

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 832**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/64** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

**A61Q 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2011 PCT/FR2011/000374**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12001246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2011 E 11744031 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2588075**

54 Título: **Uso de un extracto peptídico de guisante como agente activo antioxidante en una composición cosmética**

30 Prioridad:

**01.07.2010 FR 1002788**

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

**17.04.2018**

73 Titular/es:

**ISP INVESTMENTS INC. (100.0%)  
1101 Centre Road Suite 315  
Wilmington, DE 19805, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 663 832 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 extracto peptídico de guisante como agente activo antioxidante en una composición cosmética

5 **[0001]** La presente invención se encuentra dentro del campo de las composiciones cosméticas y farmacéuticas aplicadas al cabello. La presente invención se refiere a la utilización de un hidrolizado peptídico de guisante como agente activo antioxidante, así como varios métodos de tratamiento no terapéutico utilizando una composición que comprende dicho extracto.

10 **[0002]** Los cabellos son anexos queratínicos, al igual que el vello, las pestañas, las cejas y también las uñas. Desempeñan una función fisiológica de protección del cuero cabelludo, pero sobre tienen una función social desde hace ya tiempo en la historia de la humanidad. Los cabellos pueden ser de distinta naturaleza: largos, cortos, lisos, rizados... pero todos ellos obedecen a la ley del ciclo. De hecho, la totalidad de los 100 000 a 150 000 folículos pilosos que forman una cabellera «normal» se renuevan de forma cíclica, asincrónica y estocástica a partir de una reserva de células madre adultas foliculares.

15 **[0003]** El folículo piloso es un anexo cutáneo autónomo con su propio control hormonal, su propio ciclo y una estructura compleja y estable (Bernard B. A.; Medicina/Ciencias 2006; 22:138-43). El ciclo del cabello se compone de 3 fases: la fase anágena, la fase catágena y la fase telógena. La fase anágena, o fase de crecimiento del cabello, dura entre 3 y 7 años (varía según la edad, el sexo y la zona del cuero cabelludo). A esta fase le sigue una fase de reposo llamada catágena y que dura alrededor de 3 semanas. Al tener lugar procesos de apoptosis durante esta fase catágena, que provocan la caída del cabello, la fase siguiente, denominada telógena, permitirá que se forme un nuevo bulbo a partir de un germen piloso que iniciará el siguiente ciclo (Arouete J., J. Med. Esth. Et Chir. Derm., Sept. 2005, 119, 165-167). Esta fase telógena, por su parte, durará alrededor de 3 meses. En este sentido, en una cabellera «normal», alrededor del 85 % de los folículos está en fase de crecimiento, el 2 % en fase de reposo, y poco más del 10 % en fase de caída.

25 **[0004]** A menudo se menciona el envejecimiento de la piel o las agresiones que ésta sufre, pero las fibras queratínicas no se quedan atrás. De hecho, el conjunto de fibras queratínicas, y los cabellos en particular, sufren un gran número de agresiones por parte del medio ambiente, como los rayos UV, agresiones de corte químico provocadas por tratamientos aplicados en el cabello, como los tintes o las permanentes, agresiones causadas durante el secado, etc. Evidentemente, todas estas agresiones tienen un impacto importante en las células que componen el folículo piloso. Dichas células sufren fenómenos de oxidación y de envejecimiento prematuro causados por los radicales libres. La formación de estos radicales libres provoca daños a nivel celular, y estos daños pueden conducir a la muerte de la célula, también denominada apoptosis. Por ejemplo, se sabe que el peróxido de hidrógeno inhibe la síntesis de pigmentos, entre ellos la melanina, que es responsable del encanecimiento del cabello: con la edad, los niveles de enzimas que disocian el peróxido de hidrógeno en oxígeno y en agua disminuyen, y ésta última se agarra a la enzima tirosinasa responsable de sintetizar la melanina. El fenómeno de apoptosis en el caso de las células del folículo piloso se traduce en la aparición de vacuolas en las células que forman la vaina externa del folículo piloso, el aumento de ciertos marcadores, como la caspasa-3 o la catalasa, etc. Por tanto, actualmente se utilizan numerosas moléculas con el fin de limitar la formación de estos radicales libres; estas moléculas se denominan antioxidantes. Se trata, por ejemplo, de las vitaminas E, A, B6, B12, B5 o C, la cistina, el ácido fólico, el selenio, el zinc, el hierro, el cobre, el manganeso, los ácidos grasos de las familias omega 3 y 6, el ácido alfa lipoico, etc.

40 **[0005]** Existe siempre una necesidad, sobre todo en cosmética, de desarrollar nuevos tratamientos que presenten una actividad antioxidante y permitan limitar el impacto de las agresiones externas en el cabello.

45 **[0006]** De esta forma, la solicitante ha puesto de manifiesto el efecto antioxidante de un extracto peptídico de guisante en el cabello. Hasta entonces, los hidrolizados de guisante se habían utilizado como agente pigmentante (FR 2 904 556), o incluso como agente para descamar la capa córnea (JP09025225). De igual manera, se ha registrado una solicitud de patente en relación a un hidrolizado peptídico de guisante enriquecido con péptidos bioactivos de secuencia Ala-Gly-Glu-Leu-Ser con el fin de proteger la piel y reforzar la función barrera. Sin embargo, el uso de un extracto peptídico de guisante no enriquecido con péptidos bioactivos no ha sido descrito nunca como agente antioxidante para el cabello.

50 **[0007]** Por lo tanto, el primer objeto de la presente invención se refiere a la utilización de un hidrolizado peptídico de guisante como agente activo antioxidante en una composición cosmética destinada al cuidado del cabello.

**[0008]** Otro objeto de la presente invención se refiere, por una parte, a un método de tratamiento no terapéutico destinado a proteger al cabello del estrés oxidativo y, por otra parte, a proteger al cabello de las agresiones externas.

55 **[0009]** La presente invención está relacionada, por tanto, con la utilización de un hidrolizado peptídico de guisante como agente activo antioxidante en una composición cosmética destinada al cuidado del cabello.

**[0010]** Se entiende por «hidrolizado peptídico» un extracto que comprende una mezcla de compuestos mayoritariamente representados por péptidos u oligopéptidos. Según la invención, se utilizarán indistintamente los términos «hidrolizado peptídico», «extracto», «extracto solubilizado» o «agente activo».

5 **[0011]** Se entiende por «cabello» el conjunto de fibras queratínicas humanas, y más concretamente, los cabellos, las cejas, las pestañas, el pelo de barba y del bigote, el vello púbico y las uñas. Más concretamente, la invención se aplica al cabello y/o a las pestañas humanas.

10 **[0012]** La solicitante ha descubierto que un extracto peptídico de guisante presenta una cierta actividad en los folículos pilosos del cabello y, en particular, tiene un efecto como agente protector contra diversos tipos de agresiones externas gracias a su acción antioxidante. Así, la solicitante ha demostrado, con ayuda de tests *in vitro*, que el extracto según la invención reducía la cantidad de catalasa así como la cantidad de caspasa-3 escindida, es decir, activa. Se conoce en la técnica que la actividad de la catalasa se ve aumentada al someterse a estrés, sobre todo a UV. De esta forma, sirve a menudo como marcador de estrés y de formación de radicales libres en las células sometidas a agresiones externas (S. K. Katiyaer *et al.*, Carcinogenesis, vol.22, n.º2, pp. 287-294, 2001). Por lo que respecta a la caspasa-3, pertenece a la familia de las caspasas, familia que actualmente  
15 consta de 14 miembros. Las caspasas son cisteín-proteasas, que se clasifican dentro de la categoría de proteínas proapoptóticas. Así, la función de las caspasas es principalmente ejecutiva, es decir, se adhieren/se dedican a apagar las vías protectoras y a activar moléculas que participen en la destrucción celular. Todas las caspasas presentan una estructura muy conservada que comprende un prodominio N-.

20 **[0013]** Así, el primer objeto de la presente invención se refiere a la utilización de un hidrolizado peptídico de guisante como agente activo antioxidante solubilizado en una composición cosmética, donde dicho hidrolizado proviene de la hidrólisis de proteínas de la especie de guisante *Pisum sativum*, y que comprende al menos un 70 % de compuestos de naturaleza peptídica de tamaño inferior a 5 kDa, con el fin de proteger las fibras queratínicas elegidas del cabello, el vello, las cejas y las pestañas de los rayos UV o del estrés oxidativo provocado por la aplicación de tratamientos físicos o químicos, como tintes, alisados, permanentes o procesos  
25 de secado, mediante una actividad antioxidante a nivel de las células del folículo piloso.

**[0014]** Otro objeto de la presente invención se refiere, por una parte, a un método de tratamiento cosmético no terapéutico destinado a proteger las fibras queratínicas elegidas del cabello, el vello, las cejas o las pestañas de los rayos UV o del estrés oxidativo provocado por tratamientos físicos o químicos a escoger entre tintes, alisados, permanentes o procesos de secado, mediante una actividad antioxidante a nivel de las células del folículo piloso, caracterizado por la aplicación cotidiana o puntual, sobre las fibras queratínicas a tratar, de una composición en la que se encuentra un hidrolizado solubilizado que proviene de la hidrólisis de proteínas de la especie de guisante *Pisum sativum*, y que comprende al menos un 70 % de compuestos de naturaleza peptídica de tamaño inferior a 5 kDa.

35 **[0015]** La presente invención se refiere, por tanto, a la utilización de un hidrolizado peptídico de guisante como agente activo antioxidante en una composición cosmética destinada al cuidado del cabello.

**[0016]** Se entiende por «hidrolizado peptídico» a un extracto que comprende una mezcla de compuestos mayoritariamente representados por péptidos u oligopéptidos. Según la invención, se utilizarán indistintamente los términos «hidrolizado peptídico», «extracto», «extracto solubilizado» o «agente activo».

40 **[0017]** Se entiende por «cabello» el conjunto de fibras queratínicas humanas, y más concretamente los cabellos, las cejas, las pestañas, los pelos de la barba y del bigote, el vello púbico y las uñas. Más concretamente, la invención se aplica a los cabellos y/o a las pestañas humanas.

**[0018]** La solicitante ha descubierto que un extracto peptídico de guisante presenta una cierta actividad sobre los folículos pilosos del cabello y, en particular, tiene un efecto como agente protector contra distintos tipos de agresiones externas gracias a su actividad antioxidante. Así, la solicitante ha demostrado con ayuda de tests *in vitro* que el extracto según la invención reducía la cantidad de catalasa así como la cantidad de caspasa-3 escindida, es decir, activa. Se conoce en la técnica que la actividad de la catalasa se ve aumentada al someterse a estrés, sobre todo a UV. De esta forma, sirve a menudo como marcador de estrés y de formación de radicales libres en las células sometidas a agresiones externas (S. K. Katiyaer *et al.*, Carcinogenesis, vol.22, n.º2, pp. 287-294, 2001). Por lo que respecta a la caspasa-3, pertenece a la familia de las caspasas, familia que actualmente  
45 consta de 14 miembros. Las caspasas son cisteín-proteasas que se clasifican dentro de la categoría de proteínas proapoptóticas. Así, la función de las caspasas es principalmente ejecutiva, es decir, se dedican a desactivar las vías protectoras y a activar moléculas que participan en la destrucción celular. Todas las caspasas presentan una estructura muy conservada que comprende un prodominio N-. Para llevar a cabo la invención, es necesario en primer lugar extraer las proteínas implicadas y posteriormente hidrolizarlas, o bien efectuar la hidrólisis primero sobre un extracto bruto y purificar a continuación los fragmentos peptídicos. De igual manera, es posible  
50 utilizar ciertos extractos hidrolizados sin purificar los fragmentos peptídicos correspondientes a los péptidos  
55

biológicamente activos según la invención, pero asegurando aun así la presencia de dichos fragmentos mediante medios analíticos apropiados.

**[0019]** De acuerdo con la invención, se utilizan más concretamente semillas de guisante de la especie *Pisum Sativum* L. El término guisante designa también a la semilla, ya de por sí rica en proteínas (25 %).

5 **[0020]** Puede utilizarse cualquier método de extracción o de purificación conocido por el experto con el fin de preparar el hidrolizado de acuerdo con la invención.

**[0021]** En una primera etapa, las semillas se muelen con la ayuda de una trituradora de plantas. El polvo obtenido de esta manera puede ser ulteriormente “deslipadas” con la ayuda de un disolvente orgánico común (como, por ejemplo, un alcohol, hexano o acetona).

10 **[0022]** A continuación, se realiza la extracción de proteínas siguiendo el procedimiento habitual (Osborne, 1924) modificado; el triturado de plantas es puesto en suspensión en una solución alcalina que contiene un producto absorbente de tipo polivinilpirrolidina (PVPP) insoluble (0,01 – 20 %); en efecto se ha observado que las operaciones de hidrólisis y de purificación ulteriores se ven facilitados por este medio. En concreto, la concentración de sustancias de tipo fenólico, que interactúan con las proteínas, se ve notablemente reducida.

15 **[0023]** La fracción soluble, que contiene las proteínas, los glúcidos y en ocasiones lípidos, se recoge tras las etapas de centrifugación y filtración. Esta solución bruta se hidroliza a continuación en condiciones controladas para generar péptidos solubles. La hidrólisis se define como una reacción química que implica la división de una molécula por medio de agua, pudiendo darse esta reacción en un medio neutro, ácido o básico. De acuerdo con la invención, la hidrólisis se lleva a cabo por vía química y/o de manera ventajosa mediante enzimas proteolíticas. De esta forma, se puede citar la utilización de endoproteasas de origen vegetal (papaina, bromelina, ficina) y microorganismos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus*, etc.). Por los mismos motivos que los expuestos anteriormente, es decir, la eliminación de sustancias polifenólicas, se añade una cantidad de polivinilpirrolidina al medio reactivo durante esta etapa de hidrólisis controlada. Tras la desactivación térmica de las enzimas y la filtración, que permite la eliminación de las enzimas residuales y los polímeros, el producto  
20 filtrado (solución) resultante se purifica de nuevo con el fin de seleccionar los compuestos de naturaleza peptídica de bajo peso molecular. El fraccionamiento se puede llevar a cabo de manera ventajosa mediante la ultrafiltración y/o mediante un método de tipo cromatográfico.

**[0024]** En esta fase, el hidrolizado de guisante se caracteriza por poseer un peso seco de 70 a 80 g/kg, un índice de proteínas de 55 a 65 g/l, un índice de azúcar de 2 a 5 g/l y un contenido de polifenoles de 1 a 3 g/l.

30 **[0025]** El hidrolizado resultante de acuerdo con la invención se analiza cualitativa y cuantitativamente, mediante técnicas habituales muy conocidas por el experto, por sus características físico-químicas y su contenido en compuestos de naturaleza proteica y peptídica. De esta forma, el hidrolizado final está compuesto por péptidos de peso molecular inferior a 5 kDa.

35 **[0026]** A continuación, se procede a una fase de dilución en agua o en otra mezcla de disolventes que contengan agua. Así, el hidrolizado según la invención se solubiliza de manera ventajosa en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables, como agua, glicerol, etanol, propanediol, butilenglicol, dipropilenglicol, diglicoles etoxilados o propoxilados, polioles cíclicos o cualquier mezcla de dichos disolventes. El agente activo diluido se esteriliza a continuación mediante filtración estéril.

40 **[0027]** Tras esta etapa, el hidrolizado peptídico de guisante se caracteriza por poseer un contenido en compuestos peptídicos de 0,5 a 5 g/l y preferentemente al menos entre 2 y 3 g/l. Asimismo, tras los análisis cualitativos, parece que el hidrolizado contiene al menos un 70 % de compuestos de naturaleza peptídica de tamaño inferior a 5 kDa, y preferentemente al menos un 85 %. Este hidrolizado peptídico solubilizado corresponde al agente activo según la invención.

45 **[0028]** Según una segunda forma de realización de la invención, el extracto solubilizado puede estar encapsulado o implementado en un vector cosmético o farmacéutico, como los liposomas o cualquier otra microcápsula empleada en el campo de la cosmética, o bien adsorbido en polímeros orgánicos en polvo, en soportes minerales como los talcos y las bentonitas, y más generalmente, solubilizado o fijado en cualquier vector fisiológicamente aceptable.

50 **[0029]** De esta forma, el extracto solubilizado se utiliza en las composiciones según la invención a una concentración comprendida entre 0,001 % y 5 % aproximadamente, y preferentemente a una concentración comprendida entre 0,01 % y 1 % aproximadamente en relación al peso total de la composición final.

**[0030]** Preferentemente, la composición según la invención se presenta en una forma adaptada a la aplicación por vía tópica sobre el cabello.

**[0031]** La composición utilizable según la invención puede consistir en concreto en una composición para el cuidado capilar, y especialmente un champú, un acondicionador, una loción de fijación, una loción tratante de aplicación previa o posterior a un tratamiento agresivo en el cabello, una crema o un gel de peinado, una loción reestructurante para el cabello, una mascarilla, una espuma tratante, etc.

5 **[0032]** La composición podrá presentarse principalmente en forma de crema, emulsión aceite-agua, agua-aceite o múltiples emulsiones de tipo aceite-agua-aceite o agua-aceite-agua, suspensión, gel acuoso, soluciones acuosas, hidroalcohólicas u oleosas. La composición puede ser más o menos fluida y presentarse en forma de crema blanca o de color, pomada, leche, loción, sérum, espuma, producto bifásico, o en forma de aerosol.

10 **[0033]** Por último, la composición podrá comprender cualquier aditivo comúnmente utilizado en el campo de aplicación previsto así como los adyuvantes necesarios para su formación, como codisolventes (etanol, glicerol, alcohol bencílico, humectante...), espesantes, disolventes, emulsionantes, antioxidantes, colorantes, filtros solares, pigmentos, cargas, conservantes, perfumes, absorbentes de olor, aceites esenciales, oligoelementos, ácidos grasos esenciales, tensoactivos, polímeros filmógenos, filtros químicos o minerales, agentes hidratantes o de aguas termales, etc. Se pueden citar, por ejemplo, polímeros hidrosolubles de tipo polímero natural, como los polisacáridos, o polipéptidos, derivados celulósicos de tipo metilcelulosa o hidroxipropilcelulosa, así como polímeros sintéticos, polaxámeros, carbómeros, PVA o PVP y especialmente los polímeros vendidos por la compañía ISP.

20 **[0034]** En todos los casos, el experto garantizará que tanto los adyuvantes como sus proporciones sean escogidas de tal manera que no dañe las propiedades ventajosas investigadas de la composición según la invención. Estos adyuvantes pueden corresponder a, por ejemplo, de un 0,01 % a un 20 % del peso total de la composición. Cuando la composición según la invención es una emulsión, la fase grasa puede representar de un 5 a un 80 % en peso, y preferiblemente de un 5 a un 50 %, en relación al peso total de la composición. Los emulsionantes y coemulsionantes utilizadas en la composición serán elegidos de entre aquéllos que se utilizan habitualmente en el ámbito en cuestión. Por ejemplo, pueden utilizarse en una proporción que presente de un 0,3 a un 30 % en peso en relación al peso total de la composición.

25 **[0035]** Asimismo, la composición según la invención puede comprender, por otro lado, al menos un compuesto que mejore el crecimiento y/o la salud del cabello.

30 **[0036]** Se pueden mencionar especialmente vitaminas, otros extractos peptídicos vegetales, el minoxidil, ésteres de ácido nicotínico, oligoelementos, agentes antiinflamatorios, ácido retinoico o sus derivados, retinol, inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa o compuestos peptídicos provenientes de la síntesis química. Como ejemplo de vitamina se pueden citar las vitaminas A, E, B5, B6, C, H, o PP, y como ejemplo de oligoelementos se pueden citar el zinc, el cobre, el magnesio o también el silicio.

35 **[0037]** Otro objeto de la invención se refiere a un método de tratamiento cosmético no terapéutico destinado a proteger el cabello de las agresiones externas mediante la aplicación cotidiana o puntual en la zona del cuero cabelludo a tratar de una composición que comprende un hidrolizado según la invención. Otro objeto se refiere a un método de tratamiento cosmético no terapéutico destinado a proteger el cabello del estrés oxidativo, mediante la aplicación cotidiana o puntual de una composición según la invención. Preferentemente, la composición se aplicará con anterioridad a un tratamiento típico de tipo permanente, alisado o también coloración. Así, dicha composición podrá utilizarse como tratamiento previo por parte de, por ejemplo, profesionales de la peluquería.

40 Los tests *in vitro* han permitido demostrar, por ejemplo, que en caso de estrés oxidativo debido al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la aparición de vacuolas en las células de la capa exterior de la vaina externa del folículo piloso era menos importante en caso de aplicar el tratamiento previo con el activo que sin hacerlo. Según otra forma de realización, la composición se aplicará antes de una exposición al sol con el fin de prevenir daños provocados por los rayos UV. Se han obtenido resultados idénticos durante el estrés inducido por una exposición a los rayos UV. Estos tests han demostrado, por lo tanto, la actividad de antioxidante del hidrolizado según la invención.

**[0038]** Finalmente, un último objeto de la invención se refiere a un método de tratamiento cosmético no terapéutico destinado a proteger las pestañas de las agresiones externas y del estrés oxidativo, mediante la aplicación cotidiana o puntual sobre las pestañas de una composición que comprende un hidrolizado según la invención.

50 **[0039]** Otras ventajas y características de la invención aparecerán más bien durante la lectura de los ejemplos incluidos a título ilustrativo y no limitante.

**Ejemplo 1: Preparación de un hidrolizado peptídico enriquecido con péptidos bioactivos a partir de guisante (*Pisum sativum* L.)**

[0040] El hidrolizado peptídico se obtiene a partir de un extracto de plantas de la especie *Pisum sativum* L. Naturalmente, el extracto puede prepararse a partir de plantas de al menos cualquiera de las numerosas variedades y especies pertenecientes al género *Pisum*.

5 [0041] En una primera fase, se deslipida 1 kg de guisantes sin piel por la acción de un disolvente orgánico: el hexano.

[0042] La harina de guisante obtenida de esta forma se pone en solución en 10 volúmenes de agua en presencia de 2 % de POLYCLAR® 10 (polivinilpolipirrolidona – PVPP – insoluble). La mezcla se ajusta a un pH comprendido entre 7 y 8 con una solución acuosa de sodio 1 M.

10 [0043] Tras ajustar el pH, se añade 2 % de flavourzym® en el medio reactivo. La hidrólisis se obtiene tras 2 horas de agitación a 50 °C. Se procede a la desactivación de la enzima calentando la solución a 80 °C durante 2 horas. La mezcla reactiva obtenida de esta manera corresponde al extracto de guisante.

15 [0044] El proceso de purificación comienza por sucesivas filtraciones con la ayuda de filtros de placa Seitz-Orion de porosidad decreciente (hasta 0,2 µm) con el fin de obtener una solución brillante y clara. En esta fase, el hidrolizado de guisante se caracteriza por un presentar un seco de 70-80 g/kg, un índice de proteínas de 55-65, un índice de azúcares de 2-5 g/l y un índice de polifenoles de 1-3 g/l.

20 [0045] La naturaleza proteica de este hidrolizado se pone de manifiesto con la electroforesis en gel de poliacrilamida. Mediante este análisis, se utilizan los geles NuPAGE® Bis-Tris Pre-Cast (Invitrogen). El hidrolizado peptídico de guisante se calienta a 70 °C durante 10 minutos en condiciones reductoras desnaturizantes en un tampón de preparación de muestra NuPAGE® LDS. La migración de proteínas se realiza con la ayuda del tampón de migración NuPAGE® MES con el estándar SeeBlue Plus2 como marcador de peso molecular. La coloración de proteínas se lleva a cabo con la ayuda de Bleu de Coomassie® R-250. En estas condiciones, se observan 2 grandes familias de proteínas: la primera familia corresponde a proteínas de peso molecular de 20 a 25 kDa y la segunda familia a proteínas de pesos moleculares inferiores a 5 kDa.

25 [0046] A continuación, esta solución se purifica eliminando las proteínas de pesos moleculares superiores a 5 kDa con la ayuda de una filtración de flujo tangencial. Para ello, el hidrolizado de guisante se bombea a presión a través de un soporte Pellicon® equipado con un casete Pellicon® 2 Biomax 30 kDa. Este primer filtrado se recupera para poder filtrarse después a través de otro casete Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. Al terminar la purificación, se obtiene un hidrolizado peptídico de guisante amarillo-beige, brillante y claro. Se caracteriza por un peso seco de 50 a 55 g/kg, un contenido de proteínas de 50 a 52 g/l.

30 [0047] El extracto obtenido de acuerdo con el proceso descrito en el ejemplo 1 se solubiliza entonces en glicerol.

### **Ejemplo 2: Efecto/Acción del hidrolizado peptídico de guisante en biopsias de cuero cabelludo mantenidas en cultivo *in vitro*: inmunomarcajes de la catalasa, de p63 y de la caspasa-3**

#### 2.1 Cultivos de biopsias de cuero cabelludo e inclusión de cortes

35 [0048] Se cultivan biopsias de piel (provenientes de *liftings*) que presentan cabellos de la misma forma que con explantes de piel. Se realizan biopsias de 6 mm por medio de un *punch* de biopsia y se ponen en cultivo en insertos y en un medio WILLIAM E. en presencia de Primocine (Invivogen), 10 µg/ml de insulina 10 nG/ml, de hidrocortisona y 2 mmol/L de L-glutamina.

40 [0049] Los explantes de piel se depositan en placas de 6 pozos y se tratan o no añadiendo 20 µl de extracto a 1 % diluido en PBS, en contacto con las biopsias, en cultivo durante 24 horas. Al terminar el experimento, el recubrimiento de los explantes se puede realizar o bien de parafina, o bien de OCT, seguido por una congelación. En el caso del recubrimiento de parafina, las biopsias se ponen en casete y se sumergen en una mezcla de formol a 10 % durante 2 horas en un aparato automático (VIP). El tipo de recubrimiento elegido dependerá del marcador a analizar (catalasa, p-63 o caspasa-3). Por ejemplo, en el caso de un marcaje de la catalasa, el recubrimiento estará hecho de parafina. Para ello, las biopsias se recubren mediante parafina, a  
45 continuación se realizan una serie de baños de alcohol (a concentración y tiempo crecientes), y después 2 baños de xileno y finalmente un baño de parafina. La duración total de esta serie de operaciones es de una docena de horas. Las biopsias recubiertas de esta forma se colocan entonces en casetes apropiados, orientados y posicionados en un bloque de parafina con el fin de que se corten a 4 µm mediante un micrótopo. A  
50 continuación, los cortes parafinados se desparafinan y rehidratan antes de añadir el anticuerpo. Para ello, se realizan a tal efecto una serie de baños de xileno, seguidos por una serie de baños de alcohol (a concentración y tiempo crecientes) y por un enjuague en agua y finalmente en PBS.

#### 2.2 Inmunomarcaje de catalasa (protocolo de parafina)

**[0050]** Los cortes desparafinados se enjuagan durante 2 minutos y después se envuelven en PBS, y cada corte se incuba en 100 µl de BSA 5 % durante 30 minutos. A continuación, se añaden 100 µl de anticuerpos primarios anticatalasa diluidos a 1/100 (Calbiochem, policlonal de conejo) y se mantienen durante 60 minutos sin dejar de agitar en la cámara húmeda. Tras el enjuague con PBS durante 30 minutos, se añaden 100 µl de anticuerpos secundarios diluidos en 1/1000 (Invitrogene, Alexa Fluoro 488 anti-conejo) marcados con fluorescencia y se dejan a oscuras durante 1 hora sin dejar de agitar en la cámara húmeda. Estos marcajes se realizan simultáneamente con biopsias pretratadas o no durante 24 horas con el extracto peptídico activo a 1 %, y en presencia o no de un estrés UV (5 J/cm<sup>2</sup> + 200 mJ/cm<sup>2</sup>). Las placas se enjuagan entonces en PBS, y se montan entre placa y cubreobjetos en Aquatex y la observación se realiza al microscopio en epifluorescencia.

## 10 Resultados

**[0051]** En condición control sin UV, se constata una cantidad más importante de catalasa que en las biopsias no tratadas con el activo. Esta cantidad de catalasa es todavía más significativa en condición con UV en las biopsias no pretratadas. Aunque se constata un aumento en la cantidad de catalasa en condición pretratada, esta cantidad es muy inferior a la obtenida en las biopsias no pretratadas y con UV. Por consiguiente, se puede concluir que el activo de acuerdo con la invención tiene un efecto de protección de las células que componen el folículo piloso.

**[0052]** Se repite el mismo protocolo pero esta vez con un estrés oxidativo provocado por la adición de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Por tanto, se constata también en este caso que hay una cantidad más importante de catalasa en las biopsias que no han recibido un pretratamiento con el activo de acuerdo con la invención. Se confirma además una función protectora del extracto peptídico de guisante en las células del folículo piloso.

### 2.3 Inmunomarcaje de p63 (protocolo con OCT)

**[0053]** Con el fin de realizar un marcaje de p63 en los folículos pilosos, se tratan biopsias de *lifting* según se describe anteriormente en el párrafo 2.1. El marcaje se realiza en condición control con o sin pretratamiento de las biopsias con el activo a 1 %, y con o sin un estrés por rayos UV (5 J/cm<sup>2</sup> + 200 mJ/cm<sup>2</sup>). Para ello, los explantes de piel se depositan en placas de 6 pozos y los folículos se tratan o no añadiendo 20 µl de extracto activo a 1 %, en contacto con las biopsias, tras 24 horas de cultivo. A continuación, para preparar el marcaje con anticuerpos, no se parafinan los cortes, sino que se ponen en OCT (temperatura óptima de corte) y se enfrían rápidamente en un baño de nitrógeno líquido, para después cortarse el criostato (sección congelada). Se toman entonces las biopsias y se incorporan al OCT que se solidifica con el frío (los bloques se conservan a -20 °C); los bloques solidificados de esta manera se cortan entonces al criotomo, donde se realizan cortes de 6 µm. Unas placas de observación de polilisina recogen los cortes. Los cortes se ponen entonces a temperatura ambiente antes de ser utilizados por el inmunomarcaje mediante la adición de 100 µl de un anticuerpo primario anti-p63 (Santa Cruz, monoclonal de ratón) diluido en 1/100. Tras agitarse durante 60 minutos, se añaden 100 µl de un anticuerpo secundario diluido en 1/1000 (Invitrogene, Alexa Fluoro 488 anti-conejo) marcado con fluorescencia, y se dejan a oscuras durante 1 hora sin dejar de agitar en la cámara húmeda. Las placas se enjuagan entonces en PBS, se montan entre placa y cubreobjetos y la observación se realiza al microscopio en epifluorescencia.

## Resultados

**[0054]** En condición control, se constata que el marcaje p63 disminuye durante un estrés UV. En cambio, cuando se añade el activo en pretratamiento, el marcaje de p63 sin duda disminuye con respecto a la condición control (sin UV con activo), pero esta bajada se ve atenuada con respecto a la condición control con UV y sin activo. Por consiguiente, el hidrolizado peptídico de acuerdo con la invención ha tenido una función protectora en las células del folículo piloso por limitación de la bajada de proteína p63.

**[0055]** Se ha aplicado un protocolo idéntico, en las mismas condiciones experimentales, con el fin de comprobar el efecto protector del activo en biopsias sometidas a un estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por tanto, se constata el efecto antioxidante del hidrolizado peptídico de guisante en las biopsias tanto en presencia como en ausencia de estrés oxidativo.

### 2.4 Inmunomarcaje de la caspasa-3 (protocolo parafina con recuperación/desenmascaramiento a microondas)

**[0056]** Los cortes desparafinados se enjuagan durante 2 minutos y después se envuelven en PBS, y cada corte se incuba en 100 µl de BSA a 5 % durante 30 minutos. A continuación, se añaden 100 µl de anticuerpos primarios anticaspasa-3 escindidos diluidos a 1/200 (Cell Signaling, policlonal de conejo) y se mantienen durante 60 minutos sin dejar de agitar en la cámara húmeda. Tras el enjuague con PBS durante 30 minutos, se añaden 100 µl de anticuerpos secundarios diluidos en 1/1000 (Invitrogene, Alexa Fluoro 488 anti-conejo) marcados con fluorescencia y se dejan a oscuras durante 1 hora sin dejar de agitar en la cámara húmeda. Estos marcajes se realizan simultáneamente con biopsias pretratadas o no durante 24 horas con el extracto peptídico activo a 1 %, y se montan entre placa y cubreobjetos en Aquatex y la observación se realiza al microscopio en epifluorescencia.

y en presencia o no de un estrés UV (5 J/cm<sup>2</sup> + 200 mJ/cm<sup>2</sup>). Las placas se enjuagan entonces en PBS, y se montan entre placa y cubreobjetos en Aquatex y la observación se realiza al microscopio en epifluorescencia.

Resultados

5 **[0057]** En condición control sin UV, se constata una cantidad más importante de caspasa-3 escindida (y por tanto activa) en los cortes no pretratados con respecto a los cortes pretratados. Mediante la aplicación del estrés UV, se constata un aumento del marcaje p63 en las células pretratadas y en las no pretratadas. No obstante, el marcaje es mucho menos significativo en las biopsias pretratadas con respecto a las biopsias no tratadas. Se puede concluir, por tanto, que el pretratamiento con el activo de acuerdo con la invención ha permitido limitar la formación de caspasa-3 escindida y activa.

10 **[0058]** Se repite el mismo protocolo pero esta vez con un estrés provocado por la aplicación de una solución de H2O2 en lugar de rayos UV. En este caso también se constata que en presencia de estrés por H2O2, el marcaje de caspasa-3 activada es más importante en los cortes no pretratados que en los cortes pretratados.

**[0059]** Por consiguiente, el hidrolizado de acuerdo con la invención ha tenido una función de antioxidante al limitar la cantidad de caspasa activada.

15 **Ejemplo 3: Efecto del hidrolizado peptídico de guisante en folículos mantenidos en cultivo *in vitro*: Coloración hematoxilina/eosina (H/E)**

20 **[0060]** Se cultivan biopsias de piel (provenientes de *liftings*) que presentan cabellos al igual que explantes de piel. Se realizan biopsias de 6 mm por medio de un *punch* de biopsia y se ponen en cultivo en insertos en un medio WILLIAM E. en presencia de Primocine (Invivogen), 10 µg/ml de insulina 10 nG/ml, de hidrocortisona y 2 mmol/l de L-glutamina.

**[0061]** Los explantes de piel se depositan en placas de 6 pozos y los folículos son pretratados añadiendo 20 µl de extracto a 1 % en contacto con las biopsias durante 24 horas. A continuación, las biopsias:

- en la condición 1, se someten a una radiación UVA a 5 J/cm<sup>2</sup>, seguida por una radiación UVB a 200 mJ/cm<sup>2</sup>,
- en la condición 2, se someten a un estrés por aplicación de una solución H2O2 a 5 mM.

25 **[0062]** Posteriormente, las biopsias se dejan durante 24 horas adicionales. Unas cajas de control con explantes no pretratados con el extracto peptídico activo pero irradiados sirven de muestra testigo. Se realiza una evaluación del estado de las células tras la radiación UV mediante un marcaje de hematoxilina/eosina.

Resultados

30 **[0063]** La forma general de la vaina externa de la raíz (ORS) es irregular en los folículos que no han sido pretratados con el extracto peptídico, mientras que es totalmente regular en los folículos pretratados. Además, las células de los folículos pilosos no presentan daños provocados por los rayos UV, como la aparición de vacuolas, edemas o células apoptóticas. No se observa ninguna de estas manifestaciones en los folículos pretratados con el extracto peptídico. Se deduce por tanto una función protectora de dicho extracto peptídico de guisante en los folículos pilosos y, entre otras, las células de la capa exterior de la vaina externa del folículo piloso.

**Ejemplo 4: Preparación de composiciones**

1. Sérum hidratante para el cuero cabelludo y los cabellos

40 **[0064]** Disolver el Lubragel NP y el Lubragel IIXD en agua mediante agitación. Añadir el AMP 95 y mezclar hasta la completa disolución. Añadir el Styleze® 2000 y agitar hasta disolver y obtener un aspecto uniforme. Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir el resto de ingredientes en el orden en que aparecen en la lista agitando hasta obtener un aspecto uniforme entre cada uno de ellos.

Ingredientes (INCI/Nombre comercial)	%W/W	Proveedor
Agua desionizada	71,37	
Aminometil propanol (AMP 95)	0,13	
Styleze 2000	0,50	
SiTec DMC 6031	1,00	
Polimetacrilato de glicerilo/Lubrajel® NP	24,50	ISP

Glicerina y Poliacrilato de glicerilo/Lubrajel® IIXD	1,00	ISP
Propilenglicol, Diazonilidil urea, Yodopropinil butilcarbamato	0,50	ISP
<i>Extracto de guisante de acuerdo con la invención</i>	1,00	ISP
Total	100,00	

**[0065]** Aplicar el producto sobre el cuero cabelludo húmedo. Masajear para repartir uniformemente el producto. El sérum favorece el crecimiento y/o el desarrollo del cabello al mismo tiempo que le devuelve la fuerza.

2. Leche/espray acondicionador

- 5 **[0066]** Poner agua en un recipiente adecuado y comenzar a agitar. Añadir el Gafquat 755 N y el Liquid Germall Plus 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 de acuerdo con la invención y agitar hasta obtener un aspecto uniforme. Disponer el producto en un vaporizador no aerosol equipado con una bomba Calmar Mark VI WL31.

<b>Ingredientes (INCI/Nombre comercial)</b>	<b>%W/W</b>	<b>Proveedor</b>
Agua desionizada	92,68	
Poliquaternium-11/Gafquat® 755N	3,50	ISP
PEG/PPG-25/25 Dimeticona/SiTec DMC 6031	1,00	ISP
Propilenglicol Diazonilidil urea Yodopropinil butilcarbamato/	0,50	ISP
Poliacrilato de sodio Polideceno hidrogenado Tridecil-6/ <i>Polectron 430</i>	0,32	ISP
<i>Polectron 430</i>	1,00	ISP
<i>Extracto de guisante de acuerdo con la invención</i>	1,00	ISP
Total	100,00	

10

**[0067]** El producto está concebido para vaporizarse sobre el cuero cabelludo y sobre los cabellos húmedos. Masajear para repartir uniformemente el producto. La leche que se propone en el presente documento permite proteger los cabellos al mismo tiempo que los alisa y facilita el peinado.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un hidrolizado peptídico de guisante como agente antioxidante en una composición cosmética, proviniendo dicho hidrolizado de la hidrólisis de las proteínas del guisante *Pisum sativum* y comprendiendo al menos un 70 % de compuestos de naturaleza peptídica de tamaño inferior a 5 kDa, para proteger las fibras queratínicas elegidas de entre los cabellos, el vello, las pestañas y las cejas, de los rayos UV o de los estreses oxidativos provocados por tratamientos físicos o químicos elegidos de entre las coloraciones, los alisados, las permanentes o los secados, mediante una actividad antioxidante en las células del folículo piloso.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el hidrolizado comprende al menos un 85 % de compuestos de naturaleza peptídica.
- 10 3. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el hidrolizado está solubilizado en uno o varios disolventes fisiológicamente aceptables elegidos de entre el agua, el glicerol, el etanol, el propilenglicol, el butilenglicol, el dipropilenglicol, los diglicoles etoxilados o propoxilados, los polioles cíclicos o cualquier mezcla de estos disolventes.
- 15 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el hidrolizado solubilizado comprende al menos entre 0,5 y 5 g/l de compuestos de naturaleza peptídica.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** el hidrolizado solubilizado comprende al menos entre 2 y 3 g/l de compuestos de naturaleza peptídica.
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el hidrolizado solubilizado se utiliza en una cantidad que representa de 0,001 % a 5 % del peso total de la composición.
- 20 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** el hidrolizado solubilizado se utiliza en una cantidad que representa de 0,01 % a 1 % del peso total de la composición.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la composición comprende además, al menos un compuesto que mejora el crecimiento y/o la salud del cabello.
- 25 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** dicho compuesto es escogido de entre vitaminas, otros extractos peptídicos vegetales, el minoxidil, ésteres de ácido nicotínico, oligoelementos, agentes antiinflamatorios, ácido retinoico o sus derivados, retinol, inhibidores de la 5a-reductasa o compuestos peptídicos provenientes de la síntesis química.
- 30 10. Procedimiento de tratamiento cosmético no terapéutico destinado a proteger las fibras queratínicas elegidas de entre el cabello, el vello, las pestañas y las cejas, rayos UV o estreses oxidativos provocados por tratamientos físicos o químicos escogidos de entre las coloraciones, los alisados, las permanentes o los secados, mediante una actividad antioxidante en las células del folículo piloso, **caracterizado por que** se aplica de forma cotidiana o puntual sobre las fibras queratínicas a tratar, una composición en la que se solubiliza un hidrolizado proveniente de la hidrólisis de las proteínas del guisante *Pisum sativum* y comprendiendo al menos un 70 % de compuestos de naturaleza peptídica de tamaño inferior a 5 kDa.
- 35 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** la composición se aplica con anterioridad a un tratamiento químico del cabello escogido de entre las permanentes, los alisados o también las coloraciones.
- 40 12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** la composición se aplica antes de una exposición al sol con el fin de prevenir daños causados por los rayos UV.