con la muestra de piel no tratada. Además, la síntesis de melanina, inducida por las irradiaciones de UVB, se atenúa al aplicar el activo durante 2 a 5 días tras irradiación. Tal efecto es aún más marcado al tratar previamente las muestras con el activo, antes de la irradiación. Así, el activo según la invención permite disminuir significativamente la pigmentación de la piel y permite obtener aparentemente una inhibición de la síntesis de melanina.

### Ejemplo 3

*Puesta de relieve del efecto despigmentante del extracto del ejemplo 1 por medio de un estudio clínico (ensayos in vivo)*

#### 1. Principio del ensayo

Se efectuó un ensayo *in vivo* en voluntarios, con el fin de evidenciar el efecto despigmentante del hidrolizado según el ejemplo 1. Este ensayo se realizó mediante el estudio del índice melánico de la superficie cutánea así como mediante un análisis de las zonas de piel tratadas con el activo.

#### 2. Modelo experimental

Se efectuó un estudio clínico en un grupo de 15 voluntarios de 45 a 76 años de edad. Este estudio se realizó a doble ciego controlado con placebo, los voluntarios presentaban una pigmentación no homogénea de la piel (es decir manchas pigmentarias) debida a la edad y/o a una exposición a los UV. Los voluntarios aplicaron el activo, formulado a 3% en una composición, en una zona delimitada de los antebrazos, dosificado a 2 mg/cm<sup>2</sup>, y el placebo en otra zona. Esta aplicación se realizó dos veces por día durante 4 semanas.

El efecto despigmentante se midió con una cuantificación del índice melánico realizado con ayuda de un instrumento específico: el Mexameter MX18 (Courage & Khazaka). El estudio comprendió varias visitas de control: una visita antes del principio del tratamiento (T0) y una visita cada semana durante 4 semanas. Se tomaron fotos en T0 y T4 con una cámara digital (Mínolta dimage 7i). La evolución de la pigmentación cutánea se evaluó tras la observación clínica y la cuantificación del índice melánico.

#### 3. Resultados

La evolución de la pigmentación se midió por cuantificación del índice melánico de la piel así como por procesamiento estadístico de los datos. Los resultados se presentan en el cuadro a continuación.

## ES 2 318 507 T3

El análisis estadístico se realizó gracias al ensayo no paramétrico de Wilcoxon, para las series emparejadas, para cada sujeto. El resultado se obtiene según el siguiente cálculo:

$$\text{Resultado} = \text{Dif.}_{A/Un \text{ o } PI} = T_{8_{A/Un \text{ o } PI}} - T_{0_{A/Un \text{ o } PI}}$$

A = Activo; Un = No tratado; PI = Placebo

Zona de rechazo: en la medida en que el sentido de la diferencia es previsible, la zona de rechazo será unilateral. El grado de significatividad es  $\alpha \leq 5\%$ .

	Índice de melanina		%	P
	T0	T4		
Activo	246,400	211,467	-6,595	0,00235***
Placebo	237,333	236,267	-0,449	0,4875 <sup>ns</sup>

(\*\*\*): muy significativo (ns): no significativo

Estos resultados demuestran que la aplicación del activo según la invención reduce considerablemente el índice de melanina presente en la piel. Esta disminución se observa en particular en las zonas hiperpigmentadas y después de 4 semanas de aplicación del activo, siendo estadísticamente significativa esta disminución. Se confirmaron estos resultados con un examen clínico: el 67% de los voluntarios presentó una disminución de la pigmentación de la zona tratada con el activo, con respecto a la zona tratada con el placebo. Por otra parte, se notó en el 86% de los voluntarios una disminución aparente de las manchas pigmentarias.

En conclusión, se observó que el hidrolizado según la invención, formulado a 3% en un gel, posee un efecto despigmentante, es decir, un efecto aclarador de la piel, así como una verdadera acción en la lucha contra las manchas pigmentarias.

### Ejemplo 4

*Puesta de relieve del efecto del extracto del ejemplo 1 en la síntesis de la melanina por medio de los melanocitos en cultivo*

#### 1. Determinación del índice de melanina

El principio de este ensayo radica en una dosificación de la melanina mediante un método espectrométrico.

Se siembran  $1 \cdot 10^5$  células en cajas de "diámetro 60" que se ponen en cultivo durante 24 horas. Estas células se tratan después con el extracto según la invención, en solución de diferentes porcentajes: 1%, 3% y 7% y durante 24 horas.

Las células se recuperan después por tripsinación. La mitad de dichas células se utiliza pues para la dosificación de la melanina y la otra mitad para la determinación del contenido protéico (mediante la técnica de Pierce). Para realizar la dosificación de la melanina, las células se disuelven en 1 mL de NaOH-1N/10%-DMSO durante 2 horas a los 80°C y se centrifugan después durante 10 minutos a 10000 g. La absorbencia del sobrenadante se lee entonces a 470 nm y se compara después con la curva de referencia de la melanina. Esta curva de referencia se prepara con ayuda de la melanina sintética SIGMA, que tiene concentraciones comprendidas entre 0,05 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , y con una concentración final de NaOH a 0,2M.

Los resultados se presentan en el cuadro a continuación. Representan la cantidad de melanina sintetizada, expresada en  $\text{pg}/\mu\text{g}$  de proteínas, de acuerdo con las diferentes condiciones de estudios.

## ES 2 318 507 T3

Condiciones de estudios	Controles	Con extracto a 1 %	Con extracto a 3 %	Con extracto a 7 %
Cantidad de melanina (pg/ $\mu$ g de proteínas)	171	126	110	107

Estos resultados demuestran que el extracto según la invención permite disminuir significativamente la cantidad de melanina presente en los melanocitos, actuando dicho extracto de manera dosis-dependiente.

### 2. Determinación de la actividad de la tirosinasa

La tirosinasa es una enzima clave en el mecanismo de formación de la melanina. La medida de su actividad permite determinar la aptitud del activo según la invención para inhibir el mecanismo de formación de ésta. El principio de este ensayo radica en una medida del índice de oxidación de un sustrato: la L-DOPA.

Las células se ponen en cultivo en placas de 6 pozos (con  $1.10^5$  células) durante 24 horas. Después éstas se tratan con el extracto según la invención disuelto a 3% durante 24 horas, 48 horas o 72 horas.

Las células se recuperan por tripsinación, se lavan 3 veces con PBS frío y se centrifugan durante 5 minutos a 10000 g. Las células se lisan con 300  $\mu$ L de tampón sodio fosfato (0,1 M, pH 7) que contiene 1% de núcleo de tritio X-100 + 0,1 mM PMSF. Después de una incubación de 30 minutos, el extracto celular se centrifuga a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, entonces se recupera el sobrenadante. El contenido protéico de cada extracto se determina con la técnica de Pierce. La L-DOPA se prepara a 2 mg/mL (10 mM) en un tampón fosfato (0,1 M; pH 7); un volumen de 10  $\mu$ L de cada extracto se coloca en una placa de 96 pozos y se empieza la medida de la actividad enzimática añadiendo 100  $\mu$ L de la solución L-DOPA a 37°C, se realizan los pozos "controlados", que contienen 100  $\mu$ L de tampón de lisis. A la formación del dopacromo le sigue una medida de la absorbencia a 405 nm cada 10 minutos durante 1 hora a 37°C. Entonces se establece una curva de absorbencia para cada condición.

La actividad final de la tirosinasa se presenta en DO/min/g de proteínas de acuerdo con las diferentes condiciones de estudio realizadas. Los resultados se presentan en el cuadro a continuación.

Actividad de la tirosinasa (DO/min/g de proteínas)	Tratamiento durante 24 h	Tratamiento durante 48 h	Tratamiento durante 72 h
Células no tratadas	130	83	54
Células tratadas	124	74	46

Estos resultados permiten deducir que el extracto según la invención inhibe de manera particularmente eficaz la actividad de la tirosinasa, enzima clave en el mecanismo de formación de la melanina.

## ES 2 318 507 T3

### Ejemplo 5

#### Preparación de composiciones

5 Las cantidades indicadas se dan en porcentaje de peso.

#### 1. Crema resplandor para la tez con protección contra el sol

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
<b>FASE A</b>		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	5,00
Isopropyl Palmitate	Isopropyl Palmitate	7,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Dow Corning 200	Dimethicone Polydimethylsiloxane	0,50
Parsol MCX	Ethylhexyl Methoxycinnamate	3,00
Parsol 1789	Butyl Methoxydibenzoylmethane	1,00
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,50
Cegesoft PS6	Vegetable Oil	2,00
Aceite de Jojoba	Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed oil	5,00
<b>FASE B</b>		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	csp
Glicerina	Glycerin	3,00
Glucam E10	Methyl Gluceth-10	0,50
EDTA Tetrasodium	EDTA	0,20
<b>FASE C</b>		
Sepigel 305	Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7	0,35
Zumo de limón	Citrus medica Limonum (Lemon) Fruit Extract	0,23
<b>FASE D</b>		
Extracto según el ejemplo 1		1,50
Compo. perfumadora	Perfume (Fragancia)	csp
Colorante	Dye	csp

65 Los componentes de la fase A y de la fase B se calientan a una temperatura de 70°C, luego se emulsiona la fase A en la fase B. Después de la emulsión se añade el Sepigel y después el zumo de limón. Después, al situarse la temperatura por debajo de los 40°C, se añade la fase D.

## ES 2 318 507 T3

### 2. Gel antimanchas para las manos

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	csp
Glicerina	Glycerin	16,00
Butilenglicol	Butylene Glycol	6,00
Germall 115	Imidazolidinyl Urea	0,30
Alantoína	Allantoin	0,20
Sepigel 305	Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7	3,00
FASE B		
Dow Corning 345 Fluid	Cyclomethicone	5,00
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,50
FASE C		
Dry Flo Pure	Aluminium Starch Octenylsuccinate	4,00
Extracto según el ejemplo 1		1,00
Perfume	Perfume (Fragancia)	csp
Colorante	Dye	csp

La fase A se prepara por mezcla de las diferentes materias primas que la constituyen, a 30°C, con agitación. La fase B se añade a la fase A mezclándola con agitación por hélice. En el remolino se espolvorea la fase C.

## ES 2 318 507 T3

### 3. Suero despigmentante

Nombres comerciales	Nombres INCI	% másico
FASE A		
Natrosol 250 HR	Hydroxyethylcellulose	0,60
Propilenglicol	Propylene Glycol	5,00
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	csp
FASE B		
EDTA Tetrasodium Salt	EDTA	0,05
Etanol 96 %	Alcohol	5,00
FASE C		
Agua desmineralizada	Aqua (Water)	csp
C-Mate	Magnesium Ascorbyl Phosphate	0,50
FASE D		
DL-Lactic Acid	Lactic Acid	0,10
Extracto según el ejemplo 1		3,00
Composición perfumadora	Perfume (Fragancia)	csp
Colorante	Dye	Csp

La fase A se prepara a una temperatura de unos 30°C, el gel así obtenido se deja inflar durante ½ hora. Se añade después la fase B en frío. La fase C se prepara con agitación en frío y se añade al gel. La fase D se añade después con agitación.

## ES 2 318 507 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una cantidad eficaz de un hidrolizado de proteínas de plantas, pertenecientes a la familia de las crucíferas, como principio activo blanqueador y/o despigmentante, para la preparación de una composición terapéutica para blanquear y/o despigmentar.
- 10 2. Uso no terapéutico de una cantidad eficaz de un hidrolizado de proteínas de plantas, pertenecientes a la familia de las crucíferas, como principio activo blanqueador y/o despigmentante para blanquear y/despigmentar.
- 10 3. Uso según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque las proteínas son proteínas fermentadas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas.
- 15 4. Uso según una de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque la planta utilizada de la familia de las crucíferas es la colza (*Brassica napus*).
- 15 5. Uso según una de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque el hidrolizado se obtiene a partir de semillas de colza.
- 20 6. Uso según una de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque, en la etapa de fermentación, el medio de cultivo se suplementa con azúcares, aminoácidos y sales minerales.
- 20 7. Uso según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque el hidrolizado contiene una cantidad de compuestos de naturaleza protéica que representa entre un 30 y un 90% del peso total de la materia seca.
- 25 8. Uso según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque el hidrolizado contiene una cantidad de compuestos de naturaleza protéica que representa entre un 50 y un 80% del peso total de la materia seca.
- 30 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, destinándose el hidrolizado o la composición a despigmentar y/o blanquear y/o aclarar la piel, los pelos y/o el cabello.
- 30 10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, destinándose el hidrolizado o la composición a quitar o disminuir las manchas pigmentarias de la piel.
- 35 11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, destinándose el hidrolizado o la composición a inhibir y/o disminuir la actividad de la tirosinasa, y/o a inhibir y/o disminuir la síntesis de melanina de las células de la piel.
- 35 12. Uso según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque la composición se presenta en forma de composición adaptada a la administración por vía tópica cutánea que comprende un medio aceptable desde el punto de vista cosmético o farmacéutico.
- 40 13. Uso según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque el hidrolizado de proteínas está presente en una cantidad que representa entre un 0,0001% y un 20% del peso total de la composición y preferentemente en una cantidad que representa entre un 0,01% y un 10% del peso total de la composición.
- 45 14. Uso según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque el hidrolizado se disuelve previamente en uno o distintos disolventes aceptables del punto de vista cosmético o farmacéutico como el agua, el etanol, el propanol o el isopropanol, el propilenglicol, el butilenglicol, el dipropilenglicol, los diglicoles etoxilados o propoxilados o cualquier mezcla de estos disolventes.
- 50 15. Uso según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque el hidrolizado se disuelve previamente en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas o se adsorbe en polímeros orgánicos en polvo, soportes minerales como los talcos y bentonitas, y más generalmente se disuelve en, o se fija a, cualquier vector aceptable del punto de vista cosmético o farmacéutico.
- 55 16. Uso según una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, **caracterizado** porque la composición se presenta en forma de solución acuosa, hidroalcohólica o aceitosa o en forma de emulsión aceite en agua, agua en aceite o emulsiones múltiples o en forma de cremas, suspensiones o también polvos; dichas composiciones pueden ser más o menos fluidas o sólidas y tener el aspecto de una crema, loción, leche suero, pomada, gel, pasta, espuma o stick.
- 60 17. Procedimiento de tratamiento cosmético de la piel destinado a aclarar la piel y/o los pelos; y/o a tratar los trastornos de la pigmentación de la piel, **caracterizado** porque se aplica en la piel, los pelos o el cabello una composición cosmética que contiene, en un medio aceptable del punto de vista cosmético, por lo menos un hidrolizado de proteínas de plantas pertenecientes a la familia de las crucíferas.

65