

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 341**

51 Int. Cl.:

A61K 38/02 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

A61K 35/36 (2015.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/98 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2016** **PCT/FR2016/051010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016** **WO16174367**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2016** **E 16725186 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 3288575**

54 Título: **Complejo proteomelánico bioasimilable, preparación y usos**

30 Prioridad:

30.04.2015 FR 1553920

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

28.05.2020

73 Titular/es:

CARLINI, ROSANNA (100.0%)
42 avenue du Peymian
13600 La Ciotat, FR

72 Inventor/es:

BLANCHARDIE, OLIVIER y
VELLA, JEAN-SÉBASTIEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 763 341 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

Complejo proteomelánico bioasimilable, preparación y usos

- 5 La presente invención se refiere a un complejo proteomelánico bioasimilable bioactivo, que comprende un extracto proteico, ventajosamente al menos parcialmente soluble, y melanina. El complejo según la invención presenta además una buena asimilación posterior en el cuerpo humano. La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de dicho complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, al uso de dicho complejo así como a composiciones que comprenden al menos dicho complejo.
- 10 Las melaninas son polímeros biológicos complejos que se encuentran en los seres humanos, los animales, las plantas, las bacterias los hongos y los protistas.
- 15 En los seres humanos, las melaninas están presentes en la piel, el cabello, en partes del cerebro y en partes del ojo y del oído.
- 20 Las melaninas biológicas son macromoléculas producidas en su mayor parte por melanocitos, por adición o condensación de monómeros formados a partir de tirosina (eumelanina) o tirosina y cisteína (feomelanina), con la intervención de la tirosinasa (Plonka, P.M. y Grabacka, M.; Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects Acta Biochimica Polonica 2006 53: 429-443).
- También hay melaninas artificiales, tales como los poliacetilenos, las polianilinas y los polipirroles de color negro o marrón, y sus copolímeros; que tienen una aplicación industrial y/o biotecnológica.
- 25 En el presente texto, y siempre que se indique particularmente, los términos "melanina" o "melaninas" podrán usarse indistintamente para nombrar a las melaninas naturales y/o artificiales, de cualquier origen, solas o combinadas, ya sean de eumelanina, de feomelanina, o de una combinación de las 2, en cualquier proporción o incluso de productos intermedios de síntesis, sus degradaciones, así como sus formas opcionalmente modificadas.
- 30 En la estructura de las melaninas, los radicales libres están en equilibrio con los grupos no radicales.
- Las melaninas son muy resistentes a la descomposición y a la biodegradación.
- Las melaninas poseen fuertes propiedades antioxidantes y pueden proteger contra los ataques de las enzimas líticas.
- 35 Las melaninas presentan propiedades radioprotectoras debido a su capacidad para absorber los radionúclidos de manera eficaz.
- Las melaninas pueden contribuir a la reducción del exceso de metales pesados en el cuerpo humano.
- 40 Se sabe que las melaninas protegen eficazmente a los organismos vivos de la radiación ultravioleta (UV).
- El potencial terapéutico de las melaninas para aplicaciones en medicina, en farmacología, en cosmética, en todas las formas compatibles, tales como composiciones farmacéuticas y/o cosméticas, o incluso complementos nutricionales, está bien documentado (Plonka, P.M. y Grabacka M., *opus citatum*).
- 45 Las melaninas juegan un papel importante en la fotoprotección, especialmente de la piel humana, contra los efectos agudos de la exposición a los rayos UV (por ejemplo, quemaduras solares), como los riesgos potenciales a largo plazo de cambios actínicos (arrugas y envejecimiento prematuro de la piel) y estados precancerosos o malignos (queratosis solar, carcinomas de células basales y/o carcinomas de células escamosas, tumores malignos).
- 50 Las melaninas (principalmente la eumelanina) están presentes en la epidermis en forma de partículas, melanosoma, y en forma amorfa, melaninas coloidales, y ofrecen, a través de estas formas, una protección a las células.
- 55 Además de en la piel, las melaninas también están presentes en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) del ojo humano. Las melaninas del EPR, principalmente la eumelanina, juega un papel fotoprotector por absorción de la radiación y atrapa los radicales libres reactivos y las especies reactivas del oxígeno (ROS, por las siglas inglesas de *reactive oxygen species*).
- 60 También se ha descrito un papel fototóxico de las melaninas del EPR, especialmente en células envejecidas, incluido el aumento de la fotogeneración de ROS, tales como los aniones superóxido y los radicales hidroxilos que participan en la muerte de las células del EPR.
- 65 La química de las melaninas es de particular interés porque la muerte de las células del EPR es una característica importante de la patogénesis de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), causa principal de ceguera en la población humana mayor de 60 años en el mundo desarrollado (Brandon-Luke, L. et al. Time Resolved Detection

of Melanin Free Radicals Quenching Reactive Oxygen Species J. Am. Chem. Soc. 2005 127, 11220-1221).

Para identificar modos de aprovechar aún más las funcionalidades de las melaninas y permitir que surjan sus posibles aplicaciones biotecnológicas, se ha enfatizado sobre la solubilización acuosa de melaninas.

Las melaninas solubles pueden producirse sintéticamente o aislarse de fuentes naturales (US 5 216 116; US 5 218 079; US 5 225 435; US 5 227 459; US 5 384 116, US 5 574 125; US 6 315 988, US 5 814 495 y US 6 576 268).

Aunque se ha investigado mucho acerca de la síntesis de las melaninas sintéticas, la producción de melanina a partir de bacterias o de fuentes vegetales, tales como verduras y frutas, la producción de melaninas de mamíferos ha permanecido durante mucho tiempo sin explotar porque las melaninas de mamíferos son muy insolubles y requieren tratamientos exigentes, tales como la ebullición en un medio básico fuerte, o el uso de oxidantes fuertes tales como el peróxido de hidrógeno, que ocasionan daños y desnaturaliza las melaninas producidas, así como los complejos proteicos que rodean a dichas melaninas.

Se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre las melaninas naturales obtenidas de plantas o de fuentes bacterianas que posteriormente se volvieron solubles en agua. Estas investigaciones han conducido a múltiples aplicaciones tópicas de las melaninas en cosmética y dermatología, lo que ha permitido constatar de forma eficaz una cierta absorción cutánea de las melaninas.

El interés en cuanto a los roles biológicos y terapéuticos de las melaninas en el cuerpo humano está aumentado, pero se ha investigado poco acerca de obtener una melanina realmente bioasimilable por el cuerpo humano, especialmente cuando las melaninas son de origen animal, especialmente de mamíferos.

Existe por tanto una necesidad real de melaninas bioasimilables, o que se hayan vuelto bioasimilables, especialmente de melaninas, de origen animal, más especialmente de origen mamífero, bioasimilables, o que se hayan vuelto bioasimilables, que, más ventajosamente, dichas melaninas hayan conservado sus propiedades, especialmente biológicas, intrínsecas, y por lo tanto caracterizadas como melaninas activas o bioactivas. Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar una melanina, ventajosamente de origen animal, mamífero o aviar, preferentemente de mamífero, bioasimilable, o que se haya vuelto bioasimilable, que sea fácil de preparar y que presente propiedades útiles, tanto en seres humanos como en animales, en los campos de la industria cosmética, dermatológica, farmacéutica o alimentaria, que haya conservado sus propiedades, especialmente biológicas, intrínsecas.

Las investigaciones del solicitante han conducido a desarrollar un complejo proteomelánico que presenta la propiedad de ser bioasimilable y a presentar una melanina que ha conservado sus propiedades, especialmente biológicas, intrínsecas y capaces de expresarse una vez introducida en el organismo del receptor (melanina bioactiva). Por tanto, en el presente documento, asimismo será posible calificar el complejo proteomelánico, objeto de la invención, como bioasimilable y/o bioactivo.

Según la presente invención, por complejo se entiende una asociación de moléculas, más o menos estrechamente relacionadas entre sí.

En el caso particular de la presente invención, se entenderá que dicho complejo proteomelánico puede comprender al menos un extracto proteico y melanina más o menos estrechamente relacionados.

Por bioasimilable se entiende, según la presente invención, la capacidad de una molécula o de una composición, de atravesar las barreras biológicas, tales como la piel, incluido el cuero cabelludo, o incluso la barrera gastrointestinal, y a volver a estar disponible en la circulación, ventajosamente sin degradarse, parcial o totalmente, o eliminarse.

El primer objeto de la invención es, por tanto, un complejo proteomelánico bioasimilable, que puede comprender al menos un extracto proteico, soluble o parcialmente soluble y melanina, pudiendo ser dicho complejo proteomelánico ventajosamente bioactivo y comprendiendo dicho extracto proteico al menos un resto de cisteína o al menos un resto de tirosina o al menos un resto de cisteína y un resto de tirosina, caracterizado por que las proteínas y/o los fragmentos de proteínas de dicho extracto proteico se han vuelto solubles injertando al menos un grupo sulfito en al menos un átomo de azufre de al menos una cisteína de dichas proteínas y/o de dichos fragmentos de proteínas de dicho extracto proteico.

Por extracto proteico se entiende, según la invención, que dicho complejo proteomelánico según la invención podrá comprender proteínas y/o fragmentos de proteínas (péptidos) procedentes de la fuente proteica o de la fuente melanoproteica seleccionada. En el presente documento, por fuente melanoproteica se entiende una sola fuente que contiene, al mismo tiempo, proteínas y melanina.

Por extracto proteico soluble o parcialmente soluble se entiende según la invención que las proteínas y/o los fragmentos de proteínas (péptidos) presentes en dicho extracto se han vuelto solubles por cualquier técnica de solubilización de proteínas y/o fragmentos de proteínas (péptidos) conocidos por el experto en la materia, como por

ejemplo la hidrólisis o una modificación química. Como modificación química, se podrá mencionar, por ejemplo, el injerto de grupos polares en dichas proteínas y/o fragmentos de proteínas (péptidos), especialmente en las cisteínas de dichas proteínas y/o de dichos fragmentos de proteínas (péptidos) muy especialmente en el átomo de azufre de dichas cisteínas.

5 Por cisteína se entiende, según la invención, cisteína como tal, libre o implicada en un enlace peptídico, o incluso cistina.

10 Según la invención, las proteínas y/o los fragmentos de proteínas (péptidos) se vuelven solubles injertando al menos un grupo sulfito en el átomo de azufre de al menos una cisteína de dichas proteínas y/o de dichos fragmentos de proteínas (péptidos). El extracto de proteína soluble, o parcialmente soluble, presente en dicho complejo proteomelánico comprende al menos una cisteína que lleva un grupo sulfito en su átomo de azufre, denominada asimismo en el presente documento cisteína S-sulfonada o S-sulfocisteína.

15 Ventajosamente, según la invención, dicho extracto proteico soluble, o parcialmente soluble, presente en dicho complejo proteomelánico, puede comprender entre una y todas sus cisteínas en forma de cisteínas S-sulfonadas, muy ventajosamente entre un tercio y todas, incluso más preferentemente entre la mitad y todas sus cisteínas en forma de cisteínas S-sulfonadas. Según una forma muy preferida de la invención, dicho extracto proteico soluble, o parcialmente soluble, presente en dicho complejo proteomelánico puede comprender el 100 % de sus cisteínas en forma de cisteínas S-sulfonadas.

Según la invención, dicho extracto proteico podrá ser soluble en agua de 0,1 a 99 %, preferentemente de 0,1 a 75 %, muy preferentemente de 0,1 a 50 %.

25 La solubilidad puede medirse utilizando un turbidímetro HI 83703 de HANNA Instrument (diseñado según las normas ISO 7027 de la FTU (*Formazine Turbidity Unit*, unidad de turbidez de la formazina) estándar internacional, equivalente a la NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*, unidad de turbidez nefelométrica)) y que sirve para medir más concretamente la turbidez. Cuanto menor sea la turbidez, más soluble será la muestra; cuanto mayor sea la turbidez, más micropartículas y cuerpos insolubles habrá en el medio.

30 A una concentración comprendida entre 3 y 10 % en agua, dicho extracto proteico o proteomelánico de interés presenta una turbidez extremadamente baja o incluso nula, de 0,00 a 50 NTU. Dicho extracto proteico o proteomelánico de interés puede ser soluble, de tal manera que pueda pasar a través de filtros de porosidad de 5 a 100 µm sin que quede retenido. El extracto soluble de interés puede representar más del 50 % del rendimiento en relación con la masa proteica o melanoproteica resultante de la materia prima utilizada, determinado en masa seca antes y después de la filtración.

35 Según la invención, dicho complejo proteomelánico, puede comprender de 0,01 % a 99,99 % de extracto proteico, preferentemente entre el 1 % y el 95 %, muy preferentemente entre el 30 % y el 95 %, incluso más preferentemente entre el 50 % y el 95 %.

Según la invención, dicho complejo proteomelánico, puede comprender de 0 01 % a 99,99 % de melanina, preferentemente entre el 0,5 % y el 20 %, muy preferentemente entre el 1 % y el 15 %.

45 Según la invención, dicho extracto proteico podrá comprender entre 0,1 % y 100 % de fragmentos de proteínas (péptidos), preferentemente entre el 30 % y el 100 %, muy preferentemente entre el 55 % y el 100 % de fragmentos de proteínas (péptidos).

50 Según la invención, dichos fragmentos de proteínas (péptidos) podrán tener una longitud comprendida entre 2 y 1 000 aminoácidos, preferentemente entre 2 y 500 aminoácidos, muy preferentemente entre 2 y 100 aminoácidos.

Según una variante de la invención, dicho extracto proteico y dicha melanina pueden proceder de las mismas o de diferentes fuentes proteicas y melánicas, tomadas por separado.

55 Según otra variante de la invención, preferentemente, dicho extracto proteico y dicha melanina pueden proceder de una misma fuente melanoproteica, ventajosamente utilizada en solitario.

60 Se observará que, según la invención, tanto la fuente de melanina como la fuente proteica y la fuente melanoproteica, pueden ser únicas o una combinación de diferentes fuentes de melanina, proteica o melanoproteica, en cualquier proporción.

Por tanto, según la invención, la melanina y/o el extracto proteico pueden proceder

- de una sola fuente de melanina y de una sola fuente proteica;
- de una mezcla de fuentes de melanina y de una sola fuente proteica;
- de una mezcla de fuentes de melanina y de una sola fuente proteica y de una sola fuente melanoproteica;

- de una mezcla de fuentes de melanina y de una sola fuente proteica y de una mezcla de fuentes melanoproteicas;
- de una sola fuente de melanina y de una mezcla de fuentes proteicas;
- de una sola fuente de melanina y de una mezcla de fuentes proteicas y de una sola fuente melanoproteica;
- de una sola fuente de melanina y de una mezcla de fuentes proteicas y de una mezcla de fuentes proteomelánicas;
- 5 - de una mezcla de fuentes de melanina y de una mezcla de fuentes proteicas;
- de una mezcla de fuentes de melanina y de una mezcla de fuentes proteicas y de una sola fuente melanoproteica;
- de una mezcla de fuentes de melanina y de una mezcla de fuentes proteicas y de una mezcla de fuentes melanoproteicas;
- de una sola fuente melanoproteica;
- 10 - de una sola fuente melanoproteica y de una sola fuente de melanina;
- de una sola fuente melanoproteica y de una sola fuente proteica;
- de una mezcla de fuentes melanoproteicas y de una sola fuente de melanina;
- de una mezcla de fuentes melanoproteicas y de una sola fuente proteica.

15 Según la invención, la fuente de melanina podrá ser sintética, semisintética u obtenida por extracción de una fuente natural. Se utilizará preferiblemente una melanina de extracción natural. La fuente de melanina natural puede ser de origen animal, incluyendo seres humanos, vegetales, hongos, o microorgánica, preferentemente de origen animal, incluyendo seres humanos, muy preferentemente de origen mamífero o aviar, incluso más preferentemente de origen mamífero.

20 Por tanto, como fuente de melanina natural utilizable según la invención, se puede mencionar, como ejemplo, melanina de lana, vello, cabello, garras, cuernos o incluso plumas, plantas, frutas, tinta de cefalópodo, bacterias o de fuentes sintéticas. Preferentemente, la fuente de melanina podrá ser de lana como la de las ovejas, muflones, cabras, gamuzas, takines, cabras montesas, íbices, thars, jharales, seraus, gorales, buey almizclero, urial, baral, rebeco, conejo, liebre, pica, llama, alpaca, guanaco, vicuña, camello, dromedario, yac o de plumas como las de la urraca, el cuervo o el mirlo. Una lana preferida puede ser la lana de oveja, especialmente de oveja negra (como por ejemplo las de las razas "oveja de Ouessant", "negra de Velay", "nariz negra de Valais", "oveja negra de Thibar", "oveja negra galesa de montaña", "Balwen" "Zwartbles" o incluso "Hebridean"), más concretamente lana de oveja de la raza "negra de Velay".

30 El experto habrá comprendido que, en este documento, el término "oveja" (*Ovis aries*) se utiliza para denominar a un mamífero herbívoro doméstico de la familia de los bóvidos, de la subfamilia de los caprinos y del género *Ovis*. El término incluye tanto al animal joven (cordero/borrego), como a la hembra (oveja) y al macho (carnero), castrado o no.

35 En las solicitudes de patente US 5 618 519, US 5 384 116 y US 5 227 459, se describen ejemplos de derivados de melanina sintética que pueden usarse. En las solicitudes de patente US 5 744 125, US 5 225 435, US 5 218 079 y US 5 216 116, se describen ejemplos de derivados de melanina soluble que pueden usarse. Son ejemplos de derivados de melanina soluble comerciales que pueden usarse, por ejemplo, Melasyn-100™ de los laboratorios San-mar Inc. (Elmsford, N.Y. USA) y MelanZe™ de Zylepsis (Ashford, Kent, Gran Bretaña).

40 Según la invención, dicho extracto proteico puede provenir de cualquier fuente proteica natural o sintética, preferentemente natural. Dicha fuente proteica natural puede ser de cualquier origen y puede tener cualquier forma. Preferentemente podrá ser de origen animal o vegetal, fúngico o microorgánico, ventajosamente de origen animal o vegetal, preferentemente animal, muy preferentemente de origen mamífero o aviar, incluso más preferentemente de origen mamífero.

45 Según una forma preferida de la invención, la fuente proteica podrá ser una fuente animal, preferentemente una fuente proteica que comprende queratina como por ejemplo las faneras de muchos animales, ventajosamente de mamíferos, incluidos los seres humanos, entre las cuales puede mencionarse el vello, el cabello, las vibrisas, la lana, las plumas, los cuernos, las uñas, las garras, las pezuñas, los picos las escamas.

50 De lo anterior se entiende que cuando según la invención se usa una fuente melanoproteica, esta puede ser de cualquier origen siempre que contenga, al mismo tiempo, proteínas y melanina. Según la invención, la fuente melanoproteica podrá ser de origen animal, vegetal, fúngico o microorgánico, ventajosamente de origen animal, ventajosamente de mamíferos, incluidos los seres humanos, muy ventajosamente de las faneras, entre las cuales puede mencionarse el vello, el cabello, las vibrisas, la lana, las plumas, los cuernos, las uñas, las garras, las pezuñas, los picos las escamas.

55 Preferentemente, según la invención, dicha fuente melanoproteica podrá ser de lana, como la de las ovejas muflones, cabras, gamuzas, takines, cabras montesas, íbices, thars, jharales, seraus, gorales, buey almizclero, urial, baral, rebeco, conejo, liebre, pica, llama, alpaca, guanaco, vicuña, camello, dromedario, yac o de plumas como las de la urraca, el cuervo o el mirlo. Una lana preferida puede ser la lana de oveja, especialmente de oveja negra (como por ejemplo las de las razas "oveja de Ouessant", "negra de Velay", "nariz negra de Valais", "oveja negra de Thibar", "oveja negra galesa de montaña", "Balwen" "Zwartbles" o incluso "Hebridean"), más concretamente lana de oveja de la raza "negra de Velay".

Una forma preferida del complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, podrá ser un complejo cuyo extracto proteico y la melanina podrán proceder de una sola y exclusiva fuente melanoproteica, ventajosamente de lana negra, muy ventajosamente de la lana negra de oveja, especialmente de la lana negra de oveja de la raza "negra de Velay", que puede comprender del 0,01 % al 99,99 % de extracto proteico, preferentemente entre el 1 % y el 95 %, muy preferentemente entre el 30 % y el 95 %, incluso más preferentemente entre el 50 % y el 95 %, que por sí misma comprende del 0,1 % al 100 % de fragmentos de proteínas (péptidos), preferentemente entre el 30 % y el 100 %, muy preferentemente entre el 55 % y el 100 %, cuya longitud podrá comprender entre 2 y 1 000 aminoácidos, preferentemente entre 2 y 500 aminoácidos, muy preferentemente entre 2 y 100 aminoácidos, y del 0,01 % al 99,99 % de melanina, preferentemente entre el 0,5 % y el 20 %, muy preferentemente entre el 1 % y el 15 %, y puede comprender entre el 10 % y el 100 % de sus cisteínas en forma de cisteínas S-sulfonadas, muy ventajosamente entre el 30 % y el 100 %, más preferentemente entre el 50 % y el 100 % de sus cisteínas en forma de cisteínas S-sulfonadas, muy preferentemente dicho complejo proteomelánico podrá comprender el 100 % de sus cisteínas en forma de cisteínas S-sulfonadas.

La invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de dicho complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, según el cual, en una primera etapa, la parte proteica de dicha fuente proteica o melanoproteica se vuelve solubilizable, ventajosamente hidrosolubilizable, en una segunda etapa, la parte proteica de la mezcla obtenida en la primera etapa se fracciona en péptidos, para obtener una mezcla que comprenda el complejo proteomelánico investigado.

De hecho, según una primera forma de realización de dicho procedimiento según la invención, si las fuentes proteicas y melánicas son físicamente diferentes entre sí según el procedimiento de acuerdo con la invención, en una primera etapa, la parte proteica de dicha fuente proteica se vuelve solubilizable, ventajosamente hidrosolubilizable, en una segunda etapa, la parte proteica de la mezcla obtenida en la primera etapa se fracciona en péptidos, en una tercera etapa, la melanina se introduce en la mezcla obtenida en la segunda etapa, para obtener una mezcla que comprenda el complejo proteomelánico investigado.

Cabe destacar que según este procedimiento, la introducción de la melanina también puede tener lugar antes de la primera etapa para volver a las proteínas solubilizables que entonces podrá tener lugar en una mezcla de fuente proteica/fuente melánica físicamente diferentes, por tanto, después de la primera etapa antes de la segunda etapa de fraccionamiento de las proteínas que entonces podrá tener lugar en una mezcla de fuente proteica que se ha vuelto solubilizable/fuente melánica, o después de la segunda etapa añadiendo la melanina a la mezcla de fuente proteica que se ha vuelto solubilizable y fraccionada. Preferentemente, según la invención, en esta forma realización del procedimiento, la introducción de la melanina podrá realizarse después de la segunda etapa.

Según una segunda forma de realización de dicho procedimiento según la invención, si las fuentes proteicas y melánicas son físicamente idénticas (fuente melanoproteica) según el procedimiento de acuerdo con la invención, en una primera etapa la parte proteica de dicha fuente melanoproteica se vuelve solubilizable, ventajosamente hidrosolubilizable, en una segunda etapa, la parte proteica de la mezcla obtenida en la primera etapa se fracciona en péptidos, para obtener una mezcla que comprenda el complejo proteomelánico investigado. Se entiende que, en esta forma de realización del procedimiento, la melanina está presente a partir de la primera etapa.

En sí misma, cada etapa del procedimiento según la invención puede realizarse con técnicas perfectamente conocidas del experto en la materia. La originalidad del procedimiento desarrollado por los inventores reside en agrupar las diferentes etapas que permiten llegar a un complejo proteomelánico bioasimilable, opcionalmente soluble según las condiciones de pH y que además presenta propiedades utilizables en los campos de la industria cosmética, dermatológica, farmacéutica o alimentaria.

Según la invención, dicha mezcla obtenida en la última etapa, que comprende dicho complejo proteomelánico según la invención, puede utilizarse directamente o someterse a cualquier etapa posible para su transformación en un producto de forma más adecuada para sus utilizaciones posteriores.

Según la invención, las fuentes de proteínas y de melaninas pueden presentarse en cualquier forma compatible con la aplicación del procedimiento según la invención. Por ejemplo, las proteínas pueden estar en forma líquida, sólida o semisólida [por ejemplo, colágenos, hidrolizados de colágeno o gelatinas, proteínas lácteas, caseínas, proteínas vegetales (soja, trigo, arroz... etc.) en diferentes formas (gránulos, soluciones, batidos, pepitas, revalorización de residuos alimentarios... etc)]. La melanina puede estar en forma líquida, sólida, semisólida, (como por ejemplo, tinta de sepia en polvo).

Según la invención, la primera etapa para volver solubilizable la parte proteica de la mezcla, ventajosamente hidrosolubilizable, puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, el injerto de grupos, ventajosamente polares (hidrófilos, por tanto solubles en agua), que pueden volver solubles a dichas proteínas o a dichos péptidos, en dichas proteínas o péptidos o rompiendo enlaces químicos entre las cadenas proteicas o peptídicas como por ejemplo la reducción de puentes disulfuro. Se podrán citar, por ejemplo, las reacciones de injerto de grupos fosfato, sulfitos o sulfatos que pueden catalizarse química o enzimáticamente, que puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido de la técnica anterior, por ejemplo, fosforilación,

sulfatación, o incluso, sulfitólisis oxidativa, entendiéndose que la parte proteica de la mezcla puede someterse a una o más de estas reacciones de injerto consecutivas o asociadas. Preferentemente, según la invención, será podrá utilizar la sulfitólisis oxidativa que presenta la doble particularidad de dar como resultado el injerto de sulfitos, grupos polares, en las cadenas laterales de los restos de cisteína y también para cortar los puentes disulfuro que liberan las cadenas proteicas entre sí y que favorecen su solvatación en agua [Crewther W. G. y col., The chemistry of keratins in Advances in protein chemistry, Academic Press, vol. 20; 1965, páginas 191-346; Otto Lindner, Lars Rodefild, Benzenesulfonic Acids and Their Derivatives, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, coll. «Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry», 15 de septiembre de 2000; FR2521571 (19 de agosto de 1983); US 3 644 084 (1 de diciembre de 1971). Ventajosamente durante esta reacción, el grupo o grupos polares, ventajosamente, el sulfito o los sulfitos, pueden injertarse en las cisteínas de dichas proteínas y/o de dichos fragmentos de proteínas (péptidos), muy especialmente en el átomo de azufre de dichas cisteínas.

Según la invención, la segunda etapa de hidrólisis puede llevarse a cabo mediante cualquier método de hidrólisis conocido de la técnica anterior, como por ejemplo, hidrólisis ácida, hidrólisis básica o incluso hidrólisis enzimática, preferentemente la hidrólisis enzimática. Cabe destacar que esta etapa puede realizarse mediante oxidación parcial utilizando ácido peracético, peróxido de hidrógeno o un equivalente, en condiciones conocidas por el experto en la materia. Preferentemente, según la invención, la segunda etapa del procedimiento podrá llevarse a cabo mediante hidrólisis enzimática según los métodos descritos en la bibliografía en relación con hidrolizados proteicos enzimáticos tales como, por ejemplo, Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications (2007, Julio Polaina, Andrew P. MacCabe Ed., publicado por Springer).

Según una variante de la invención, las etapas 1 y 2 pueden cambiarse.

Según una variante de la invención, opcionalmente, para garantizar la ausencia de cualquier actividad proteolítica residual, puede realizarse una etapa de inactivación enzimática. Esta etapa de inactivación, opcional, puede realizarse inmediatamente después de la etapa 2, o a continuación o durante cualquier etapa posterior como se describe más adelante.

Según otra variante de la invención, la mezcla obtenida en la última etapa del procedimiento descrito anteriormente, puede someterse a cualquier etapa posible de transformación para obtener una forma purificada. En el presente documento, por "purificada" se entiende que la mezcla obtenida al final del procedimiento, como se ha descrito anteriormente, se ha sometido a al menos una etapa adicional que pretende enriquecer la mezcla obtenida de complejo proteomelánico según la invención. A este respecto, es posible contemplar una etapa de separación de las fases líquida y sólida, por ejemplo por filtración, frontal o tangencial, como por ejemplo la filtración al vacío o al pasar sobre la lana lavada o bien por gravedad como por ejemplo la sedimentación, la flotación o la centrifugación.

También es posible contemplar una concentración o una o más etapas de purificación, ventajosamente para eliminar, total o parcialmente, los minerales y/o los restos de reacción opcionalmente presentes en la mezcla, tales como, por ejemplo, sulfatos, el posible exceso de cobre o incluso de sodio. Los sulfitos libres podrán convertirse opcionalmente en sulfato antes de su eliminación por oxidación con oxígeno activo, en cualquiera de sus formas.

A este respecto, pueden utilizarse todos los métodos conocidos de la técnica anterior. Como ejemplo, puede mencionarse la separación por cromatografía selectiva en columna, por ejemplo, de tipo iónico. Ventajosamente, los componentes, reactivos y/o disolventes opcionalmente utilizados, podrán ser de calidad alimentaria. También puede mencionarse la separación membranaria o la precipitación selectiva.

Esto puede realizarse usando agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético o resinas de intercambio iónico, tales como las que contienen grupos funcionales iminodiacéticos, y el uso de la precipitación isoeléctrica para separar los tipos de proteínas. La ultrafiltración puede utilizarse en varias etapas del procedimiento para mejorar la eficacia de la eliminación de reactivos o de la separación de proteínas.

Una vez purificado, el producto obtenido al final del procedimiento que contiene el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, ventajosamente el complejo proteomelánico bioasimilable puro, puede secarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, secado por lecho fluidizado, pulverización liofilización o incluso secado por atomización. Si se desea, también es posible realizar etapas adicionales de tipo molienda, mezclado u otras, para obtener una granulometría específica para los usos posteriores contemplados.

El experto en la materia comprende que es durante la última etapa cuando se constituye el complejo proteomelánico según la invención entre la fracción peptídica soluble y la melanina, de modo que las dos fracciones se homogeneizan y se unen perfectamente.

En efecto, en esta fase del proceso, la fracción peptídica puede estar unida por enlaces débiles e iónicos a la fracción melánica que se vuelve hidrosoluble en el medio de reacción a partir del momento en que esté en condiciones de pH y temperatura adecuadas, permitiendo que se una a los péptidos. En esta fase, el experto en la materia sabrá adaptar sin dificultad las condiciones de pH y/o de temperatura del medio para obtener el complejo proteomelánico según la

invención en la forma deseada. Como ejemplo, es posible emplear un intervalo de pH diferente al del pHi de las proteínas/péptidos solubles garantizando la presencia de una carga en los péptidos en cuestión, facilitando su interacción con la melanina. En esta opción, se podrá emplear un pH superior al pHi en un intervalo de 5 a 11, idealmente en un intervalo de 6 a 8.

Por ejemplo, si en la primera etapa del procedimiento, se utiliza sulfitolisis oxidativa para volver solubilizable a la fracción proteica por lo que el medio de reacción contendrá cobre en forma de complejo cuproamónico. Este medio de reacción, que se recupera al final del procedimiento de dicho complejo cuproamónico, siempre estará presente al final de la etapa de hidrólisis. En las condiciones operativas, los iones de cobre pueden establecer interacciones iónicas en las fracciones melánicas y proteicas participando en la obtención de un complejo proteomelánico.

Asimismo, para evitar cualquier desnaturalización del complejo proteomelánico (precipitación, alteración química ...) todas las operaciones opcionales posteriores realizadas con el propósito de purificar y concentrar el complejo, podrán realizarse a una temperatura que no permita estas degradaciones. Por tanto, la temperatura de estas operaciones no podrá superar los 100 °C, preferentemente los 90 °C, muy preferentemente los 75 °C, incluso durante un tiempo muy corto (de algunos segundos a varias horas).

El procedimiento según la invención es un procedimiento suave que permite obtener un complejo proteomelánico, ventajosamente un complejo queratino/melánico sin degradación de la melanina y que permite obtener un complejo proteomelánico bioasimilable que presenta propiedades, ventajosamente biológicas, interesantes que permite contemplar su utilización en numerosos campos y bajo numerosas formas farmacéuticas. Entre las excelentes propiedades del complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, está su excelente bioasimilación, que permite contemplar la preparación de formulaciones que comprenden dicho complejo proteomelánico bioasimilable, adecuadas para una administración por vía oral o para la aplicación tópica en la piel.

Además de una excelente bioasimilación, los estudios realizados por los inventores han permitido poner de manifiesto que el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención puede ser adecuado para estimular la melanogénesis, especialmente a nivel de la piel y/o el cabello y/o los ojos, pero también en el cerebro y en el conducto auditivo interno. Esta propiedad puede permitir favorecer el aumento de la pigmentación de la piel al mismo tiempo con y sin exposición a la radiación ultravioleta, así como una regeneración de la coloración de las faneras, especialmente vello, cabello o incluso lana y una regeneración de la pigmentación del ojo. Estas propiedades pueden utilizarse en animales, preferentemente en mamíferos, especialmente en seres humanos.

Por tanto, el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención puede utilizarse, para introducir en el organismo, sin intervención quirúrgica, melanina exógena, especialmente melanina exógena que haya conservado sus propiedades intrínsecas.

El complejo proteomelánico bioasimilable según la invención puede utilizarse para aplicar todas las propiedades conocidas de melanina.

Por tanto, la invención también tiene por objeto el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención para estimular la melanogénesis, especialmente en la piel, en las faneras, en el cabello, en el vello, en la lana, en los ojos en el cerebro y/o en el conducto auditivo interno, preferentemente en el cabello, el vello, la lana y/o los ojos.

La invención también tiene por objeto el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, para atrapar radicales libres, combatiendo así ventajosamente sus efectos nocivos como el envejecimiento tisular, en especial la aparición de arrugas y arruguitas de la piel.

La invención también tiene por objeto el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención para aumentar la regeneración celular, la elasticidad y/o la hidratación de la piel, para intensificar la cohesión celular, especialmente en la piel y/o en las faneras.

Esta propiedad de atrapamiento de radicales libres puede encontrar otra aplicación para combatir el estrés oxidativo y, por tanto, en el tratamiento o la prevención de sus consecuencias, como ocurre en muchas enfermedades tales como, por ejemplo, las cataratas, la artritis, las enfermedades cardiovasculares o los cánceres.

Asimismo, se sabe que la melanina puede neutralizar los efectos nocivos de las radiaciones, ya sean o no ionizantes.

Por tanto, la melanina podría absorber una gran cantidad de energía y producir poco calor a medida que absorbe esta energía. Por tanto, se ha insinuado que la melanina podría absorber grandes cantidades de energía de todo tipo, incluyendo la energía de los rayos del sol, de aparatos de rayos X, y la energía formada en las células durante el metabolismo de estas.

Por tanto, la invención también tiene por objeto el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención para proteger a los organismos vivos de la radiación ionizante (radiación ultravioleta (lejana), rayos X, rayos gamma, neutrones, electrones/partículas β^- , positrones/partículas β^+ , muones, protones, iones de ^4He /partículas alfa, iones ^{12}C)

o no ionizante (radiación ultravioleta (cercana) A, B y/o C, luz visible, infrarroja A, B y/o C, microondas, ondas de radio).

Preferentemente, El objeto de la invención es el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención para proteger a los organismos vivos de la radiación ultravioleta, lejana o cercana (A, B o C), de la luz visible, de la radiación infrarroja (A, B y/o C) o incluso de los rayos X.

Asimismo, se sabe que la melanina fija y concentra los metales pesados en las plumas de las aves. Por tanto se contempla utilizar el complejo proteomelánico bioasimilable según la invención para atrapar los metales pesados, ventajosamente los del organismo, ventajosamente los del organismo humano, y así desintoxicar dicho organismo.

La invención también tiene por objeto la utilización del complejo proteomelánico bioasimilable según la invención en la preparación de composiciones cosméticas, dermatológicas, farmacéuticas o incluso alimentarias.

El objeto de la invención también es una composición que comprenda al menos un complejo proteomelánico bioasimilable según la invención. Dicha composición puede ser una composición cosmética, dermatológica, farmacéutica o incluso alimentaria, por consiguiente, además del complejo proteomelánico bioasimilable, dicha composición puede comprender cualquier otro compuesto y/o adyuvante utilizado habitualmente en los campos de la cosmética, dermatología, farmacéutica o alimentaria.

Una composición especialmente preferida según la invención, puede comprender complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, tirosina y/o cisteína, ventajosamente en forma libre o combinada o en forma de péptido. Esta composición es especialmente adecuada como complemento alimentario.

Según la invención, dicha composición puede comprender complejo proteomelánico bioasimilable en una cantidad de entre el 1 % y el 100 %, preferentemente entre el 20 % y el 95 %, muy preferentemente comprendida entre el 50 % y el 95 %, en peso con relación al total de la composición.

Esta composición es especialmente adecuada para favorecer la melanogénesis.

Dicha composición podrá adaptar cualquier forma farmacéutica conocida y compatible con su uso, especialmente la forma de una crema, una solución, una pomada, una loción, un jabón, una espuma, un champú, un desodorante, un desmaquillante, un rímel, un lápiz de ojos, un pintalabios, un gel una preparación presurizada (pulverizador), estando estas formas más especialmente adaptadas para un uso de aplicación en la piel y/o el cabello o incluso en forma de un comprimido, un jarabe un polvo comestible una gragea, una cápsula blanda, una cápsula dura, un chicle, gránulos, una premezcla para alimento, una preparación líquida una preparación semisólida, estando estas formas más especialmente adaptadas para un uso mediante ingestión por vía oral. Pueden contemplarse otras formas de uso más específico, como una preparación vaginal, una preparación rectal, una preparación ocular, tampones medicinales o un apósito impregnado.

Por supuesto, estas composiciones pueden comprender además cualquier otro compuesto o adyuvante adaptado a la forma farmacéutica seleccionada. A este respecto, se pueden mencionar los antiespumantes, catalizadores, agentes clarificantes/adyuvantes de filtración, agentes decolorantes, agentes de lavado y pelado/raspado, agentes de desplumado y de pelado/depilado, resinas de intercambio iónico, agentes de congelación por contacto y agentes de enfriamiento, agentes deshidratantes/antiaglomerantes, enzimas, agentes acidificantes, alcalinizantes o neutralizantes, agentes desmoldeadores, floculantes y coagulantes, agentes descontaminantes, desincrustantes, disolventes de extracción, aceites minerales, naturales, extracciones, sustancias químicamente reactivas, oxidantes, vitaminas, sales minerales, excipientes, tensioactivos, conservantes, filtros ultravioleta, colorantes, antioxidantes alginatos, edulcorantes, potenciadores del sabor, ceras e hidrocarburos, chicles, gases propulsores, inertes, acondicionadores o marcadores.

La invención también tiene por objeto la utilización de una composición según la invención, para introducir en el organismo, sin intervención quirúrgica, melanina exógena, especialmente melanina exógena que haya conservado sus propiedades intrínsecas, o para estimular la melanogénesis, especialmente en la piel, en los ojos o en las faneras, preferentemente en el cabello, el vello, la lana, o para proteger a los organismos vivos de la radiación ultravioleta, o para atrapar radicales libres, combatir ventajosamente sus efectos nocivos como el envejecimiento tisular, en especial la aparición de arrugas y arruguitas de la piel, o para luchar contra el estrés oxidativo y tratar o prevenir sus consecuencias como por ejemplo las cataratas, la artritis, las enfermedades cardiovasculares o cánceres o para neutralizar los efectos potencialmente dañinos de la radiación que no sea la radiación UV o para atrapar los metales pesados, ventajosamente los del organismo y así desintoxicar el organismo o incluso para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la maculopatía (MRE) y/o la degeneración macular (DMRE).

Figura 1: Esquema que ilustra las zonas experimentales utilizadas durante los ensayos.

Figura 2: Ilustración de la variación de los parámetros L* (2A) y ATI° (2B) en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación cutánea inmediata (exposición a rayos UVA).

Figura 3: Ilustración de la variación del índice melánico (IM) en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación cutánea inmediata (exposición a rayos UVA).

Figura 4: Ilustración de la variación de los parámetros L* (4A) y ATI° (4B) en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación retardada (exposición a UVB/UVA).

Figura 5: Ilustración de la variación del índice melánico (IM) en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación retardada (exposición a UVB/UVA).

Figura 6: Ilustración de la variación de los parámetros L* (6A) y ATI° (6B) en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), en una zona no expuesta.

Figura 7: Ilustración de la variación del índice melánico (IM) en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), en una zona no expuesta.

Figura 8: Ilustración de la variación de los parámetros L* en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la coloración del cabello.

Figura 9: Ilustración de los resultados del estudio de bioasimilabilidad de los elementos del complejo proteomelánico según la invención.

Figura 10: Curva patrón establecida para determinar la cantidad de melanina presente en las muestras obtenidas al final del estudio de bioasimilabilidad.

Figura 11: Ilustración de los resultados del estudio de la modificación del contenido de proteínas de la piel de los complejos proteomelánicos. [□ Control, ■ Grupo Activo].

Otros elementos, características y ventajas de la invención podrán aparecer al leer los siguientes ejemplos proporcionados con fines ilustrativos y al observar las figuras adjuntas.

La figura 1, ilustra el lugar de las zonas de la piel sometidas a radiación UV durante los ensayos mostrados en los ejemplos. Se observa la presencia de una zona de medición de la Dosis Eritematosa Mínima (DEM) definida como la dosis más pequeña de radiación ultravioleta (UV) que induce el primer eritema perceptible que aparece en la mayor parte del sitio de exposición a los rayos UV, en el intervalo de 16 a 24 horas después de la exposición, y de una zona de medición de la dosis mínima de pigmento persistente (DMPP) definida como Dosis Mínima Pigmentaria Persistente (DMPP).

Las diferentes zonas de control 1A y 1B reciben dosis definidas de UV (DEM y DMPP) y permiten medir la respuesta epidérmica antes de tomar el producto proteomelánico.

Las zonas 2A, 3A y 4A, permiten medir la respuesta epidérmica después de tomar el producto proteomelánico con UVA los 10 días. Esto corresponde a la medición de la pigmentación inmediata debido a la melanina que migra a la superficie de la piel en respuesta a la radiación UVA.

La Zona 4B permite medir la respuesta epidérmica durante la toma del producto proteomelánico y con UV A/B. Esto corresponde a la medición de la pigmentación retardada debido al aumento de la producción de melanina medido después de 30 días de tratamiento y que como respuesta se traduce en un bronceado más intenso y persistente, que corresponde a la activación de la síntesis de melanina (melanogénesis).

La zona NE es la zona de medición antes y después de la toma del complejo, sin radiación UV. Esto corresponde a la búsqueda de la actividad del producto sobre la melanogénesis sin radiación.

La figura 2, ilustran los resultados obtenidos en el estudio de la variación de los parámetros L* (2A) y ATI° (2B) después de la administración del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación cutánea inmediata (exposición a rayos UVA). Se observa que el D0 dos horas después de la exposición a los rayos UVA, la piel era significativamente más oscura (disminución en el parámetro L*; figura 2A) y más pigmentada (disminución del parámetro y ATI°, figura 2B) después de la utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto) según la invención.

Este efecto se observó a partir de los 10 días de utilización del producto y la eficacia sigue aumentando con el tiempo (efecto máximo observado después de 30 días de utilización del producto: disminución de 225 % del parámetro ATI° en comparación con antes de la utilización del producto). Estos resultados son estadísticamente significativos (p<0,001 %).

En la figura 3 se ilustran los resultados obtenidos en el estudio de la variación del índice melánico (IM) después de la administración del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación cutánea inmediata (exposición a rayos UVA). Se observa que después de 10 días de utilización del producto, las mediciones con Mexameter® mostraron una piel ligeramente más pigmentada, dos horas después de la exposición a los rayos UVA (+14 %, la variación está en el límite de significación). Después de 20 y 30 días de utilización del producto, el aumento del índice melánico es mucho mayor y se vuelve estadísticamente significativo (el D30: +106 %, p<0,001).

En la figura 4 se ilustran los resultados obtenidos en el estudio de la variación de los parámetros L* (4A) y ATI (4B) después de la administración del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto). sobre la pigmentación retardada (exposición a UVB/UVA). Se observa que después de 30 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Spectrocolorimeter® mostraron una piel significativamente más oscura (disminución del parámetro L*) y más pigmentada (disminución del parámetro ATI°) después de una, dos o tres exposiciones a UVB/UVA (después de tres exposiciones: disminución significativa del parámetro ATI° del 206 % en comparación con antes de la utilización del producto).

Estos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,001$ %).

En la figura 5 se ilustran los resultados obtenidos en el estudio de la variación del índice melánico (IM) después de la administración del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto). sobre la pigmentación retardada (exposición a UVB/UVA). Se observa que después de 30 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Mexameter® mostraron una piel significativamente más pigmentada (aumento del índice melánico) después de una, dos o tres exposiciones a UVB/UVA (después de tres exposiciones, aumento del índice melánico del 217 % en comparación con antes de la utilización). Estos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,001$ %).

En la figura 6 se ilustran los resultados obtenidos en el estudio de la variación de los parámetros L* (6A) y ATI (6B) después de la administración del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto). en una zona no expuesta. Se observa que durante toda la ingesta del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Spectrocolorimeter® no mostraron variación relevante en el color de la piel en una zona no expuesta a los rayos UV: variaciones del 0 % al 2 %, no significativas en su mayor parte y no relevantes desde el punto de vista biológico (no visible a simple vista).

En la figura 7 se ilustran los resultados obtenidos en el estudio de la variación del índice melánico (IM) después de la administración del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto). en una zona no expuesta. Se observa que en el intervalo de 10 y 39 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Mexameter® mostraron un aumento muy leve en el índice melánico (variación significativa o en el límite de significación entre el 4 % y el 6 %).

En la figura 8 se ilustran los resultados obtenidos en el estudio de la variación de los parámetros L* en el estudio del efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la coloración del cabello. Se observa que durante los 120 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Spectrocolorimetre® mostraron un color de cabello significativamente más oscuro (13 % después de 120 días de utilización, $p < 0,001$). El efecto aumenta con el tiempo de tratamiento. También se observó una variación de la tonalidad del cabello con un color menos "amarillo" y menos "rojo".

En la figura 9 se ilustran los resultados del estudio de bioasimilabilidad del complejo proteomelánico según la invención. Se observa una bioasimilabilidad de las proteínas en los líquidos gastrointestinales simulados de $40,5 \pm 0,8$ %, una bioasimilabilidad de la tirosina igual a $1,85 \pm 0,2$ %, y una bioasimilabilidad de la melanina en los fluidos gastrointestinales simulados de $9,43 \pm 0,7$ %.

La bioasimilabilidad total del complejo proteomelánico se determinó matemáticamente añadiendo el contenido de proteínas, tirosina y melanina; esto da como resultado un valor de la bioasimilabilidad del complejo proteomelánico del 49,93 % (figura 9).

En la figura 10 se muestra la curva utilizada para la determinación cuantitativa de melanina por métodos espectrofotométricos (véase el ejemplo 5).

En la figura 11 se ilustran los resultados de la modificación del contenido de proteínas de la piel recogidas en los sujetos que han recibido el complejo proteomelánico según la invención [Grupo Activo] con respecto a un grupo de sujetos que no han recibido dicho complejo proteomelánico [Control].

El contenido de proteínas (cohesividad) se mide utilizando el método de la lámina Corneofix (Courage + Khazaka, electronic GmbH).

Las láminas Corneofix® F 20 se depositan en las capas córneas de un rostro limpio los días (D) D0 y D90. La determinación del contenido de proteínas captadas en las láminas Corneofix® F 20, permite evaluar la cohesividad de la piel.

Una mejora en la cohesividad de la piel implica una disminución de la cantidad de proteínas captadas por la lámina entre las muestras los días D0 y D90.

La ingesta de complejo proteomelánico mejoró significativamente la cohesión de la piel en comparación con el control el día 90 con una disminución del 19,7 % en el contenido de proteínas en comparación con el control (P <0,001).

5 Ejemplo 1: Preparación de un complejo proteomelánico bioasimilable según la invención.

Primera etapa: sulfitolisis oxidativa aplicada a la lana.

Modo operativo:

10

En un depósito se introducen 100 kg de lana de oveja "negra de Velay" desgrada y lavada.

Preparación de la solución de cobre-amonio y de la solución de sulfitos:

15

Preparación del complejo de cobre y amoniaco soluble en medio básico:

En otro depósito, se mezclan aproximadamente 20 litros de una solución acuosa de amoniaco al 25 % con 8 kg de cobre puro, en forma de sulfato de cobre. Después, se añaden aproximadamente 750 litros de agua en los que previamente se habrán disuelto 50 kg de sulfitos sódicos.

20

Desarrollo de la reacción, parámetros controlados:

La mezcla de reacción se añade al depósito que contiene la lana y después se pone en movimiento. La temperatura se mantiene entre 20 y 40 °C, y se inyecta aire para suministrar oxígeno. Cuando el medio de reacción se ha vuelto suficientemente fluido, la mezcla se agita. Esta operación se realiza durante un período de tiempo de aproximadamente 1 a 2 días, hasta que las fibras hayan perdido toda cohesión entre ellas.

25

Segunda etapa: hidrólisis e inactivación enzimática

30

Después, se añaden 350 g de enzima Protex 6L de Genencor o Multifect PR 6L de Brenntag (serina proteasa alcalina), cuya actividad enzimática es de 580 000 U/g en el medio a un pH mantenido entre 9 y 10; y a una temperatura comprendida entre 40 y 50 °C; Se deja hidrolizar durante 24 horas con agitación.

35

A medida que avanza la hidrólisis, el pH aumenta y para mantener el pH constante entre 9 y 10 se añade sosa (carbonato sódico)

Cuando el pH ya no varía, por lo cual ya no es necesario añadir sosa, o cuando se considera que la hidrólisis es suficiente, la etapa de hidrólisis finaliza.

40

El medio de reacción contiene, entre otras cosas, el complejo proteomelánico objeto de la invención que puede utilizarse tal cual o purificado y concentrado por cualquier técnica conocida por los expertos en la materia.

Ejemplo 2: Composición que comprende complejo proteomelánico obtenido en el ejemplo 1.

45

2A) loción para frenar la caída y volver a teñir el cabello blanco mediante la aplicación tópica en el cuero cabelludo, cabello

Complejo proteomelánico	7,0 g
urea	1,0 g
Lactato de sodio	0,5 g
Fenoxietanol	0,1 g
Perfume	cs
Agua csp	100,0 g

2B) crema preparadora, aceleradora del bronceado y regeneradora de la epidermis

50

Complejo proteomelánico	5,0 g
Behenato de glicerol	2,0 g
Isononanoato de isononilo	3,0 g
Manteca de karité	1,5 g
Glicerina	4,0 g
Tocoferol	0,1 g
Aceite de vaselina	8,0 g
Éster de poliglicerol	0,5 g
Perfume	cs
Undecilenato de glicerol	0,1 g

Agua

csp 100,0 g

2C) Complemento alimentario preparador y acelerador del bronceado, en forma de cápsula

Complejo proteomelánico en forma de polvo microgranulado	325,0 mg
Vitamina C	90,0 mg
Gluconato de cobre	1,0 mg
Estearato de magnesio	2,0 mg
Óxido de sílice	0,2 mg
1 Cápsula de gelatina dura	94,0 mg

5 Ejemplo 3: Evaluación del efecto de un complejo proteomelánico bioasimilable según la invención sobre la pigmentación de la piel.

10 El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del complejo proteomelánico bioasimilable según la invención, preparado en el ejemplo 1, sobre la pigmentación de la piel con estimulación UV, después de 10, 20 y 30 días de utilización del producto estudiado.

Durante esta evaluación se ha estudiado:

- 15 - el efecto del producto sobre la pigmentación de la piel después de la exposición a los rayos UVA y la medición de la pigmentación inmediata (2 horas después de la exposición) con un Spectrocolorimeter® y un Mexameter® después de 10, 20 y 30 días de utilización del producto. Esta pigmentación implica principalmente la activación de la melanina ya presente en la piel.
- 20 - el efecto del producto sobre la pigmentación de la piel después de las exposiciones repetidas a los rayos UV(B+A) y la medición de la pigmentación retardada con un Spectrocolorimeter® y un Mexameter® después de 30 días de utilización del producto. Esta pigmentación implica principalmente la síntesis de nueva melanina.

3.1) Herramientas y protocolos

25 Exposiciones a UV

30 ➤ Para medir la Dosis Eritematosa Mínima (DEM: dosis más pequeña de radiación ultravioleta (UV) que induce el primer eritema perceptible que aparece en la mayor parte del sitio de exposición a los rayos UV, en el intervalo de 16 a 24 horas después de la exposición y la Dosis Mínima Pigmentaria Persistente (DMPP), se utilizó una lámpara de xenón de tipo luz solar multipuerto 601-300 W, provista de un filtro WG320 (1,25 mm) para los UV(A+B) y de un filtro WG335 (3 mm) (UVA) para eliminar los UVB y una potencia de 300 W.

Los espectros emitidos son para los UV (A+B) de 290 a 400 nm y para los UVA de 320 a 400 nm.

35 Para eliminar la radiación infrarroja y la luz visible, se utilizó un filtro UG11 (1 mm) y un espejo dicróico.

La superficie de la piel expuesta se delimita usando un protector con seis orificios (diámetro de 8 mm) $\geq 0,5 \text{ cm}^2$.

40 Para determinar la DEM, el técnico establece el flujo de rayos UV de cada fibra óptica para obtener una progresión geométrica del 15 %. El sistema se utiliza con un flujo constante, todas las fibras se abren al mismo tiempo.

Para determinar la DMPP, el técnico determina el flujo de rayos UVA de cada fibra óptica para obtener una progresión geométrica del 25 %. El sistema se utiliza con un flujo constante, todas las fibras se abren al mismo tiempo.

45 Para las exposiciones a los rayos UV (A+B) y UVA, se utilizó una lámpara de xenón de tipo luz solar monopuerto del simulador solar de alta potencia de 1000 W - Modelo LS1000, que presenta un espectro de UVA (A+B) de 290 a 400 nm y de UVA de 320 a 400 nm. La superficie de piel expuesta es a lo sumo de 4 x 4 cm.

Mediciones con Spectrocolorimeter® a nivel de la piel

50 La medición colorimétrica de la piel se efectuó utilizando un Spectrocolorimeter® MINOLTA CM700-d, provisto de un cabezal de 8 mm de diámetro.

55 El Spectrocolorimeter® transforma los colores que están en el intervalo de percepción humana en un código numérico compuesto por tres parámetros:

- L*: representa la claridad (de oscuro a pálido),
- a*: representa la escala de verdes a rojos,
- b*: representa la escala de azules a amarillos.

a* y b* son parámetros de crominancia y L* un parámetro de luminancia.

5 Por tanto es posible expresar, con el más mínimo detalle, las diferencias entre dos zonas cutáneas que parecen ser del mismo color. Después de la calibración, las mediciones se realizan directamente sobre la piel utilizando una fuente de luz de xenón pulsada y un sistema de doble haz para medir la luz emitida y corregir cualquier ligera desviación.

Este instrumento se utiliza habitualmente en cosmética y en medicina para medir el color de la piel.

10 Los parámetros L* (característico de la luminosidad) y b* (característico de la pigmentación cutánea melánica amarillenta) se estudian durante un estudio sobre la pigmentación cutánea.

Estos dos parámetros se extraen a través del cálculo del "Ángulo Tipológico Individual" (ATI), que define el grado de pigmentación de la piel de una persona integrando la claridad (L*) y el parámetro de melanización (b*), según la siguiente fórmula:

$$ATI^{\circ} = [\text{Arc tan}((L^*-50)/b^*)] \times 180 / \pi$$

Cuanto mayor sea el ATI°, más clara será la piel.
Cada medida es la media de tres adquisiciones.

20 Mediciones con Mexameter® a nivel de la piel

El Mexameter® es un instrumento de Courage y Khazaka, provisto de un cabezal de 5 mm de diámetro, que mide especialmente el contenido de melanina y hemoglobina de la piel. Estos dos componentes son los principales responsables del color de la piel.

La medición se basa en el principio de absorción. La sonda especial del Mexameter® MX18 emite luz a tres longitudes de onda predefinidas (568 nm (verde), 660 nm (rojo) y 880 nm (infrarrojo)). Un fotodetector mide la luz reflejada por la piel. Esta medición se basa en el mismo principio óptico que consiste en medir la luz absorbida y reflejada en las longitudes de onda de rojo e infrarrojo para la melanina.

A partir de la intensidad de la luz absorbida y reflejada a 600 y 880 nm, respectivamente, se calcula un índice de melanina (Mx).

35 A partir de la intensidad de la luz absorbida y reflejada a 568 y 660 nm, respectivamente, se calcula un índice de eritema (Ex).

Solo se analizó el índice de melanina, que representa el contenido de melanina de la piel. Un aumento de este parámetro caracteriza un aumento en la pigmentación de la piel.

Cada medida es la media de tres adquisiciones.

Desarrollo del ensayo

45 El estudio se realizó en 35 sujetos

EI D-10

50 Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado ningún producto en la espalda desde la noche anterior y las zonas de exposición a nivel de la espalda se definen como se muestra en la figura 1

- Exposición UVB/UVA para determinar la DEM.
- Exposición UVA para determinar la DMPP.
- 2 horas después de la exposición UVA: lectura de la DMPP

EI D-9

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Entre 16 y 24 horas después de la exposición UVB/UVA: lectura de la DEM.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® en las zonas 1A, 1B y NE.
- Mediciones con Mexameter® en las zonas 1A, 1B y NE.
- Exposición UVB/UBA en la zona 1B a 08 DEM.
- Exposición UVA en la zona 1A a 1,25 DMPP.
- 2 horas después de la exposición UVA: mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en la Zona 1A.

EI D-6

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 1B y NE.
- Exposición UVB/UBA en la zona 1B a 08 DEM.

EI D-3

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 1B y NE.
- Exposición UVB/UBA en la zona 1B a 08 DEM.

EI D0

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 1B y NE.

El producto se toma a razón de 2 cápsulas al día por la mañana durante el desayuno hasta el final del estudio.

EI D10

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 2A y NE.
- Exposición UVA en la zona 2A a 1,25 DMPP.
- 2 horas después de la exposición UVA: mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en la zona 2A.

EI D20

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 3A y NE.
- Exposición UVA en la zona 3A a 1,25 DMPP.
- 2 horas después de la exposición UVA: mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en la zona 3A.

EI D30

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® en las zonas 4A, 4B y NE.
- Mediciones con Mexameter® en las zonas 4A, 4B y NE.
- Exposición UVB/UBA en la zona 4B a 08 DEM.
- Exposición UVA en la zona 4A a 1,25 DMPP.
- 2 horas después de la exposición UVA: mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en la zona 4A.

EI D33

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 4B y NE.
- Exposición UVB/UBA en la zona 4B a 08 DEM.

EI D36

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 4B y NE.
- Exposición UVB/UBA en la zona 4B a 08 DEM.

EI D39

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en la espalda desde la noche anterior.
- Mediciones con Spectrocolorimeter® y Mexameter® en las zonas 4B y NE.

Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos permite determinar la significación de las variaciones bajo el efecto del producto analizado.

La comparación se refiere a los valores obtenidos en los diferentes tiempos de evaluación.

La prueba utilizada es la prueba de la t de Student para datos relacionados. Las condiciones de aplicación son el

carácter aleatorio y sencillo de las muestras y la normalidad de las diferencias de la población.

El principio de la prueba consiste en plantear una hipótesis nula (H_0) sin diferencia entre el efecto medio en los diferentes tiempos de evaluación ($\bar{d} = 0$) y una hipótesis alternativa H_1 (nuestra hipótesis de investigación) de una diferencia entre los tiempos de evaluación ($\bar{d} < 0$).

A continuación, se determina cuál es la probabilidad p de observar una separación entre los tiempos al menos tan grande como la que se ha observado si la hipótesis nula fuese cierta.

- Si $p \leq 5\%$, se rechaza la hipótesis nula. Se acepta entonces la hipótesis alternativa H_1 de una diferencia significativa entre los tiempos de evaluación.
- Si $p > 5\%$, se acepta la hipótesis nula. Los datos no han permitido poner de manifiesto una diferencia significativa entre los tiempos de evaluación.

3.2) Resultados

En las tablas que se muestran a continuación, los resultados de L^* se ofrecen desde un color oscuro a un color claro, los resultados del ATI° se dan de más pigmentado a menos pigmentado.

3.2.1) Efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación cutánea inmediata (exposición UVA) Spectrocolorimètre®

En la Tabla 1 a continuación se muestra un resumen de los resultados

	D10			D20			D30		
	Variación		p	Variación		p	Variación		p
	UA	%		UA	%		UA	%	
L^*	-2,4 +/- 0,3	118	<0,001	-3,9 +/- 0,4	189	<0,001	-6,1 +/- 0,4	248	<0,001
ATI°	-2,6 +/- 0,4	82	<0,001	-6,2 +/- 0,4	161	<0,001	-7,2 +/- 0,5	225	<0,001
UA: media +/- SEM									

Estos resultados también se ilustran en las figuras 2A y 2B.

Dos horas después de una exposición a rayos UVA, la piel estaba significativamente más oscura (disminución del parámetro L^*) y más pigmentada (disminución del parámetro ATI°) después de la utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto) según la invención.

Este efecto se observó a partir de los 10 días de utilización del producto y la eficacia sigue aumentando con el tiempo (efecto máximo observado después de 30 días de utilización del producto: disminución de 225 % del parámetro ATI° en comparación con antes de la utilización del producto).

Mexamètre®

En la Tabla 2 a continuación se muestra un resumen de los resultados

	D10			D20			D30		
	Variación		p	Variación		p	Variación		p
	UA	%		UA	%		UA	%	
IM	3,3 +/- 1,8	14	0,076	20 +/- 1,9	84	<0,001	25,3 +/- 3,6	106	<0,001
IM = Índice Melánico; UA: media +/- SEM									

Estos resultados también se ilustran en la figura 3

Después de 10 días de utilización del producto, las mediciones con Mexameter® mostraron una piel ligeramente más pigmentada, dos horas después de la exposición a los rayos UVA (+14 %, la variación está en el límite de significación). Después de 20 y 30 días de utilización del producto, el aumento del índice melánico es mucho mayor y se vuelve estadísticamente significativo (el D30: +106 %, $p < 0,001$).

3.2.2) Efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación retardada (exposición UVB/UVA) Spectrocolorimètre®

En la Tabla 3 a continuación se muestra un resumen de los resultados

Tabla 3

		D30		
		Variaciones		p
		UA	%	
Después de 1 exposición a rayos UV	L*	-2,2 +/- 0,0	170	<0,001
	ATI°	-4,2 +/- 0,3	190	<0,001
Después de 2 exposiciones a rayos UV	L*	-4,1 +/- 0,3	180	<0,001
	ATI°	-6,7 +/- 0,6	166	<0,001
Después de 3 exposiciones a rayos UV	L*	-7,0 +/- 0,3	249	<0,001
	ATI°	-11,0 +/- 0,5	206	<0,001

Estos resultados también se ilustran en las figuras 4A y 4B

- 5 Después de 30 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Spectrocolorimeter® mostraron una piel significativamente más oscura (disminución del parámetro L*) y más pigmentada (disminución del parámetro ATI°) después de una, dos o tres exposiciones a UVB/UVA (después de tres exposiciones: disminución significativa del parámetro ATI° del 206 % en comparación con antes de la utilización del producto).

10

Mexamètre®

En la Tabla 4 a continuación se muestra un resumen de los resultados.

15

Tabla 4

		D30		
		Variaciones		p
		UA	%	
IM	Después de 1 exposición a rayos UV	15,1 +/- 0,0	193	<0,001
	Después de 2 exposiciones a rayos UV	26,5 +/- 1,9	167	<0,001
	Después de 3 exposiciones a rayos UV	43,1 +/- 2,7	217	<0,001

IM = Índice Melánico; UA: media +/- SEM

Estos resultados también se ilustran en la figura 5.

- 20 Después de 30 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Mexameter® mostraron una piel significativamente más pigmentada (aumento del índice melánico) después de una, dos o tres exposiciones a UVB/UVA (después de tres exposiciones, aumento del índice melánico del 217 % en comparación con antes de la utilización).

- 25 3.2.3) Efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), en una zona no expuesta Spectrocolorimeter®

En la Tabla 5 a continuación se muestra un resumen de los resultados.

Tabla 5

	L*			b*			ATI°		
	Variación		p	Variación		p	Variación		p
	UA	%		UA	%		UA	%	
D10	0,6 +/- 0,2	1	0,004	0,5 +/- 0,2	2	0,010	0,3 +/- 0,2	1	0,139
D20	0,1 +/- 0,2	0	0,604	0,0 +/- 0,2	0	0,804	0,0 +/- 0,0	0	0,000
D30	0,1 +/- 0,2	0	0,722	-0,1 +/- 0,2	-1	0,552	0,0 +/- 0,0	0	0,000

30

(continuación)

	L*			b*			ATI°		
	Variación		p	Variación		p	Variación		p
	UA	%		UA	%		UA	%	
D33	0,1 +/- 0,2	0	0,549	-0,1 +/- 0,2	0	0,689	0,0 +/- 0,0	0	0,000
D36	0,0 +/- 0,2	0	0,975	-0,2 +/- 0,2	-1	0,358	0,0 +/- 0,0	0	0,000
D39	0,1 +/- 0,2	0	0,613	-0,1 +/- 0,2	0	0,714	0,0 +/- 0,0	0	0,000
UA: media +/- SEM									

Estos resultados también se ilustran en las figuras 6A y 6B.

Durante toda la ingesta del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Spectrocolorimeter® no mostraron variación relevante en el color de la piel en una zona no expuesta a los rayos UV: variaciones del 0 % al 2 %, no significativas en su mayor parte y no relevantes desde el punto de vista biológico (no visible a simple vista).

Mexamètre®

En la Tabla 6 a continuación se muestra un resumen de los resultados

Tabla 6

	Variación		p
	UA	%	
D10	3,0 +/- 1,3	5	0,027
D20	2,7 +/- 1,4	5	0,064
D30	3,4 +/- 1,4	6	0,020
D33	3,3 +/- 1,2	6	0,011
D36	2,1 +/- 1,2	4	0,088
D39	3,1 +/- 1,2	5	0,014
UA: media +/- SEM			

Estos resultados también se ilustran en la figura 7.

Después de 10 a 39 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Mexameter® mostraron un aumento muy leve en el índice melánico (variación significativa o en el límite de significación entre el 4 % y el 6 %).

3.3) CONCLUSIÓN

El objetivo principal de este estudio era evaluar el efecto del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), sobre la pigmentación de la piel con estimulación UV, después de 10, 20 y 30 días de utilización del producto estudiado.

En las condiciones de este estudio, el complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto) analizado:

- ha permitido mejorar significativamente la pigmentación inmediata 2 horas después de una exposición UVA. Este efecto se ha observado al mismo tiempo con el Spectrocolorimeter® y con el Mexameter®, a partir de los 10 días de utilización. La eficacia del producto sigue aumentando después de 30 días de utilización. Se observó un aumento en la pigmentación del 225 % con el Spectrocolorimeter® y del 106 % con el Mexameter®.
- ha permitido mejorar significativamente la pigmentación retardada después de una, dos o tres exposiciones a UVB/UVA. Este efecto se ha observado al mismo tiempo con el Spectrocolorimeter® y con el Mexameter®, a partir de los 30 días de utilización del producto. Después de 3 exposiciones UVB/UVA, se observó un aumento de la pigmentación del 206 % con el Spectrocolorimeter® y del 217 % con el Mexameter®.
- indujo un aumento muy leve en el índice melánico en una zona no expuesta a los rayos UV (variación de 4 % a 6 %). Este efecto se observó a partir de los 10 días de utilización del producto.

Cabe destacar que el producto ha sido muy apreciado por la mayoría de los sujetos. El 66 % de los sujetos encontraron su piel más dorada y el 76 % desearía continuar utilizando el producto. El grupo de personas sometido a ensayo toleró bien el producto. Los sujetos no refirieron ninguna sensación de incomodidad ni de intolerancia.

Ejemplo 4: Evaluación del efecto de un complejo proteomelánico bioasimilable según la invención sobre la pigmentación del cabello.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del complejo proteomelánico bioasimilable según la invención.

preparado en el ejemplo 1, sobre la pigmentación del cabello.

El estudio se realizó en 32 voluntarios que tenían el cabello blanco y/o canoso y que no se habían aplicado ningún tinte durante el período del estudio.

Las mediciones del color del cabello se realizan utilizando un Chromamètre® el D0, D60, D90 y D120 para evaluar el efecto del producto sobre la pigmentación del cabello.

4.1) Medidas con Chromamètre® a nivel del cabello.

El D0, el cabello se rasuró en una pequeña zona de 1 cm² para limitar perfectamente las mediciones durante todo el estudio. Esta pequeña zona se identificó en el CRF (siglas del inglés *Case Report Form*, hoja de recogida de datos) usando medidas en centímetros.

Se realizaron cuatro mediciones colorimétricas en la raíz del cabello que rodea la pequeña zona rasurada (en la parte superior, inferior, a la izquierda y a la derecha) usando un Chromamètre® MINOLTA CR-400, provisto de un cabezal de 8 mm de diámetro. El análisis de datos se efectuó sobre la media de las cuatro mediciones.

En los siguientes tiempos cinéticos, la pequeña zona se identificaba y rasuraba nuevamente, en caso de ser necesario, y se tomaban mediciones con Chromamètre® como se explicó anteriormente.

El Chromamètre® transforma los colores que están en el intervalo de percepción humana en un código numérico compuesto por tres parámetros:

- L*: representa la claridad (de oscuro a pálido),
- a*: representa la escala de verdes a rojos,
- b*: representa la escala de azules a amarillos.
- a* y b* son parámetros de cromaticidad y L* un parámetro de luminancia.

Por tanto es posible expresar, con el más mínimo detalle, las diferencias entre dos zonas que parecen ser del mismo color. Después de la calibración, las mediciones se realizan directamente sobre el cabello utilizando una fuente de luz de xenón pulsada y un sistema de doble haz para medir la luz emitida y corregir cualquier ligera desviación.

Este instrumento se utiliza habitualmente en cosmética y en medicina para medir el color de la piel o del cabello.

4.2) Desarrollo del ensayo

El D0:

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en el cabello desde la noche anterior.
- Definición y rasurado de una pequeña zona de 1 cm.² a nivel del cuero cabelludo.
- Mediciones con Chromamètre® en la raíz del cabello alrededor de esta pequeña zona. Se efectuaron cuatro mediciones en la parte superior, inferior, a la izquierda y a la derecha de la zona.

El D60, D90, D120:

- Los sujetos acuden al laboratorio sin haberse aplicado producto en el cabello desde la noche anterior.
- Localización de la pequeña zona definida el D0. Esta zona se rasura nuevamente.
- Mediciones con Chromamètre® en la raíz del cabello alrededor de esta pequeña zona. Se efectuaron cuatro mediciones en la parte superior, inferior, a la izquierda y a la derecha de la zona.

4.3) Análisis de datos

El análisis estadístico permite determinar la significación de las variaciones bajo el efecto del producto analizado.

La comparación se refiere a los valores obtenidos en los diferentes tiempos de evaluación.

La prueba utilizada es la prueba de la t de Student para datos relacionados. Las condiciones de aplicación son el carácter aleatorio y sencillo de las muestras y la normalidad de las diferencias de la población.

El principio de la prueba consiste en plantear una hipótesis nula (H0) sin diferencia entre el efecto medio en los diferentes tiempos de evaluación (d = 0) y una hipótesis alternativa H1 (nuestra hipótesis de investigación) de una diferencia entre los tiempos de evaluación (d > 0).

A continuación, se determina cuál es la probabilidad p de observar una separación entre los tiempos al menos tan grande como la que se ha observado si la hipótesis nula fuese cierta.

➤ Si $p < 5\%$, se rechaza la hipótesis nula. Se acepta entonces la hipótesis alternativa H1 de una diferencia significativa entre los tiempos de evaluación.

➤ Si $p > 5\%$, se acepta la hipótesis nula. Los datos no han permitido poner de manifiesto una diferencia significativa entre los tiempos de evaluación.

4.4) Resultados con Chromamètre®

En la tabla 7 a continuación se muestra un resumen de resultados

Tabla 7

	D60			D90			D120		
	Variación		p	Variación		p	Variación		p
	U.A.	%		U.A.	%		U.A.	%	
L*	-2,2 +/- 0,3	-4	<0,001	-4,9 +/- 0,4	-9	<0,001	-7,5 +/- 0,5	-13	<0,001
a*	-0,5 +/- 0,2	-8	0,012	-1,4 +/- 0,2	-22	<0,001	-2,4 +/- 0,2	-37	<0,001
b*	-0,6 +/- 0,1	-6	<0,001	-1,3 +/- 0,2	-14	<0,001	-2,0 +/- 0,2	-22	<0,001
UA: media +/- SEM									

Estos resultados también se ilustran en la figura 8.

Después de 30, 90 y 120 días de utilización del complemento alimentario que comprende el complejo proteomelánico bioasimilable (producto), las mediciones con Chromamètre® mostraron un color de cabello significativamente más oscuro (13 % después de 120 días de utilización, $p < 0,001$). El efecto aumenta con el tiempo de tratamiento. También se observó una variación de la tonalidad del cabello con un color menos "amarillo" y menos "rojo".

Ejemplo 5: Estudio de la bioasimilabilidad del complejo proteomelánico según la invención.

Sistema experimental

La evaluación de la bioasimilabilidad del complejo proteomelánico según la invención y de los diferentes componentes de dicho complejo en los fluidos gástricos e intestinales simulados, se estudió siguiendo el procedimiento de tubos de diálisis [D.W. Bollinger y col.; J. Agric. Food Chem.; 2005. 53: 3287-3294].

Digestión con pepsina.

Se mezcló una cantidad de 100 mg de complejo melanoproteico según la invención con 1,0 ml de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,85 N.

A continuación, se añadieron 24 000 U de pepsina porcina por ml y la muestra se incubó durante 120 min. en un baño de agua a 39 °C.

Digestión con pancreatina.

Al final de la digestión con pepsina, las muestras se transfirieron a tubos de diálisis de 18 cm de longitud y a la pepsina digesta se le añadieron 1,3 ml de una solución de NaHCO_3 0,8 M que contenía 22,60 mg de pancreatina porcina/ml (8 x USP). Los tubos de diálisis se sellaron en cada extremo con pinzas. Tubos de diálisis de porosidad superior a 120 00 y de un diámetro de 1,6 cm (Sigma Chemical Co., referencia D6191) se colocaron en un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de tampón succinato 0,05 M. Las muestras se incubaron durante 4 h a 39 °C con agitación a 120 ciclos por minuto.

Después de la incubación de la pancreatina, los componentes disponibles en el medio de diálisis se determinaron mediante diferentes procedimientos experimentales.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media de los resultados de los 3 experimentos.

Determinación cuantitativa de proteínas por el método de Lowry.

Se mezcló 1 ml de cada muestra con 4,5 ml de reactivo de Lowry (9,8 ml de Na_2CO_3 (2 % de p/v), 0,1 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 % p/v) y 0,1 ml de tartrato de $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+$ (0,5 % p/v). La solución se mezcló y se incubó durante 10 min. Después, se añadieron 0,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu 1 N y se dejaron reaccionar durante 30 minutos. Por último, la absorbancia se midió a 660 nm [O.H. LOWRY y col.; J. Biol. Chem.; 1951. 193: 265-275]

Los datos se expresan en porcentaje de proteínas disponibles.

Determinación cuantitativa de la tirosina por HPLC

El sistema HPLC consistía en una bomba Jasco BIP-je, en un inyector Rheodyne 7725 (bucle de 230 µl) y en un detector UV Jasco UVDEC-100 V.

Para la determinación se utilizó una columna de tipo C8 (0,4 x 15 mm) provista de partículas de 5 µm de tamaño. La separación se controló a 210 nm. Se utilizó una fase móvil que consistía en una mezcla de acetonitrilo-agua (5:95 v/v). El caudal se mantuvo a 1,5 ml min⁻¹.

La identificación de los picos se efectuó comparando el tiempo de retención de las muestras con una solución patrón de tirosina.

Los datos se expresan en porcentaje de tirosina disponible.

Determinación cuantitativa de la melanina por métodos espectrofotométricos.

Después de las incubaciones de pepsina y pancreatina, la cantidad de melanina disponible se determinó espectrofotométricamente usando un espectrómetro Jasco V-530 UV/Vis, según el método desarrollado por Ozeki y sus colaboradores [Ozeki, H. y col.; 1996. Spectrophotometric characterization of eumelanin and pheomelanin in hair. Pigment Cell Research 9:265-270 u Ozeki, H. y col.; 1995. Chemical characterization of hair melanins in various coat-color mutants of mice. Journal of Investigative Dermatology 105:361-366], método ligeramente modificado por los inventores.

Las muestras obtenidas después de las digestiones con pepsina y pancreatina, se secaron al vacío y el resto se redisolvió en Solueno-350 (Perkin Elmer), una base orgánica fuerte formulada con tolueno. Las muestras se analizaron para determinar las absorbancias a 500 nm (A500). Los valores de A500 corresponden a la melanina total contenida en la muestra.

Las concentraciones totales de melanina se calcularon con referencia a una curva de calibrado establecida a partir de cinco soluciones estándar de melanina diferentes (0,02, 0,04, 0,06, 0,08 y 0,10 mg/ml) en Solueno-350 (véase la Figura 10). La absorbancia de las soluciones estándar se midió a 500 nm para establecer una curva de calibrado y el coeficiente de correlación (R²), la pendiente y la ordenada de la ecuación de regresión obtenida se calcularon por el método de mínimos cuadrados.

Los valores de absorbancia de las muestras melánicas obtenidos mediante los estudios de biodisponibilidad *in vitro* efectuados por triplicado, y los porcentajes de biodisponibilidad correspondientes, se recogen en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8.

Abs	Biodisponibilidad (%)
0,7535	8,92
0,7832	9,31
0,8526	10,06

El valor final de la biodisponibilidad *in vitro* (9,43 ± 0,68 %) se calculó como la media de los datos obtenidos de los tres experimentos efectuados (Tabla 1).

Los datos se expresaron en porcentaje de melanina disponible.

RESULTADOS

Los resultados se muestran en la figura 9.

El método de tubos de diálisis es un método rápido y rentable para evaluar la bioasimilabilidad de los diferentes tipos de compuestos.

Como se explicó anteriormente, los componentes del complejo proteomelánico se determinan utilizando diferentes procedimientos experimentales.

Más concretamente, para la cuantificación del contenido de proteínas en la digesta gastrointestinal, se utilizó la usó la dosis de Lowry.

Se midió una bioasimilabilidad de las proteínas en los líquidos gastrointestinales simulados de 40,5 ± 0,8 %.

La cuantificación de la tirosina se realizó mediante análisis por HPLC comparando los cromatogramas de las muestras con los de una solución estándar de tirosina.

De este modo se determinó una bioasimilabilidad igual a $1,85 \pm 0,2 \%$.

Finalmente, la bioasimilabilidad de la melanina en los fluidos gastrointestinales simulados se determinó mediante análisis espectrofotométrico.

De este modo se determinó una bioasimilabilidad igual a $9,43 \pm 0,7 \%$.

La bioasimilabilidad total del complejo proteomelánico se determinó matemáticamente añadiendo el contenido de proteínas, tirosina y melanina; esto da como resultado un valor de la bioasimilabilidad del complejo proteomelánico de 49,93 (figura 9).

Ejemplo 5: Evaluación del efecto de un complejo proteomelánico bioasimilable según la cohesividad celular en la piel humana.

La medición del contenido de proteínas de la piel permite evaluar la cohesividad de las células.

La evaluación de la cohesividad de la piel en función de su contenido de proteínas es útil para evaluar la eficacia de la cohesividad celular debido al tratamiento recibido por los sujetos del estudio. Una disminución en la cantidad de proteínas segregadas en la superficie de la piel, refleja un aumento de la cohesividad celular.

El contenido de proteínas (cohesividad) se mide utilizando el método de la lámina Corneofix utilizando el kit Corneofix® F 20 (Courage + Khazaka electronic GmbH), según el protocolo del proveedor. De este modo, para determinar el contenido de proteínas, se obtuvieron muestras no invasivas de 10 capas del estrato córneo de un rostro limpio.

El método de Lowry (Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A Lewis Farr y Rose J. Randall, «Protein measurement with the Folin phenol reagent», J. biol. Chem., vol. 193, n° 1, 1951, págs. 265-275) se utiliza para medir el contenido de proteínas. Dicho método se basa en la capacidad del cobre para unirse a las proteínas en condiciones alcalinas, y cuando se añade el reactivo de Folin, se forma un complejo con la proteína que puede verse a 550 nm.

Los sujetos se dividen en 2 grupos, un grupo de control y un grupo denominado "activo".

El grupo "activo" [■] recibió, durante 90 días, 500 mg/día en 1 ingesta de complejo melanoproteico según la invención.

El grupo de "Control" [□] recibió, durante 90 días, 500 mg/día en 1 ingesta de maltodextrina.

Los sujetos del grupo de control (que no habían recibido este complejo proteomelánico según la invención), no mostraron ninguna mejoría en el contenido de proteínas de la piel desde el inicio hasta el día 90. Los sujetos que habían recibido complejo proteomelánico según la invención, mejoraron significativamente su contenido de proteínas de la piel desde el inicio hasta el día 90. Se observa hasta al menos un 15,9 % de proteínas captadas en las láminas Corneofix® F 20 ($P < 0,001$).

La ingesta de complejo proteomelánico también mejoró significativamente el contenido de proteínas de la piel en comparación con el control el día 90 con una diferencia de 19,7 % en comparación con el control ($P < 0,001$).

El 95,8 % de los sujetos del grupo activo mostró una mejora de la cohesividad de la piel.

Los resultados de este estudio se muestran en la figura 11.

REIVINDICACIONES

1. Complejo proteomelánico bioasimilable, que comprende al menos un extracto proteico, soluble o parcialmente soluble y melanina, siendo dicho complejo proteomelánico bioactivo y comprendiendo dicho extracto proteico al menos un resto de cisteína o al menos un resto de tirosina o al menos un resto de cisteína y un resto de tirosina, caracterizado por que las proteínas y/o los fragmentos de proteínas de dicho extracto proteico se han vuelto solubles injertando al menos un grupo sulfito en al menos un átomo de azufre de al menos una cisteína de dichas proteínas y/o de dichos fragmentos de proteínas de dicho extracto proteico.
2. Complejo proteomelánico según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho extracto proteico es soluble en agua de 0,1 a 99 %, preferentemente de 0,1 a 75 %, muy preferentemente de 0,1 a 50 %.
3. Complejo proteomelánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que comprende entre 0,01 % y 99,99 % de extracto proteico, preferentemente entre el 1 % y el 95 %, muy preferentemente entre el 30 % y el 95 %, incluso más preferentemente entre el 50 % y el 95 %.
4. Complejo proteomelánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende entre 0,01 % y 99,99 % de melanina, preferentemente entre el 0,5 % y el 20 %, muy preferentemente entre el 1 % y el 15 %.
5. Complejo proteomelánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el extracto proteico comprende péptidos de longitud comprendida entre 2 y 1 000 aminoácidos, preferentemente entre 2 y 500 aminoácidos, muy preferentemente entre 2 y 100 aminoácidos.
6. Complejo proteomelánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicho extracto proteico y/o dicha melanina proceden de las mismas o de diferentes fuentes proteicas y melánicas, tomadas por separado o proceden de una misma fuente melanoproteica, ventajosamente utilizada en solitario.
7. Complejo proteomelánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicho extracto proteico y/o dicha melanina proceden de lana, vello, cabello, garras, cuernos o incluso plumas, plantas, frutas, tinta de cefalópodo, bacterias o fuentes sintéticas, preferentemente, procedentes de lana.
8. Complejo proteomelánico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicho extracto proteico y/o dicha melanina proceden de lana de ovejas, muflones, cabras, gamuzas, takines, cabras montesas, íbices, thars, jharales, seraus, gorales, buey almizclero, urial, baral, rebeco, conejo, liebre, pica, llama, alpaca, guanaco, vicuña, camello, dromedario, yac o de plumas como las de la urraca, cuervo o mirlo, preferentemente de la lana de oveja, muy preferentemente de oveja negra ("oveja de Ouessant", "negra de Velay", "nariz negra de Valais", "oveja negra de Thibar", "oveja negra galesa de montaña", "Balwen" "Zwartbles" o "Hebridean").
9. Procedimiento de preparación de un complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en una primera etapa, la parte proteica de dicha fuente melanoproteica se vuelve solubilizable, ventajosamente hidrosolubilizable, injertando al menos un grupo sulfito en el átomo de azufre de las cisteínas de dichas proteínas y/o fragmentos de proteínas (péptidos), y en una segunda etapa, la parte proteica de la mezcla obtenida en la primera etapa se fracciona en péptidos, para obtener una mezcla que comprenda el complejo proteomelánico investigado.
10. Procedimiento de preparación de un complejo proteomelánico bioasimilable según la reivindicación 9, caracterizado por que comprende además una tercera etapa en la que para obtener una mezcla que comprenda el complejo proteomelánico investigado, se añade melanina a la mezcla obtenida en la segunda etapa.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que el injerto de un sulfito en el átomo de azufre de las cisteínas se realiza mediante S-sulfonación, ventajosamente mediante sulfitolisis oxidativa.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que la segunda etapa de hidrólisis se realiza mediante hidrólisis ácida, hidrólisis básica, hidrólisis enzimática, o incluso mediante oxidación parcial utilizando ácido peracético, peróxido de hidrógeno o un equivalente, preferentemente mediante hidrólisis enzimática.
13. Un complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para estimular la melanogénesis.
14. Un complejo proteomelánico bioasimilable según la reivindicación 13, para estimular la melanogénesis en la piel, el cabello, el vello, la lana, las faneras, el cerebro, el conducto auditivo interno y/o los ojos.
15. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para proteger a los organismos vivos de las radiaciones ionizantes o no ionizantes.

- 5 16. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para proteger a los organismos vivos de la radiación ultravioleta, lejana o cercana (A, B o C), de la luz visible, de la radiación infrarroja (A, B y/o C) o incluso de los rayos X.
- 10 17. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para atrapar los radicales libres.
18. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para combatir el envejecimiento tisular.
- 15 19. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para aumentar la regeneración celular, la elasticidad y/o la hidratación de la piel, para intensificar la cohesión celular, especialmente en la piel y/o en las faneras.
- 20 20. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para combatir, las arrugas y arruguitas de la piel.
21. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para luchar contra el estrés oxidativo y tratar o prevenir sus consecuencias.
22. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para atrapar los metales pesados, especialmente en el organismo humano.
- 25 23. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, para prevenir y/o tratar la maculopatía relacionada con la edad (MRE) y/o la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE).
- 30 24. Complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que está en cualquier forma farmacéutica conocida, especialmente en forma de un polvo, un líquido una crema, una loción, un parche o incluso de un pulverizador.
25. Utilización de al menos un complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8 o 13 a 24, para la preparación de composiciones cosméticas, dermatológicas, farmacéuticas o incluso alimentarias.
- 35 26. Composición, ventajosamente cosmética, dermatológica, farmacéutica o incluso alimentaria, que comprende al menos un complejo proteomelánico bioasimilable tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 8 o 13 a 24.

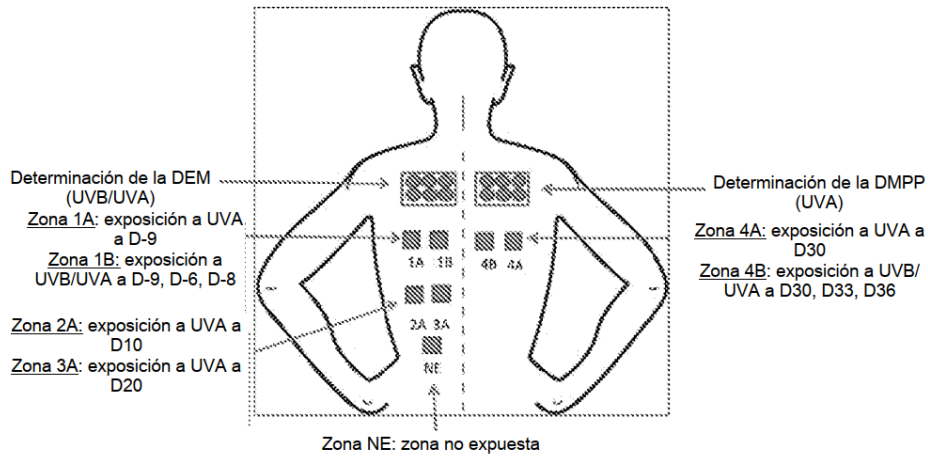


Figura 1

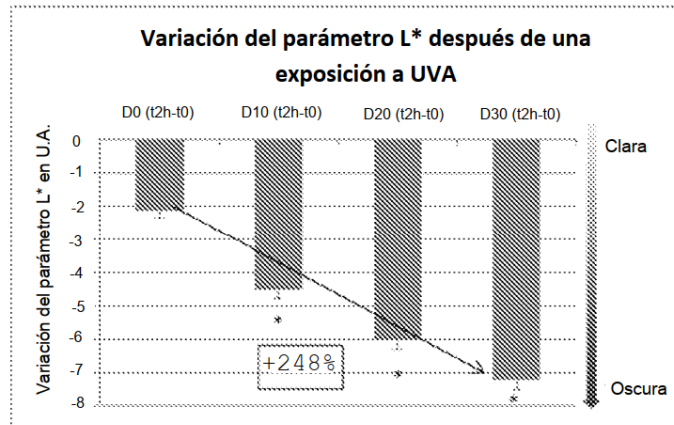


Figura 2A

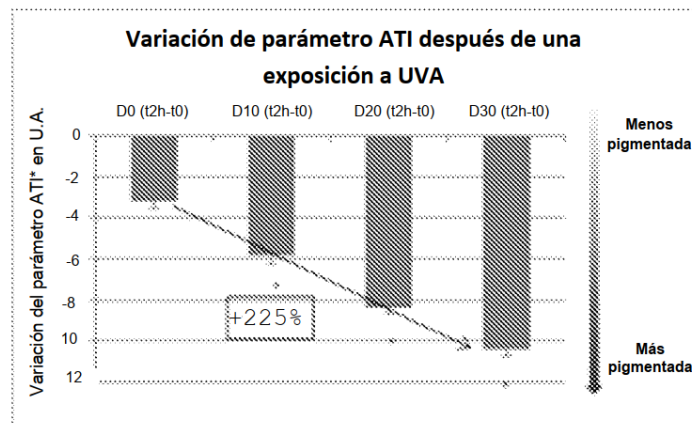


Figura 2B

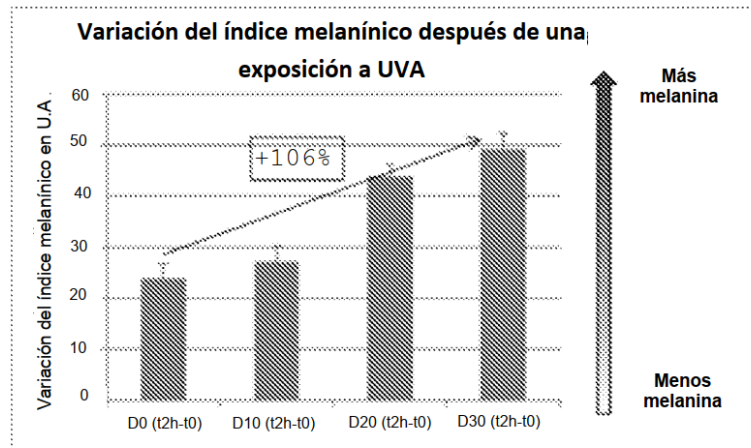


Figura 3

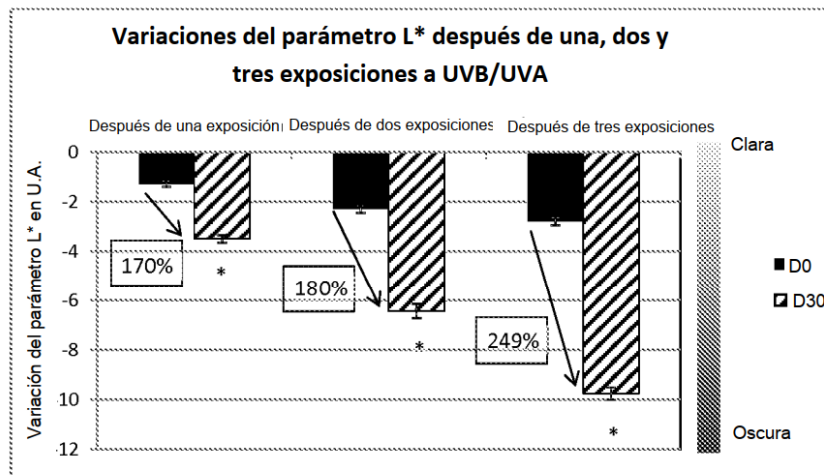


Figura 4A

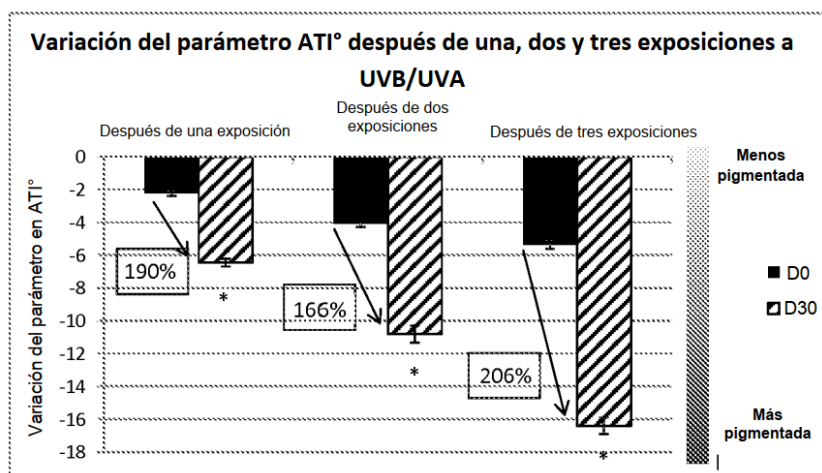


Figura 4B

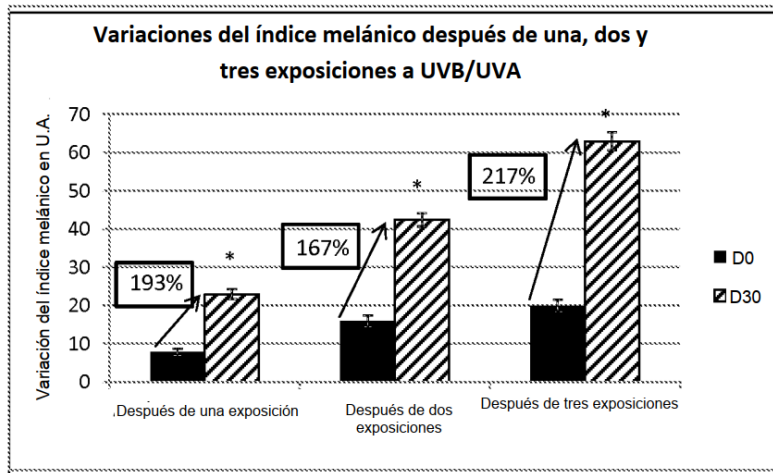


Figura 5

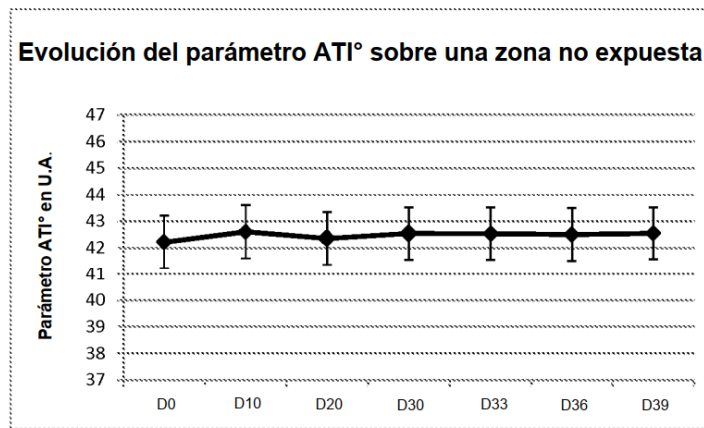


Figura 6A

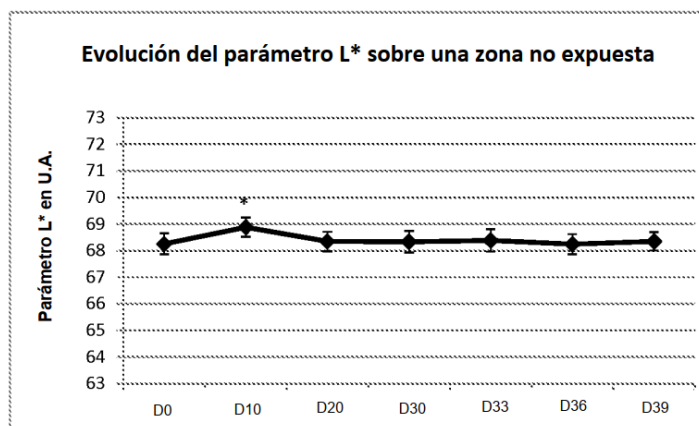


Figura 6B

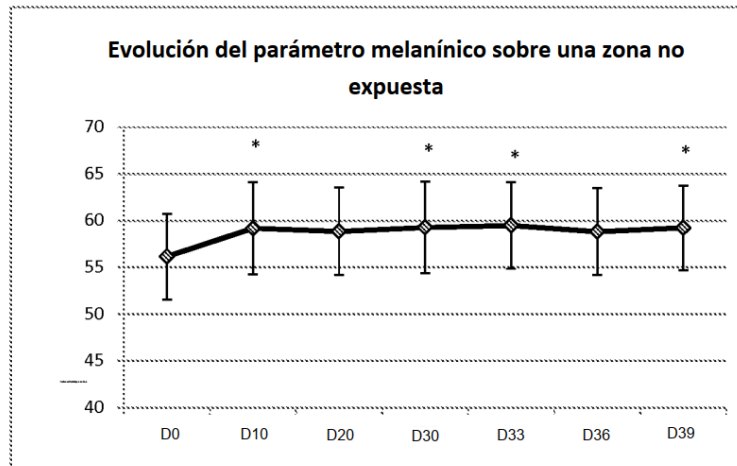


Figura 7

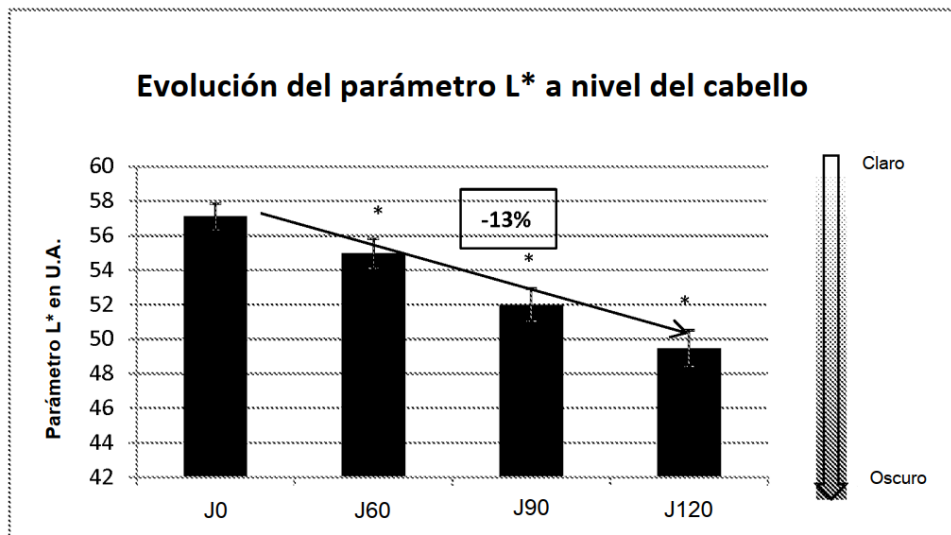


Figura 8

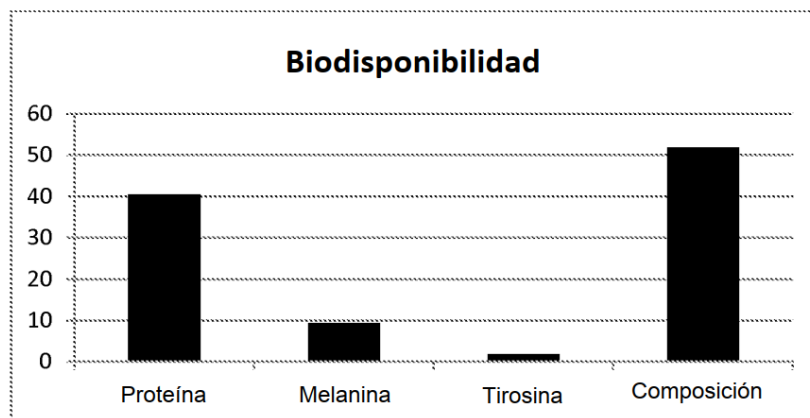


Figura 9

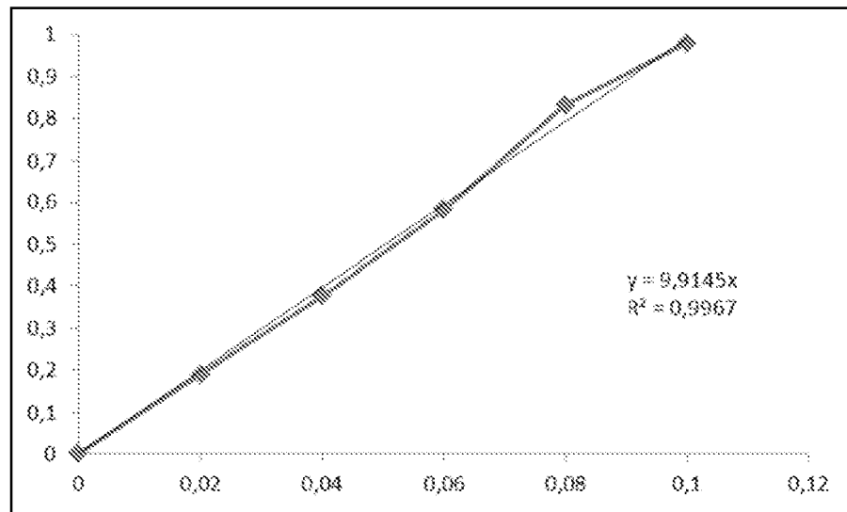


Figura 10

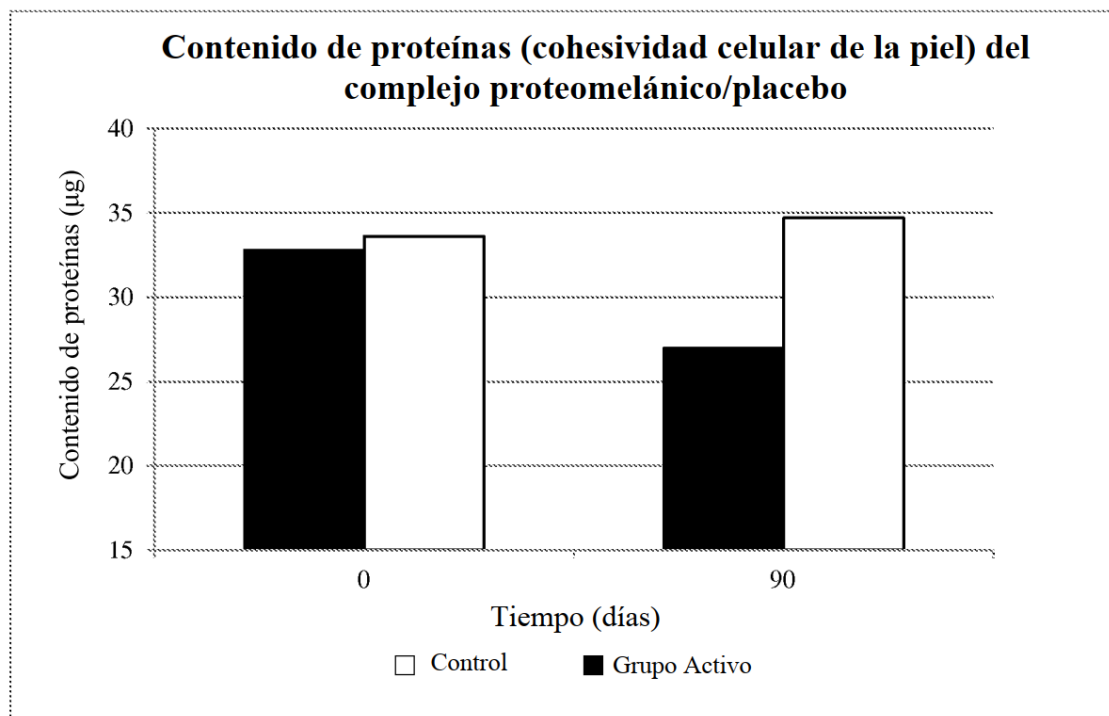


Figura 11