

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 261**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/64**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2010 PCT/FR2010/000722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11055032**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010 E 10801180 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2496211**

54 Título: **Uso de una composición que comprende un hidrolizado peptídico de arroz no fermentado para estimular el crecimiento de los cabellos**

30 Prioridad:

**03.11.2009 FR 0905256**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.05.2017**

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENTS INC. (100.0%)  
1011 Centre Road, Suite 315  
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

**DAL FARRA, CLAUDE;  
DOMLOGE, NOUHA y  
BOTTO, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

**URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio**

**ES 2 612 261 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

5            Use de una composición que comprende un hidrolizado peptídico de arroz no fermentado para estimular el crecimiento de los cabellos.

10           **[0001]** La presente invención está en el campo de las composiciones cosméticas aplicadas al cabello. La presente invención se refiere a la utilización cosmética de una composición que comprende al menos un hidrolizado peptídico de arroz no fermentado a partir de la hidrólisis de las proteínas de los granos de arroz liberados de su cáscara por una etapa de descascarillado, que comprende al menos 70% de péptidos de tamaño inferior a 6 kDa, como agente activo para frenar, limitar la caída del cabello y/o estimular su crecimiento aumentando la cantidad de proteínas marcadoras de células madre adultas foliculares y favoreciendo la diferenciación de estas células.

15           **[0002]** Los cabellos son anexos queratínicos al igual que los pelos, las pestañas, las cejas o incluso las uñas. Tienen un papel fisiológico de protección del cuero cabelludo, pero sobre todo una función social, y esta desde hace mucho tiempo en la historia del hombre. Los cabellos pueden ser de diferentes naturalezas, largos, cortos, lisos, rizados,...., pero todos ellos obedecen la ley del ciclo. De hecho, los 100.000 a 150.000 folículos pilosos que forman una cabellera "normal" se renuevan todos de manera cíclica, asíncrona y estocástica a partir de una reserva de células madre adultas foliculares.

20           **[0003]** El folículo piloso es un apéndice cutáneo independiente con su propio control hormonal, su propio ciclo, una estructura compleja y estable (Bernard B. A., Medicina / Ciencia 2006; 22: 138-43). El ciclo del pelo se disecciona en 3 fases: la fase anágena, catágena y telógena. La fase anágena, o fase de crecimiento del cabello tiene una duración de entre 3 y 7 años (variable según la edad, el sexo y el área del cuero cabelludo). Esta fase va seguida de una fase de reposo llamada catágena y dura unss 3 semanas. Mientras que los procesos de apoptosis se producen durante esta fase catágena, provocando así la caída del cabello, la fase siguiente llamada telógena permitirá formarse un nuevo bulbo a partir de un germen piloso que va a iniciar el ciclo siguiente (Arouete J., J. Med. Est. Y Chir. Derm., Sept. 2005, 119, 165-167). Esta fase telógena durará, a su vez, alrededor de 3 meses. Por lo tanto, en un pelo "normal", alrededor de 85% de los folículos están en fase de crecimiento, 2% en fase de reposo, y un poco más de 10% en fase de caída.

30           **[0004]** Tanto en hombres como en mujeres, se constata que es normal perder entre 100 y 150 cabellos al día. Los cabellos caen y se renuevan por sí mismos. Pero cuando la caída sobrepasa ampliamente los 150 cabellos, o cuando la renovación por otro folículo es defectuosa (cabellos muy finos o escasos), se habla entonces de caída de cabellos, también llamada alopecia. Por alopecia, se entiende la caída de los cabellos o pelos de manera total o parcial, definitiva o transitoria, sobre todo debido a la edad, a factores genéticos o después de una afección local o general ... Hay diferentes tipos de alopecia en función del origen del trastorno:

- la alopecia androgenética (a menudo hereditaria) es la más frecuente: se manifiesta por una disminución del volumen de los cabello, incluso una calvicie, y afecta a 70% de los hombres (pero también afecta a las mujeres);
- la alopecia aguda: puede estar ligada a un tratamiento por quimioterapia, un estrés, deficiencias alimentarias importantes, carencia de hierro, trastornos hormonales, radiación aguda;
- la alopecia localizada: puede ser causada por problemas de la piel (tumores, quemaduras, areata), radioterapia, o parásitos (tiña, liquen);
- la alopecia congénita;
- la alopecia Areata que parece ser de origen autoinmune (mecanismo de mediación celular) que se caracteriza por un alcance en "parche" más o menos grande y una o más ubicaciones. Esta forma de peladura puede alcanzar toda la cabeza, se llama alopecia Totalis, y, a veces todo el cuerpo, se habla entonces de alopecia Universalis (en este caso, no hay más pelos ni cabellos en el conjunto del cuerpo).

45           **[0005]** Diferentes tratamientos cosméticos y/o farmacéuticos se han desarrollado en los últimos años para tratar mejor las diferentes alopecias. La alopecia androgenética es aquella para la que existe la mayoría de los tratamientos, ya que es la alopecia que afecta a la mayoría de personas. El origen de este tipo de alopecia se debe a una sensibilidad excesiva a las hormonas masculinas, o andrógenos, debida en sí misma a la herencia. Bajo la influencia de una enzima, la 5-alfa-reductasa, la testosterona se convierte en dihidrotestosterona o DHT que estimulará las glándulas sebáceas. Se creará así una seborrea permanente que provocará la obstrucción progresiva del folículo piloso y la asfixia del bulbo, lo que resulta en la interrupción repentina de la fase anágena.

50           **[0006]** Entre los tratamientos propuestos para el tratamiento de este tipo de alopecia, se puede citar el Minoxidil, o también el Propecia®. El primero permite retrasar el final de los ciclos de crecimiento y actuar sobre la pérdida de cabellos de forma indirecta. Sin embargo, tiene muchas desventajas tales como el

hecho de que debe ser administrado muy pronto desde el inicio de la alopecia, o también que, tras la interrupción del tratamiento, recomienza la caída. El Propecia®, o finasteride, es un agente de bloqueo de la enzima responsable de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona en los folículos pilosos. Permite reducir la caída de cabellos y activar su crecimiento. Pero una de las principales desventajas de este compuesto es su riesgo de causar un aumento en la incidencia de cáncer de próstata. Además, su contra-indicación para el tratamiento de la alopecia en las mujeres reduce su ámbito de aplicación.

**[0007]** Se han propuesto composiciones cosméticas orientadas para superar la falta de tratamientos médicos de la alopecia androgenética. Algunas composiciones están más o menos diseñadas para aumentar el volumen o densidad aparente de los cabellos. Otras composiciones están destinadas a estimular más o menos el crecimiento y la salud del cabello mediante el aumento de la síntesis de proteínas clave en la formación de cabello. Sin embargo, hay actualmente una fuerte demanda en cuanto a composiciones que permiten limitar la caída del cabello y/o estimular su crecimiento.

**[0008]** Es así que el Solicitante ha demostrado las propiedades como agente anticaída de un extracto particular de arroz, particular en que el extracto es un hidrolizado peptídico proveniente de la hidrólisis de las proteínas de los granos de arroz, dicho arroz siendo no fermentado.

**[0009]** El arroz se conoce desde hace mucho tiempo como un agente que estimula el crecimiento de los cabellos con diferentes grados de eficacia. Por ejemplo, una composición que comprende un extracto de arroz como promotor de la producción del factor de crecimiento HGF, se ha descrito como activador del crecimiento de los cabellos (JP 2004099503A). Una patente japonesa presentada por SO-KEN KK (JP5306211A) describe una composición tónica que tiene propiedades contra la caída de los cabellos, dicha composición comprendiendo un extracto acuoso u orgánico de arroz obtenido por descomposición por una amilasa. Otras publicaciones y/o solicitudes de patentes describen extractos de arroz estimulantes del crecimiento del cabello, como la solicitud de patente FR 2684295. En esta solicitud, el extracto de arroz es obtenido a partir del salvado del grano de arroz y seguido por una etapa de fermentación. Sin embargo, ninguno de estos extractos es un extracto peptídico derivado de la hidrólisis de las proteínas de los granos de arroz no fermentados para luchar contra la caída de los cabellos y mantener su salud. La técnica anterior más próxima a la invención consiste en un extracto peptídico de arroz para el tratamiento y la prevención del envejecimiento de la piel (solicitudes de patente FR 2.915.379, FR 2.915.380, FR 2.915.383). En estos documentos nunca se ha descrito o sugerido que las composiciones divulgadas están destinadas al tratamiento de la caída del cabello.

**[0010]** Así, la presente invención se refiere a la utilización cosmética de una composición que comprende al menos un hidrolizado peptídico de arroz no fermentado proveniente de la hidrólisis de las proteínas de los granos de arroz liberadas de su cáscara por una etapa de descascarillado, que comprende al menos 70% de péptidos de tamaño inferior a 6 kDa, como agente activo para frenar, limitar la caída de los cabellos y/o estimular su crecimiento aumentando la cantidad de proteínas marcadoras de células madre adultas foliculares y favoreciendo la diferenciación de estas células.

**[0011]** La figura 1 muestra un histograma que compila y compara los resultados de un estudio de alargamiento de los folículos pilosos en presencia o no del hidrolizado peptídico de arroz no fermentado según la invención.

**[0012]** Según la invención, se utilizarán indiferentemente los términos "hidrolizado peptídico", "extracto", "extracto peptídico", "extracto solubilizado" o "agente activo".

**[0013]** Se entiende por "hidrolizado peptídico", un extracto obtenido por hidrólisis de las proteínas de los granos de arroz que comprende una mezcla de compuestos mayoritariamente representados por péptidos u oligopéptidos. Por "hidrolizado peptídico de arroz no fermentado" se entiende un hidrolizado obtenido a partir de proteínas de granos de arroz descascarillados que no han sido sometidos a etapa de fermentación, ni antes de las hidrólisis ni después de obtener el hidrolizado.

**[0014]** El Solicitante ha descubierto que un extracto peptídico de arroz no fermentado tiene una actividad cierta sobre los folículos pilosos de los cabellos y, en particular, tenía una acción como agente de protección contra caídas. Existen muchos extractos de arroz en esta indicación, pero estos extractos son la mayoría de las veces extractos glucosídicos, siendo las proteínas y péptidos presentes deliberadamente destruidos en la obtención del extracto. El uso de un extracto no fermentado ha permitido al Solicitante optimizar el rendimiento biológico del mismo, en términos cualitativo y cuantitativo, en comparación con los extractos de arroz existentes. Gracias a la no fermentación de los granos de arroz, las proteínas componentes no son degradadas por las proteasas de las levaduras de fermentación. Así, se conserva un máximo de proteínas nativas y será fácil hidrolizarlas selectiva y específicamente para obtener un gran número de péptidos bioactivos.

**[0015]** Se entiende por "agente activo para frenar, limitar la pérdida de cabello y/o estimular su crecimiento", todo hidrolizado peptídico de arroz no fermentado que puede estimular el folículo piloso, la

expresión de la integrina A 6, los marcadores de diferenciación de los queratinocitos tales como la queratina K15, o incluso la  $\beta$ -catenina, o también los marcadores de proliferación, tales como p63.

5 **[0016]** Las fibras queratinicas humanas a las que se aplica la invención son principalmente los cabellos, las cejas, las pestañas, los pelos de la barba, del bigote, pelos púbicos y las uñas. De acuerdo con una realización particular, la composición se destina a ser utilizado para activar el crecimiento de las pestañas.

10 **[0017]** Se divulga el uso de al menos un hidrolizado peptídico de arroz según la invención, como agente activo para proteger las células madre adultas foliculares y su micro-entorno específico. El hidrolizado ha sido ensayado por el Solicitante, y éste ha podido demostrar la acción biológica del mismo en las células que forman el folículo piloso, principalmente células madre adultas foliculares. Se ha demostrado que el extracto tenía más particularmente una acción sobre el microambiente específico que constituye el "nicho" que protege dichas células madre. Por último, se ha demostrado una acción de protección de estas mismas células por dicho extracto.

15 **[0018]** Se sabe que las células madre adultas, principalmente las foliculares, son difíciles de identificar. A pesar de ello, son sin embargo distinguibles porque expresan un conjunto de marcadores que permite obtener un perfil de expresión específico para este tipo de células. Estos marcadores incluyen, entre otros:

- 20
- la queratina K15 que es un marcador de células madre en la etapa más diferenciada en el compartimiento folicular llamado protuberancia (Bernard B. A.; *Medecine / Sciences* 2006; 22: 138-43);
  - 25 - la integrina  $\alpha 6$  (que colocaliza con la Laminina-5) que se describe como un marcador potencial de células madre foliculares (Bernard B. A., *Medecine / Sciences* 2006; 22: 138-43);
  - la  $\beta$ -catenina que desempeña un papel clave en la diferenciación y el crecimiento del folículo del cabello (DasGupta y Fuchs, 1999 *Development* 126 :4557-68; Van Mater et al, 2003, *Gene dev.*17: 1219-24 );
  - 30 - p63 que es un marcador ligado a la capacidad proliferativa de las células madre para generar un folículo, una glándula sebácea y una epidermis (Shikh et al, 2007, *Biochem Biophys Res Commun*, 14; 361 (1): 1-6.

35 **[0019]** El hidrolizado ha demostrado su acción sobre los diferentes marcadores antes citados. En efecto, se asiste a un alza de la expresión de esos marcadores cuando se aplica una composición que comprende al menos dicho hidrolizado sobre folículos en cultivo. La consecuencia de estas sobreexpresiones se traduce en una limitación de la caída de los cabellos y, por lo tanto, en una estimulación del crecimiento de ellos.

40 **[0020]** Se divulga el uso de al menos un hidrolizado según la invención como agente activo capaz de luchar contra el envejecimiento y, en particular, el fotoenvejecimiento de los cabellos. Se sabe que el envejecimiento de los cabellos se manifiesta esencialmente (además de su blanqueamiento) por una disminución de la densidad capilar y por la disminución progresiva del diámetro de los folículos, dando a la cabellera un aspecto más pobre, más escaso (Pelfini, C. et al., *J. Méd. Esth. Et Chir. Derm.* 1987; Birch MP et al. *Br. J. Dermatol* 2001;144: 297-304). Por otra parte, además del envejecimiento clásico,

45 programado genéticamente, está el fotoenvejecimiento causado por la acumulación de agresiones debidas a la radiación UV y que acaban en un deterioro prematuro de la estructura de los cabellos y a un agotamiento de los folículos. Por consiguiente, el uso de un extracto que permite proteger las células madre adultas foliculares tendrá por efecto impedir el envejecimiento, en particular, el envejecimiento prematuro, y principalmente el fotoenvejecimiento.

50 **[0021]** Según una realización ventajosa de la invención, el hidrolizado proviene de la hidrólisis de las proteínas de los granos de arroz *Oryza Sativa L.* El hidrolizado peptídico está constituido por una mezcla de compuestos mayoritariamente representados por péptidos. El término "péptido" designa un encadenamiento de dos o más aminoácidos unidos entre sí por uniones peptídicas o por uniones peptídicas modificadas; el término "polipéptido" designando un péptido de tamaño más importante. El uso de hidrolizados peptídicos, y en particular de hidrolizados peptídicos de bajo peso molecular, presenta numerosas ventajas en cosmética. Además del hecho de generar compuestos de naturaleza peptídica que no existían previamente en la mezcla proteica de partida, la hidrólisis y la purificación permiten obtener mezclas más estables, más fácilmente normalizables y que no provocan reacciones alérgicas en dermocosmética.

60 **[0022]** El hidrolizado según la invención se obtiene por extracción de las proteínas del arroz no fermentado, extracción seguida de una hidrólisis controlada que libera los fragmentos peptídicos biológicamente activos. Muy numerosas proteínas encontradas en las plantas son susceptibles de contener fragmentos peptídicos biológicamente activos en el seno de su estructura. La hidrólisis realizada permite separar estos fragmentos peptídicos. Es posible, pero no necesario para realizar la invención, extraer sea las proteínas afectadas en primer lugar y a continuación hidrolizarlas, sea efectuar la hidrólisis

65

primeramente sobre un extracto bruto y purificar los fragmentos peptídico a continuación. Es posible igualmente usar ciertos extractos hidrolizados sin purificar los fragmentos peptídicos correspondientes a los péptidos biológicamente activos según la invención, pero asegurándose sin embargo de la presencia de dichos fragmentos por medios analíticos apropiados.

5

#### Protocolo de extracción

**[0023]** Para llevar a cabo la extracción, se usan granos de arroz descascarillados. Según la invención, se utiliza una de las numerosas plantas de la familia de las gramíneas del género *Oryza* (arroz), y preferiblemente la especie *Oryza sativa* L. Según la invención, el material vegetal utilizado será el grano desembarazado de su corteza por una etapa de descascarillado.

10

**[0024]** En una primera etapa, los granos de arroz descascarillados se muelen utilizando un molino de plantas. El polvo así obtenido puede ser posteriormente "desgrasado" utilizando un disolvente orgánico convencional (tal como un alcohol, hexano o acetona). Como se dijo anteriormente, no existe etapa alguna de fermentación sufrida por los granos, así el extracto sigue concentrado en proteínas nativas.

15

**[0025]** A continuación, se realiza la extracción de las proteínas de acuerdo con un método convencional (Osborne, 1924) modificado; la planta triturada se suspende en una solución alcalina que contiene un producto adsorbente de tipo polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble (0,01 -20%); de hecho, se ha observado que las operaciones de hidrólisis y de purificaciones posteriores se facilitaban por este medio. En particular, la concentración de sustancias de tipo fenólico, que interactúan con las proteínas, se reduce significativamente.

20

**[0026]** La fracción soluble, que contiene las proteínas, los carbohidratos y finalmente lípidos, se recoge después de las etapas de centrifugación y filtración. Esta solución bruta se hidroliza a continuación en condiciones preparadas para generar péptidos. La hidrólisis se define como una reacción química que implica la escisión de una molécula por el agua, pudiendo esta reacción realizarse en medio neutro, ácido o básico. Según la invención, la hidrólisis se lleva a cabo químicamente y/o ventajosamente por enzimas proteolíticas. Se puede entonces citar la utilización de las endoproteasas de origen vegetal (papaína, bromelina, ficina) o microorganismos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus*, Alcalase® de Novozym, etc.).

25

30

**[0027]** Por las mismas razones que antes, es decir, la eliminación de las sustancias polifenólicas, se añade una cantidad de polivinilpolipirrolidona al medio de reacción durante esta etapa de hidrólisis preparada. Después de la etapa de filtración que permite eliminar las enzimas y los polímeros, el filtrado (solución) obtenido constituye una primera forma del agente activo según la invención.

35

**[0028]** Se procede entonces a una etapa de dilución. Así, el extracto se disuelve en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables tales como agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, o cualquier mezcla de estos disolventes. Esta etapa de dilución es seguida de una esterilización por ultrafiltración para obtener un extracto peptídico caracterizado por un contenido de compuestos de naturaleza peptídica de 1,5-4 g/l. Preferiblemente, el extracto obtenido comprende un contenido en estos mismos compuestos comprendido entre 2 y 3 g/l.

40

45

**[0029]** El hidrolizado obtenido en esta etapa se purifica adicionalmente para seleccionar las fracciones de bajos pesos moleculares, preferiblemente inferiores a 6 kDa. Así, al menos 70% de los compuestos de naturaleza peptídica presentes en el extracto son péptidos de tamaño inferior a 6 kDa, y preferiblemente al menos 85%. La purificación se lleva a cabo ventajosamente por etapas de ultrafiltraciones sucesivas a través de filtros de porosidad decreciente, conservando los filtrados en cada etapa y/o por un método de tipo cromatográfico.

50

**[0030]** Así, de acuerdo con una realización ventajosa de la invención, el extracto peptídico tiene un pH entre 4 y 7, y preferiblemente entre 5 y 6, un extracto seco titulando entre 2 y 5 g/l, y de manera preferida entre 3 y 4 g/l, su contenido en compuestos de naturaleza peptídica está comprendido entre 1,5 y 4 g/l, y preferiblemente entre 2 y 3 g/l, y su contenido en azúcares es de 0,5 a 1 g/l .

55

**[0031]** De acuerdo con una segunda realización de la invención, el extracto solubilizado se puede encapsular o colocar en un vector cosmético o farmacéutico como los liposomas o cualquier microcápsula utilizada en el campo de la cosmética, o adsorbido sobre polímeros orgánicos pulverulentos, soportes minerales como los talcos y bentonitas, y más generalmente solubilizado en, o fijado sobre, cualquier vector fisiológicamente aceptable.

60

**[0032]** Así, el extracto solubilizado se utiliza en las composiciones según la invención en una concentración comprendida entre 0,001% y aproximadamente 5%, y preferiblemente a una concentración comprendida entre 0,01% y 1% aproximadamente con respecto al peso total de la composición final.

65

**[0033]** Preferiblemente, la composición utilizada según la invención se presenta en una forma adaptada a la aplicación tópica.

5 **[0034]** La composición utilizada según la invención puede en particular consistir en una composición para cuidado del cabello, y especialmente un champú, un acondicionador, una loción de fijación del cabello, una loción tratante pre- o post-tratamiento agresivo para el cabello, crema o gel de peinado, una loción reestructurante para el cabello, una máscara, espuma tratante, etc.

10 **[0035]** La composición podrá estar especialmente en forma de crema, emulsión aceite-en-agua, agua en aceite o emulsiones múltiples de tipo aceite-en-agua-en-aceite o de agua-en-aceite-en-agua, suspensión, gel acuoso, soluciones acuosas, soluciones hidro-alcohólicas u oleosas. La composición puede ser más o menos fluida y puede estar en la forma de una crema blanca o coloreada, una pomada, una leche, una loción, un suero, una espuma, un bifase, o también en forma de un aerosol.

15 **[0036]** Finalmente, la composición puede comprender cualquier aditivo utilizado habitualmente en el campo de aplicación contemplado así como los aditivos necesarios para su formulación, tales como co-disolventes (etanol, glicerol, alcohol bencílico, humectante ...), espesantes, diluyentes, emulsionantes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes de olor, aceites esenciales, oligoelementos, ácidos grasos esenciales, surfactantes, polímeros formadores de película, filtros químicos o minerales, agentes hidratantes o aguas termales, etc. Se puede, por ejemplo, citar los polímeros solubles en agua de tipo polímero natural, tales como los polisacáridos o polipéptidos, derivados celulósicos de tipo metilcelulosa o hidroxipropilcelulosa, o también polímeros sintéticos, polaxámeros, carbómeros, PVA o PVP, y especialmente los polímeros vendido por la sociedad ISP.

20 **[0037]** En todos los casos, el experto en la materia se asegurará de que estos adyuvantes así como sus proporciones se seleccionen de forma que no perjudiquen las propiedades ventajosas investigadas de la composición según la invención. Estos adyuvantes pueden, por ejemplo, corresponder a 0,01 a 20% del peso total de la composición. Cuando la composición según la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar de 5 a 80% en peso, y preferiblemente de 5 a 50%, con respecto al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizados en la composición serán seleccionados entre los clásicamente utilizados en el campo considerado. Por ejemplo, se pueden utilizar en una proporción que va de 0,3 a 30% en peso con respecto al peso total de la composición.

25 **[0038]** Por otra parte, la composición usada según la invención puede comprender además al menos un compuesto para mejorar el crecimiento y/o la salud de los cabellos.

30 **[0039]** Se pueden mencionar especialmente vitaminas, otros hidrolizados peptídicos vegetales, el minoxidil, ésteres de ácido nicotínico, oligoelementos, agentes anti-inflamatorios, ácido retinoico o sus derivados, retinol, inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa o compuestos peptídicos originados por síntesis química. Como ejemplos de vitaminas se pueden citar las vitaminas A, E, B5, B6, C, H, o PP; como ejemplo de oligoelementos se puede citar zinc, cobre, magnesio o silicio.

35 **[0040]** Una forma de realización particular de la invención se refiere al uso de una composición que comprende además el hidrolizado peptídico de arroz no fermentado, un hidrolizado peptídico de soja. Ensayos realizados sobre biopsias de piel mostraron el efecto protector de esta asociación de extractos contra la radiación UV, y estos resultados se pueden extrapolar y aplicar a las células de la vaina externa de la raíz u ORS.

40 **[0041]** Por último, la composición utilizada según la invención está comprendida entre 10 y 90% de un hidrolizado de arroz no fermentado, y entre 10 y 90% de un hidrolizado de soja. Preferiblemente, la composición comprende respectivamente 90% de hidrolizado de arroz sin fermentar y 10% de hidrolizado de soja. Los hidrolizados de arroz y soja se pueden obtener por separado y después incorporarse en la composición, o ser realizados al mismo tiempo en un solo y único hidrolizado, este único hidrolizado siendo a continuación incorporado en la composición.

45 **[0042]** También se describe un procedimiento de tratamiento no terapéutico para frenar, limitar la caída de los cabellos y/o estimular su crecimiento, caracterizado porque se aplica diariamente sobre la zona del cuero cabelludo a tratar una composición como se ha descrito anteriormente.

50 **[0043]** También se describe un procedimiento de tratamiento no terapéutico destinado a proteger las células madre adultas foliculares, así como su microambiente específico por aplicación diaria sobre la zona del cuero cabelludo a tratar de una composición como se describe anteriormente.

55 **[0044]** También se describe un procedimiento de tratamiento no terapéutico destinado a evitar el encanecimiento del cabello, especialmente el foto-envejecimiento, por aplicación diaria sobre la zona del cuero cabelludo a tratar de la composición como se describe anteriormente.

5 **[0045]** Como se dijo anteriormente, el envejecimiento de los cabellos se manifiesta, antes de su desaparición a veces completa, por la disminución de la densidad capilar, la miniaturización de los folículos capilares, la rarefacción y el adelgazamiento del cabello y finalmente el encanecimiento que  
 10 acaba en la canicie. Además, la composición que comprende el hidrolizado como se describió anteriormente ha mostrado que podía limitar el fenómeno natural de envejecimiento de cabello gracias a la conservación de las células madre especialmente, y su microambiente específico. Además, el uso de la  
 15 composición para prevenir el daño causado por la radiación UV ha demostrado su interés en la prevención del fotoenvejecimiento. Así, por ejemplo, el hidrolizado podría utilizarse ventajosamente en una composición como agente fotoprotector y, más particularmente, como un agente fotoprotector llamado "secundario". En efecto, se distingue los agentes fotoprotectores primarios de los agentes fotoprotectores secundarios. Los agentes fotoprotectores primarios son sustancias que ejercen un poder físico: son capaces de absorber la radiación UV y devolverla en forma de calor para proteger la piel y los tegumentos. Los agentes fotoprotectores secundarios son sustancias que generalmente tienen un efecto biológico; son, por ejemplo, agentes capaces de limitar el daño al ADN y a las membranas celulares por la penetración de la radiación UV.

20 **[0046]** También se describe un proceso de tratamiento no terapéutico destinado a evitar daños y proteger el cabello y el tallo capilar de las agresiones externas, gracias a la aplicación de una composición de acuerdo con la invención, y esto antes de la exposición al sol, a productos químicos o fuentes de calor tales como coloraciones, alisados, permanentes, o cepillados. Se entiende por "agresiones externas" las agresiones que puede producir el ambiente. Los ejemplos incluyen agresiones tales como la contaminación, los rayos UV, o los productos irritantes tales como productos de coloración, decoloración, alisado, tensioactivos, conservantes o perfumes. Por contaminación, se entiende tanto la contaminación "exterior" debida por ejemplo a las partículas de diesel, al ozono o a los metales pesados, como la contaminación "interior" que puede ser debida especialmente a las emisiones de disolventes de pinturas, de colas, o de papel pintado (tales como tolueno, estireno, xileno o benzaldehído), o incluso el humo del cigarrillo. Es conocido, especialmente por los profesionales de la peluquería que, por ejemplo, los tratamientos químicos atacan el tallo capilar y que, por lo tanto, el uso de un tratamiento previo de cuidado del cabello permite proteger el cabello y el cuero cabelludo. Para este propósito, el uso de una composición que comprende un extracto peptídico de arroz no fermentado permite, por tanto, tener una acción preventiva y de protección.

35 **[0047]** Otras características y ventajas de la invención se pondrán mejor de manifiesto con la lectura de los ejemplos dados a título ilustrativo y no restrictivo.

#### **Ejemplo 1 : Procedimiento de preparación de un extracto peptídico de arroz no fermentado**

40 **[0048]** El extracto utilizado según la invención se obtiene de plantas de la especie *Oryza sativa L.* Por supuesto, el extracto se puede preparar a partir de plantas de al menos una cualquiera de las muchas variedades y especies pertenecientes al género *Oryza*.

45 **[0049]** En una primera etapa, se tritura 1 kg de granos de arroz descascarillado en un molino de grano. La harina obtenida se deslipidizó por la acción de un disolvente orgánico, el hexano. Después de filtración y secado al vacío, el polvo obtenido se suspende en una solución acuosa alcalina (dilución 1/10) pH 10 que contiene 1% de polivinilpirrolidona (PVPP, Polyclar V ISP). Esta mezcla se agita durante un tiempo suficientemente largo para permitir la solubilización de las fracciones solubles. La temperatura de extracción es variable (entre 4 y 80°C); pero preferiblemente la operación se realizará en frío. Después de esta fase de extracción, el medio se clarifica por centrifugación y después se filtra a través de filtro de placa. Este filtrado que contiene las fracciones solubles del arroz se somete entonces a una precipitación de las proteínas mediante la variación de la fuerza iónica en medio neutro o ácido, lo que permite eliminar los componentes de hidratos de carbono solubles, los lípidos y los ácidos nucleicos. El pH del medio se lleva entonces a 3,5. El sobrenadante se elimina y después el precipitado se lava con un disolvente tal como, por ejemplo, etanol o metanol. Por último, se evapora el disolvente mediante secado al vacío.

55 **[0050]** En esta etapa, se obtiene alrededor de 50 gramos de polvo de color amarillo claro de extracto proteico bruto que contiene:

- 60 - Proteínas : 75 %
- Glúcidos : 20 %
- Lípidos : 5 %

**[0051]** El precipitado rico en proteínas se vuelve a disolver en agua o en otro disolvente.

65 **[0052]** El extracto proteico bruto se somete entonces a una serie de hidrólisis preparadas y selectivas que consiste en hidrólisis químicas y enzimáticas en presencia de 0,5% de PVPP (Polyclar V) y

endopeptidasas de cisteína (papaína, ficina). Después de la reacción, el hidrolizado se filtra sobre placa y a continuación sobre cartucho esterilizante (0,2 mm).

5 **[0053]** Se obtiene entonces un hidrolizado de color claro, titulando de 15 a 30 g/l de extracto seco, que se diluye a continuación, de manera que la concentración en compuestos de naturaleza peptídica como se determina por el método de Lowry, sea entre 0,1 y 5 g/l, y preferiblemente entre 0,5 y 2 g/l.

10 **[0054]** Se procede después a una ultrafiltración de la solución sobre un cartucho de filtro Millipore Helicon (umbral de corte; 6 kDa). Los altos pesos moleculares contenidos en el material retenido se descartan, el filtrado se conserva. Después de análisis, en particular, por HPLC, se constata que el extracto contiene aproximadamente 80% de compuestos peptídicos de tamaño inferior a 6 kDa.

15 **[0055]** Otro método alternativo para obtener el extracto consiste en llevar a cabo una purificación del extracto obtenido anteriormente por cromatografía de intercambio iónico en una columna de gel TSK (TosoHaas) con un tampón de fosfato de pH 7.

**[0056]** El extracto obtenido de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 se disuelve a continuación en glicerol.

20 **Ejemplo 2 : Procedimiento de preparación de una mezcla de un extracto peptídico de arroz no fermentado y de un extracto peptídico de soja**

25 **[0057]** La harina de arroz y la torta de soja se disuelven previamente, en respectivas proporciones de 90:10, en 20 volúmenes de agua ajustados a un pH entre 8,0 y 8,5. Después del ajuste del pH, se añade en el medio de reacción 2% de bromelina, 2% de Alcalase® y 2% de POLYCLAR® 10 (polivinilpirrolidona - PVPP -insoluble). A continuación se calienta el medio de reacción durante dos horas a 50°C y luego se desactiva durante dos horas a 80°C. Una etapa de filtración permite recuperar el filtrado compuesto de 20 a 25 g/l de materia seca, de 18 a 22 g/l de proteínas y de 2 a 3 g/l de azúcares.

30 **[0058]** La naturaleza proteica de este filtrado se pone de relieve por electroforesis sobre gel de poliacrilamida. Para este análisis, se utilizan geles NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El extracto proteico intermedio de arroz - soja se calienta a 70°C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturalizantes en un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. Una solución de NuPAGE® antioxidante se añade en la cubeta interna (cátodo) para evitar que las proteínas reducidas se reoxiden durante la electroforesis. La migración de las proteínas se lleva a cabo usando tampón de migración NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador de peso molecular. La coloración de las proteínas se realiza utilizando Azul de Coomassie® R-250. El perfil proteico obtenido evidencia una distribución de pesos moleculares comprendida entre 15 y 3 kDa.

40 **[0059]** El extracto proteico intermedio de arroz- soja obtenido previamente se purifica entonces por filtraciones sucesivas utilizando placas de filtro Seitz-Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 mm) para obtener una solución de color amarillo pálido brillante y clara . En esta etapa, el extracto de arroz - soja se caracteriza por un seco de 20-24 g/kg, un contenido de proteínas de 18 a 21 g/l y un contenido de azúcares de 1 a 3 g/L.

45 **[0060]** Esta solución se purifica luego eliminando las proteínas de peso molecular mayor de 5 kDa usando filtraciones de flujo tangencial.

50 **[0061]** Para esto, la solución de arroz - soja se bombea bajo presión a través de un soporte Pellicon® equipado de cassette Pellicon® 2 Biomax 10 kDa. Este primer filtrado se recoge para ser posteriormente filtrado a través de otro casete Pellicon® 2 Biomax 3 kDa. Al final de la purificación, se obtiene un extracto vegetal de arroz - soja de color amarillo pálido, brillante y claro. Se caracteriza por un seco 17-20 g/kg, un contenido en proteínas de 15 a 18 g/l y un contenido de azúcares entre 1 y 2 g/L.

55 **[0062]** Esta solución se analiza a continuación mediante cromatografía líquida de alta presión con ayuda de un aparato HP1100 pilotado por el software ChemStation. La columna utilizada durante la elución del extracto de arroz - soja es una Nucleosil 300-5 C4 NMP (125 x 4 mm). Esta columna permite cromatografiar proteínas que tienen pesos moleculares de 0,2 a 25 kDa (en un gradiente de disolventes adecuados). En estas condiciones cromatográficas, se aislaron varias fracciones peptídicas. Estas diversas fracciones se analizaron por espectrometría de masas para identificar sus picos moleculares. Se realizó igualmente la determinación de la composición en aminoácidos. Esta se obtiene después de la hidrólisis ácida y la identificación por cromatografía líquida de alta presión con ayuda de una pre-derivación al PICT (isotiocianato de fenilo).

65

**Ejemplo 3 : Acción del extracto peptídico de arroz no fermentado sobre folículos mantenidos en cultivo *in vitro***

**3.1 Marcado de la Queratina K15**

Cultivos de folículos pilosos e inclusión de cortes

[0063] Se cultivan biopsias de piel (obtenidas de estiramientos faciales) que presentan cabellos de la misma manera que explantes de piel. Se realizan biopsias de 6 mm mediante punción de biopsias y se cultivan sobre insertos en un medio WILLIAM E. en presencia de antibióticos (penicilina 100 U/ml -10 mg, estreptomycin, 10 µg/ml, insulina 10 nG/ml, hidrocortisona y 2 mmol/L de L-glutamina).

[0064] Los explantes de piel se colocan en placas de 6 pocillos y los folículos se tratan o no poniendo 20 ml de extracto al 1% en contacto sobre las biopsias, después de 48 horas de cultivo. Al final del experimento, las biopsias se ponen en casete y se sumergen en una mezcla de formalina al 10% durante 2 horas en un aparato automatizado (VIP). El revestimiento de las células utilizando parafina se prepara por una serie de baños de alcohol (a concentración y tiempo crecientes), seguido de 2 baños de xileno y, finalmente, de un baño de parafina. La duración total de esta serie de operaciones es de una docena de horas. Las biopsias así revestidas se colocan después en casetes adecuados, orientados y colocados en un bloque de parafina para luego cortarse a 4 mm por un microtomo. Las secciones parafinadas son luego desparafinadas y rehidratadas antes de poner el anticuerpo. Para ello, se realizan a este efecto una serie de baños de xileno, seguida de una serie de baños de alcohol (a concentración y tiempo crecientes) y de un enjuagado en agua, después en PBS.

Inmunomarcado de la Queratina K15

[0065] Los cortes desparafinados se enjuagan con PBS durante 2 minutos, a continuación se rodean y se incuban cada corte en 100 ml de BSA al 5% durante 30 minutos. Después, se añaden 100 ml de anticuerpo primario Cytokératine K15 (Abcam, Ratón monoclonal) y se someten a agitación durante 60 minutos en cámara húmeda. Después de enjuagar con PBS durante 30 minutos, se añaden 100 ml de un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y se dejan durante 1 hora en oscuridad con agitación en cámara húmeda. Estos marcados se realizan en paralelo sobre biopsias tratadas o no con el extracto peptídico activo. Las láminas se enjuagan entonces en PBS, se montan entre portaobjetos y cubreobjetos en el Aquatex, y la observación se realiza mediante microscopio de epifluorescencia.

Resultados

[0066] Con un software de cuantificación de la fluorescencia, se constata un aumento del orden del 95,3% de la queratina K15 en los folículos pilosos tratados con el extracto activo en comparación con los folículos no tratados. Además, la queratina K15 está implicada en las etapas precoces de diferenciación de los queratinocitos en los folículos pilosos.

**3.2 Marcado de la integrina α6**

[0067] Con el fin de lograr un marcado de la integrina α6 en los folículos pilosos, se realizan biopsias de estiramientos faciales como se describe en el Ejemplo 3.1. Los explantes de piel se colocan en placas de 6 pocillos y los folículos se tratan o no poniendo 20 ml de extracto activo en contacto sobre las biopsias, después de 48 horas de cultivo. A continuación, para preparar el marcado por anticuerpos, los cortes no son parafinados sino que se colocan en OCT (temperatura de corte óptima) y se cortan al criostato (sección congelada). Las biopsias se toman entonces y se incluyen en OCT que se solidifica con frío (-20°C), y los bloques así solidificados se cortan después al criotomo donde se hacen cortes de 6 mm. Los cortes se recogen sobre lamas de observación poli-lisinas. Los cortes con el OCT se ponen a temperatura ambiente antes de ser utilizado para el inmunomarcado.

Inmunomarcado de la integrina α6

[0068] Las láminas montadas en OCT se secan en horno a 37°C durante 30 minutos y luego los cortes se fijan en un baño de acetona (conservado de antemano a -20°C) durante 10 minutos. Las láminas se aclaran en PBS durante 5 minutos y luego los cortes se protegen por la pluma Pappen. Los cortes se saturan mediante la adición de BSA al 5% durante 30 minutos y luego se realiza el marcado con el anticuerpo primario como se ha descrito anteriormente. El marcado se realiza con un anticuerpo anti-integrina α6 (Tebu Santa Cruz, ratón monoclonal). Este primer marcado es seguido por un marcado secundario con un anticuerpo marcado con fluorescencia. El montaje de la lámina en un medio adecuado y luego la lectura a través de un microscopio de epifluorescencia permitirán apreciar la intensidad del marcado. Este marcado se lleva a cabo en paralelo sobre biopsias tratadas o no con el extracto activo con el fin de evaluar el efecto de este último en dichas biopsias.

Resultados

5 **[0069]** El tratamiento de los folículos por el extracto peptídico obtenido del arroz no fermentado permite aumentar fuertemente la cantidad de integrina  $\alpha 6$ . Se constata un aumento de 108% de la cantidad de integrina  $\alpha 6$  respecto a los folículos sin tratar. Además, se sabe que la integrina  $\alpha 6$  es uno de los marcadores potenciales de las células madre foliculares.

**3.3 Marcado de la  $\beta$ -catenina**

10 **[0070]** El mismo protocolo (como el descrito en el Ejemplo 3.2) se utilizó para realizar un marcado de la  $\beta$ -catenina (anticuerpo primario anti-beta-catenina Abcam seguido por un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia) y, aquí también, se constata un aumento del marcado de la  $\beta$ -catenina en los folículos tratados con el extracto peptídico en comparación con los folículos no tratados. Además, se sabe que la  $\beta$ -catenina desempeña un papel clave en la diferenciación y el crecimiento del folículo piloso.

**3.4 Marcado de la proteína p63**

15 **[0071]** El mismo protocolo que el descrito en el Ejemplo 3.2 se utilizó para realizar un etiquetado de la proteína p63 utilizando un anticuerpo primario anti-p63, monoclonal de ratón TEBU Santa Cruz. El etiquetado con el anticuerpo primario es seguido de un etiquetado secundario con un anticuerpo marcado con fluorescencia. El montaje de la lámina en un medio adecuado y luego lectura a través de un microscopio de epifluorescencia permitirán apreciar la intensidad del etiquetado. Este marcado se lleva a cabo en paralelo sobre biopsias tratadas o no con el extracto activo con el fin de evaluar el efecto de este último sobre dichas biopsias.

Resultados :

20 **[0072]** Los folículos tratados durante 48 horas con el extracto peptídico presentan un marcado de la proteína p63 muy aumentado en comparación con los folículos no tratados. De hecho, gracias a una cuantificación de la fluorescencia por un programa adaptado, hay un aumento de 13,6% del marcado p63 en los folículos tratados. Sin embargo, se sabe que la proteína p63 es un marcador de las células madre foliculares ligado a la capacidad de estas células para generar un folículo piloso.

**3.5 Conclusiones**

25 **[0073]** Los 4 marcados hechos sobre las biopsias de cabellos nos han permitido demostrar que el tratamiento de los folículos pilosos por el extracto peptídico de arroz no fermentado permitía:

- 30 - aumentar la cantidad de proteínas que son marcadores de las células madre foliculares;
- 35 - en consecuencia, promover el microambiente de las células madre y así su protección;
- 40 - y por último favorecer la diferenciación y por lo tanto la entrada en fase anágena de las células madre foliculares para estimular al máximo el crecimiento de los cabellos y/o frenar su caída.

**Ejemplo 4 : Acción del extracto peptídico sobre los folículos en presencia de UV**

45 **[0074]** Se cultivan biopsias de piel (obtenidas de estiramientos faciales) que presentan cabellos de la misma manera que explantes de piel. Se realizan biopsias de 6 mm mediante punción de biopsias y se cultivan sobre insertos en un medio WILLIAM E. en presencia de antibióticos (penicilina 100 U/ml -10 mg, estreptomycin, 10  $\mu$ g/ml, insulina 10 nG/ml, hidrocortisona y 2 mmol/L de L-glutamina).

50 **[0075]** Los explantes de piel se depositan en placas de 6 pocillos y los folículos se tratan poniendo 20 ml de extracto de 1% en contacto sobre las biopsias durante 24 horas. Las biopsias se someten luego a irradiación UVA a 5 J/cm<sup>2</sup>, seguida de una irradiación UVB a 200 mJ/cm<sup>2</sup>, y finalmente vuelven a poner durante otras 24 horas en presencia del extracto activo. Cajas de control con explantes no tratados por el extracto peptídico activo pero irradiado sirven de testigo. Una evaluación del estado de las células después de la irradiación UV se realiza por un marcado de hematoxilina/eosina.

Resultados

60 **[0076]** La forma general de la vaina externa de la raíz (ORS) es irregular en los folículos que no han sido pre-tratados y tratados con el extracto peptídico, mientras que es completamente regular en los folículos tratados. Además, las células de los folículos pilosos no tratados muestran daño debidos a los rayos UVA y UVB daño, tales como la aparición de vesículas, edemas y células apoptóticas. Todas estas manifestaciones no se observan en los folículos tratados pretratados y tratados por el extracto peptídico.

65 Por lo tanto, se deduce un papel protector de este extracto peptídico de arroz no fermentado sobre los folículos pilosos y, entre otros, sobre las células madre de estos folículos.

**Ejemplo 5 : Acción del hidrolizado peptídico sobre el crecimiento de los folículos**

Mediciones de la elongación de los folículos

5 [0077] Se rasuran biopsias de piel obtenidas de estiramientos faciales, y después se cultivan en un medio adecuado (medio Wiliam E.) en presencia o no del hidrolizado peptídico activo a una concentración de 1%. En ausencia de principio activo, los folículos se cultivan en PBS. Se realizan fotos utilizando la Vivacam (pequeña cámara montada en el VivaScope) en el tiempo cero. Las biopsias se vuelven a cultivar y se realizan mediciones de alargamiento de los folículos pilosos en los días 8, 14 y 21.

10 [0078] Las imágenes en diferentes momentos se vuelven a continuación a procesar por el software "Image Pro Analyzer®" que nos permite medir el tamaño (en mm) de cada folículo por separado. Se mide el alargamiento global de los folículos tratados y no tratados y se lleva a cabo un estudio estadístico y se recoge en el gráfico de la Figura 1.

15 Resultados :

20 [0079] Al final de este ensayo, se constata que la aplicación del hidrolizado peptídico de arroz no fermentado tiene una acción sobre el crecimiento del cabello. De hecho, ha permitido un crecimiento del folículo piloso de una manera más importante con respecto al crecimiento observado en los folículos sin tratar.

**Ejemplo 6 : Puesta en evidencia de la acción protectora de una mezcla de un extracto peptídico de arroz no fermentado con un extracto peptídico de soja sobre células de biopsias de piel sometidas a rayos UVB**

30 [0080] El propósito de este experimento es medir las capacidades de reparación de una mezcla que comprende un extracto peptídico de arroz no fermentado en asociación con un extracto peptídico de soja (en lo sucesivo denominado extracto de arroz/soja) después de la irradiación con radiación UVB de biopsias de piel humana. Se ha demostrado anteriormente que los resultados que se obtendrán en las células de biopsias de piel pueden correlacionarse con los que se obtendrán en las células del ORS. La radiación UV, especialmente UVB, causa reacciones de dimerización que tienen lugar en los sitios que comprenden dos pirimidinas adyacentes (timidina, citosina). Se forman entonces varios tipos de fotoproductos, incluyendo dímeros de ciclobutano-pirimidina o DCPs. Sin embargo, se sabe que cuando una célula se expone a estrés genotóxico, su ciclo de división se detiene temporalmente para permitir la reparación del ADN y evitar así la aparición de mutaciones en las siguientes generaciones de células. La proliferación celular sólo reaparece después. Si la frecuencia o la cantidad de los daños es demasiado alta, o la reparación ineficaz, las células entran en un proceso de muerte programada, la apoptosis. Este tipo de fenómeno se observa en las células de los folículos pilosos y conduce a la muerte de los cabellos o a su pérdida de espesor. Por lo tanto, mediante la medición por inmunomarcado, usando un anticuerpo anti-DCPs, de la cantidad de fotoproductos formados, es posible evaluar la eficacia de un compuesto que tiene una acción reparadora sobre el ADN de las células.

Protocolo de inmunomarcado de los DCP sobre biopsias de piel sometidas a UVB

45 [0081] Se ponen en cultivo biopsias de piel humana en la interfase aire / líquido y se pre-tratan con el extracto de arroz / soja al 1% durante 24 horas, o con el placebo (PBS) para la condición de control. Estas biopsias se someten a irradiación con radiación UVB a 200 mJ/cm<sup>2</sup>. Después de la irradiación, las biopsias se recolocan en cultivo durante 24 horas con solamente la aplicación de PBS (es decir, sin activo).

55 [0082] Para el marcado de los dímeros ciclobutano-pirimidina, se incluyen en parafina biopsias de la piel, y se realizan cortes histológicos de espesor 3 mm. Los portaobjetos se desparafinan, se rehidratan y después se someten a un inmunomarcado por un anticuerpo dirigido contra los dímeros ciclobutano-pirimidina (MBL D194-1, monoclonal de ratón) y luego por un anticuerpo secundario adecuado (Invitrogen A21202) acoplado a un marcador fluorescente. Las secciones de piel se examinan al microscopio de Epi-fluorescencia (Nikon Eclipse 80i microscopio E).

60 [0083] En la condición de control, la fluorescencia observada es más intensa cuando las biopsias han sido sometidas a la radiación UVB. En la condición ensayada con pretratamiento con el extracto de arroz / soja, se observa una fluorescencia mucho menos intensa que en la condición de control con UVB.

Conclusiones :

65 [0084] El extracto de arroz / soja ha permitido una mejor protección de las biopsias de piel, ya que se observan menos daños de tipo DCP en las biopsias pretratadas por dicho extracto. Podemos extrapolar

estos resultados y concluir que el extracto de arroz / soja según la invención tendría los mismos efectos sobre las células de las ORS y las protegería de la radiación UV.

**Ejemplo 7 : Preparación de composiciones**

5

1. Suero para el crecimiento de los cabellos

10

**[0085]** Dispersar el Natrosol 250HHR y el EDTA disódico en agua con agitación. Calentar a 50-60°C, y agitar hasta obtener una apariencia uniforme. Añadir Styleze®CC-10 y agitar hasta que obtener una apariencia uniforme. Enfriar a temperatura ambiente y añadir los ingredientes en el orden de la lista con agitación hasta obtener una apariencia uniforme entre cada uno.

Formulaciones		Nº 1	Nº 2	
Nombre INCI	Nombre Comercial	% másico	% másico	Proveedor
Agua		Q.S.	Q.S.	
Hidroxietilcelulosa	Natrosol 250HHR	0,35	0,50	Hercules /Aqualon
EDTA disódico	Dissolvine NA-25	0,05	0,05	Akzo Nobel
VP/DMAPA Acrilatos Copolímeros	Styleze® CC-10	5,00	5,00	ISP
Quaternium-26	Ceraphyl® 65	1,00	1,00	ISP
Pantenol	Ritapan DL	0,15	0,15	RITA
Propilenglicol Diazolidinil Urea, Yodopropinil Butilcarbamato	Germall® Plus Líquido	0,50	0,50	ISP
	Hidrolizado según el Ejemplo 2	1,00	1,00	ISP
Total		100,00	100,00	

15

**[0086]** Aplicar el producto sobre el cuero cabelludo húmedo. Masajear para distribuir uniformemente el producto. El suero favorece el crecimiento y/o el recrecimiento de los cabellos haciéndolos a la vez más vigorosos.

20

2. Leche de tratamiento anticaída de cabellos

25

**[0087]** Poner el agua en un recipiente adecuado y comenzar la agitación. Añadir el Gafquat 755N y el Germall Plus Líquido y agitar hasta obtener un aspecto uniforme. Añadir el RapiThix A-60 y agitar hasta obtener un aspecto uniforme (aproximadamente 15 minutos). Añadir el hidrolizado según el ejemplo 1 y agitar hasta obtener un aspecto uniforme. Colocar el producto en un vaporizador sin aerosol equipado de una bomba Calmar pump Mark VI WL31.

Formulaciones		Nº 1	Nº 2	
Nombre INCI	Nombre Comercial	% másico	% másico	Proveedor
Agua desionizada		Q.S.	Q.S.	
Polyquaternium-11	Gafquat® 755N	1,25	2,00	ISP
Propilenglicol Diazolidinil Urea, Yodopropinil Butilcarbamato/	Germall® Plus Líquido	0,50	0,50	ISP
Poliacrilato de Sodio Polideceno Hidrogenado Trideceth-6/	RapiThix™ A-60	0,50	0,50	ISP
	Hidrolizado según el Ejemplo 1	0,1	0,5	ISP
Total		100,00	100,00	

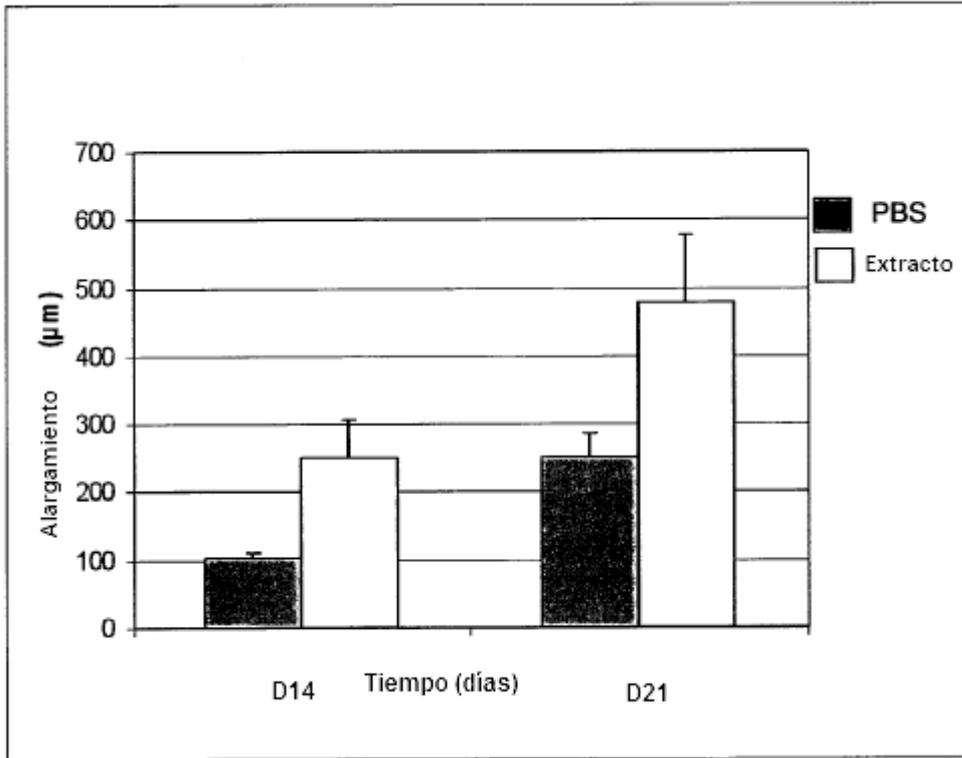
30

**[0088]** El producto está concebido para ser vaporizado sobre el cuero cabelludo y sobre cabellos húmedos. Masajear para repartir el producto de manera uniforme. La leche así propuesta permite luchar contra la caída del cabello mientras que lo hace liso y fácil de peinar.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización cosmética de una composición que comprende al menos un hidrolizado peptídico de arroz no fermentado que proviene de la hidrólisis de las proteínas de los granos de arroz desembarazados de su envuelta por una etapa de descascarillado, que comprende al menos 70% de péptidos de tamaño inferior a 6 kDa, como agente activo para frenar, limitar la pérdida de cabello y/o estimular su crecimiento aumentando la cantidad de proteínas marcadoras de las células madre adultas foliculares y favoreciendo la diferenciación de estas células.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, para activar el crecimiento de las pestañas.
3. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** los granos provienen de la especie de arroz *Oryza sativa L.*
- 15 4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el hidrolizado está solubilizado en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables seleccionados entre agua, glicerol, etanol, propilenglicol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos, o cualquier mezcla de estos disolventes.
- 20 5. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el hidrolizado solubilizado comprende al menos entre 1,5 a 4 g/l de péptidos, y preferiblemente al menos entre 2 y 3 g/l de péptidos.
- 25 6. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** el hidrolizado comprende al menos 85% de péptidos de tamaño inferior a 6 kDa.
- 30 7. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el hidrolizado solubilizado se utiliza en una cantidad que representa de 0,001% a 5% del peso total de la composición y preferentemente en una cantidad que representa de 0,01% 1% del peso total de la composición.
- 35 8. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la composición se presenta en una forma adecuada a la aplicación por vía tópica.
- 40 9. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la composición comprende además un compuesto seleccionado entre vitaminas, otros hidrolizados peptídicos vegetales, minoxidil, ésteres del ácido nicotínico, oligoelementos, agentes anti-inflamatorios, ácido retinoico o sus derivados, retinol, inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa o compuestos peptídicos derivados de la síntesis química.
- 45 10. Utilización según la reivindicación 9, **caracterizada porque** la composición comprende un hidrolizado peptídico de soja.
- 50 11. Utilización según la reivindicación 10, **caracterizada porque** el extracto peptídico de arroz no fermentado y el extracto peptídico de soja están presentes en concentraciones comprendidas entre 10 y 90%.



**Figura 1: Elongación de los folículos pilosos en presencia o no del extracto peptídico de arroz no fermentado**