

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 19.07.00.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 25.01.02 Bulletin 02/04.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LABORATOIRES SEROBIOLOGI-  
QUES Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : JEANMAIRE CHRISTINE, PAULY  
MARC et DANOUX LOUIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : NUSS.

⑤④ UTILISATION DE FRACTIONS PROTEINIQUES SOLUBLES POUR LA STIMULATION DE LA SYNTHÈSE DE  
FILAGGRINE.

⑤⑦ La présente invention propose l'utilisation de fractions  
protéiniques solubles extraites, qui

(a) lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en  
présence de dodécylsulfate de sodium, présentent au moins  
une bande dans des conditions non-réductrices;

(b) possèdent une masse moléculaire moyenne dans la  
gamme allant de 500 à 500 000 Daltons;

(c) sur la base de la proportion de protéines, présentent  
une teneur totale en azote comprise entre 0,005 et 0,5 %  
en masse et une teneur en aminoazote comprise entre  
0,0005 et 0,01 % en masse;

(d) sont solubles dans l'eau et dans des électrolytes a-  
queux, mais cependant insolubles dans l'éthanol ou l'acéto-  
ne;

(e) forment des précipités dans des solutions aqueuses  
avec de l'acide trichloroacétique ou de l'acide picrique,  
et sont destinées à stimuler la synthèse de filaggrine.

FR 2 811 894 - A1



## DESCRIPTION

La présente invention concerne le domaine des cosmétiques, et concerne l'utilisation d'extraits spéciaux destinés à stimuler la synthèse de filaggrine.

La pro-filaggrine forme le principal constituant des grains de  
5 kératohyaline des cellules de la couche cornée de l'épiderme tissulaire. La pro-filaggrine, synthétisée et phosphorylée dans le stratum granulosum (couche granuleuse), représente une protéine possédant une masse moléculaire d'environ 400 kDa et sert de précurseur à la biosynthèse de  
10 filaggrine, en laquelle elle est transformée lors du processus de maturation des kératinocytes par déphosphorylation et protéolyse. La filaggrine possède une masse moléculaire d'environ 37 kDa, est chargée de façon cationique et se trouve habituellement dans la couche cornée de l'épiderme tissulaire [cf. Sarret et al., Path. Biol. 37(4), 297(1989)].

On sait que la filaggrine joue un rôle important dans l'agrégation  
15 de kératine dans la partie inférieure de la couche cornée. Les produits de la dégradation de la filaggrine, à savoir des acides aminés libres et leurs dérivés, empêchent la perte d'eau du stratum corneum. Par conséquent, la filaggrine représente un réservoir essentiel de facteurs naturels d'hydratation, ou F.N.H. ("natural moisturising factors, NMF). Une  
20 diminution de la concentration en filaggrine, qui peut en particulier être conditionnée par l'âge, provoque par conséquent l'apparition d'une peau sèche et la formation de rides.

Le problème posé à la présente invention a par conséquent consisté à découvrir de nouvelles substances actives grâce auxquelles la  
25 synthèse de filaggrine peut être stimulée, pour contrer ainsi le dessèchement de la peau.

L'objet de la présente invention est l'utilisation de fractions protéiniques solubles extraites, qui

- (a) lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, présentent au moins une bande dans des conditions non-réductrices ;
  - (b) possèdent une masse moléculaire moyenne dans la gamme allant de 500 à 500 000, de préférence de 5 000 à 100 000 Daltons ;
  - (c) sur la base de la proportion de protéines, présentent une teneur totale en azote comprise entre 0,005 et 0,5 % en masse et une teneur en aminoazote comprise entre 0,0005 et 0,01 % en masse ;
  - (d) sont solubles dans l'eau et dans des électrolytes aqueux, mais cependant insolubles dans l'éthanol ou l'acétone ;
  - (e) forment des précipités dans des solutions aqueuses avec de l'acide trichloroacétique ou de l'acide picrique,
- et sont destinées à stimuler la synthèse de filaggrine.

De façon surprenante, on a découvert que l'administration de fractions protéiniques qui remplissent les conditions mentionnées précédemment, qui contiennent éventuellement au moins un inhibiteur de protéase et qui sont en particulier extraites de graines de pois de terre, ou voandzou, stimulent la biosynthèse de filaggrine et contrent par conséquent l'effet du dessèchement et la formation des rides.

#### Extraits protéiniques solubles

On utilise de préférence pour la synthèse de filaggrine des fractions extraites de graines de légumineuses, en particulier des graines de pois de terre. Il s'agit concernant le pois de terre ou noix Bambara (*Voandzeia subterranea* (L) Thouars) d'une graine d'origine africaine qui est utilisée localement comme légume. Il s'agit d'un légume d'origine africaine qui est essentiellement cultivé par les agriculteurs en tant que "culture anti-faim", sa caractéristique essentielle étant son insensibilité à la sécheresse et aux sols pauvres, ainsi que son aptitude à pouvoir pousser dans des conditions qui ne sont pas adaptées à la culture de l'arachide.

Les graines de voandzou, qui représentent un aliment complet, contiennent des protéines, des hydrates de carbone et des lipides, et peuvent être exploitées à différents stades de maturité. Leur composition chimique est la suivante (g/100 g de farine ou 100 g de graines sèches) :

- 5 - Protéines : 16 à 21 % en masse,
- Amidon : 39 à 49,5 % en masse,
- Tannins (exprimés en acide tannique) : 0,36 à 0,94 % en masse,
- Lipides : 5 à 7,3 % en masse,
- Cendres : 3,65 % en masse.

10 On sait que les graines de *Voandzeia subterranea* contiennent des inhibiteurs de protéase, et que l'efficacité d'inhibiteur de trypsine évaluée selon la technique de Kakadé est, selon la littérature, de 6,7 à 15,4 TUI/mg de farine, les propriétés fonctionnelles de l'isolat de protéine de cette graine ayant été analysées à des fins alimentaires. On renvoie à  
15 cet égard à la demande internationale de brevet WO 98/42305 au nom de la demanderesse, par laquelle on connaît l'utilisation d'extraits de voandzou en cosmétique. D'autres informations relatives à la préparation des extraits sont également mentionnées dans ce document.

En outre, il s'est avéré avantageux dans le cadre de la présente  
20 invention d'utiliser des fractions de ce type qui contenaient au moins un inhibiteur de protéase, lesdites fractions étant avantageusement intégrées dans des produits ou compositions cosmétiques.

#### Exemples

Exemple de préparation 1. On a dispersé 250 g de graines broyées de  
25 *Voandzeia subterranea* dans 2,5 l d'eau distillée. Après 15 minutes d'agitation, on a ajusté la valeur du pH à 7,5 par ajout de soude caustique, et on a procédé à l'extraction à 30 °C sur une durée de 1 h. Après centrifugation (10 min, 5 000 g), on a jeté la phase supérieure huileuse et on a purifié la phase aqueuse de couleur jaune par ultrafiltration (rétention  
30 à 15 000 Da, facteur de concentration 2 à 10) ou diafiltration avec de l'eau. La fraction ainsi obtenue possédait une teneur en résidu sec de 2 % en

- masse et une concentration en protéine de 10 g/l (réaction du biuret). On a ensuite séché la fraction par lyophilisation. L'activité anti-trypsine du produit sec était de 150 TUI/mg (déterminée selon la méthode de Kakadé) ou, sur la base du résidu sec de la solution, de 2 000 TUI/ml.
- 5 Exemple de préparation 2. On a dispersé 400 g de graines broyées de *Voandzeia subterranea* dans 4 l d'eau distillée et on a procédé à l'extraction tel qu'indiqué dans l'exemple de préparation 1. On a alors obtenu 3,2 l d'une solution presque incolore présentant une teneur en résidu sec de 3 % en masse et une concentration en protéine de 20 g/l.
- 10 On a ajusté le pH de la solution à 4,5 par ajout d'acide minéral, puis on a agité pendant 30 min. Après centrifugation (10 min, 5 000 g), on a jeté la phase supérieure huileuse et on a purifié la phase aqueuse de couleur jaune par ultrafiltration (rétention à 15 000 Da, facteur de concentration 2 à 10) ou diafiltration avec de l'eau. La fraction ainsi obtenue possédait une
- 15 teneur en résidu sec de 2 % en masse et une concentration en protéine de 10 g/l (réaction du biuret). On a ensuite séché la fraction par lyophilisation. L'activité anti-trypsine du produit sec était de 150 TUI/mg (déterminée selon la méthode de Kakadé) ou, sur la base du résidu sec de la solution, de 2 000 TUI/ml.
- 20 Exemple de préparation 3. On a soumis l'extrait obtenu selon l'exemple de préparation 1 à une perméation de gel sur superose 12 HR, colonne FPLC de la société Pharmacia. On a alors obtenu 5 fractions :
- Fraction 1 : Masse moléculaire > 500 000 Da
- Fraction 2 : Masse moléculaire entre 100 000 et 500 000 Da
- 25 Fraction 3 : Masse moléculaire entre 30 000 et 100 000 Da
- Fraction 4 : Masse moléculaire entre 5 000 et 30 000 Da
- Fraction 5 : Masse moléculaire < 5 000 Da
- Test de croissance cellulaire. On a utilisé pour les tests d'efficacité suivants d'une part un extrait selon l'exemple de préparation 2 et d'autre
- 30 part la formulation disponible dans le commerce Filladyn® de la société Laboratoires Sérobiologiques, S.A., qui contenait 60 % de l'extrait selon

l'exemple de préparation 2 ainsi que des polyols, de la gomme de xanthane et des sels tampon.

- On a analysé comme suit l'influence des préparations sur des fibroblastes humains, en testant leur aptitude à la régénération des cellules :
- 5 On a inoculé à des fibroblastes humains un milieu de culture standard (DMEM) comportant 10 % de sérum de veau fœtal. Après une durée d'incubation de 1 jour à 37 °C et une concentration en CO<sub>2</sub> de 5 %, on a échangé le milieu de culture contre un milieu sans sérum de veau fœtal, qui contenait cependant les préparations test dans des
- 10 concentrations comprises entre 0,03 et 0,6 % en volume. Après une durée d'incubation de 3 jours, on a déterminé la croissance cellulaire par détermination de la teneur en protéines cellulaires (méthode selon Bradford) et de l'ATP essentiel à la phosphorylation de la pro-filaggrine (méthode selon Vasseur). Les résultats sont résumés dans le tableau 1.
- 15 On indique la proportion relative, en pourcentage, sur la base d'un témoin sans ajout de substance test (= 100 %).

**Tableau 1**

Croissance cellulaire

| Concentration test<br>(% en volume) | Extrait de pois de terre |     |
|-------------------------------------|--------------------------|-----|
|                                     | Protéine                 | ATP |
| 0                                   | 100                      | 100 |
| 0,03                                | 111                      | 100 |
| 0,1                                 | 121                      | 111 |
| 0,3                                 | 143                      | 114 |
| 0,6                                 | 171                      | 157 |

- 20 Stimulation de la synthèse de filaggrine (in vitro). On a inoculé à des fibroblastes humains un milieu de culture témoin (DMEM) comportant 10 % de sérum de veau fœtal. Après une durée d'incubation de 4 jours à 37 °C et une concentration en CO<sub>2</sub> de 5 %, on a échangé le milieu de culture contre un milieu sans sérum de veau fœtal, qui contenait

cependant les préparations test dans des concentrations comprises entre 0,025 et 2 % en volume. Après une durée d'incubation de 6 à 7 jours, on a déterminé la synthèse de pro-filaggrine/filaggrine selon un procédé immunohistochimique, à savoir en utilisant un anticorps monoclonal qui reconnaît la pro-filaggrine ou la filaggrine. Les résultats sont résumés dans le tableau 2.

Stimulation de la synthèse de filaggrine (ex vivo). On a désinfecté des biopsies humaines issues de chirurgie esthétique et on les a placées en culture (DMEM, 37 °C). On a appliqué topiquement les substances test (0,3 ou 5 % en masse) sous la forme d'un hydrogel (5 traitements en l'espace de 3 jours). Après 3 jours, on a préparé de fines biopsies et on les a congelées dans de l'azote liquide. On a ensuite de nouveau analysé la formation de (pro-)filaggrine selon un procédé immunohistochimique. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

On a effectué la détermination de la (pro-)filaggrine par procédé microscopique au moyen d'un scanner laser confocal. Les enregistrements ont été convertis en valeurs et évalués au moyen du logiciel Quantimet G500IW de la société Leica. On indique la proportion, en pourcentage, de la surface qui est occupée par la (pro-)filaggrine dans les sections histologiques.

Tableau 2

Synthèse de (pro-)filaggrine

| Concentration<br>test (% en<br>volume) | Extrait de pois de terre |              |              | Filladyn®     |              |              |
|----------------------------------------|--------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
|                                        | t = 0 d                  | t = 6 d      | t = 7 d      | t = 0 d       | t = 6 d      | t = 7 d      |
| 0                                      | $0,7 \pm 0,1$            | $7 \pm 0,9$  | $7 \pm 0,6$  |               |              |              |
| 0,025                                  | $0,7 \pm 0,1$            | $22 \pm 1,3$ | $28 \pm 1,7$ |               |              |              |
| 0,1                                    | $0,7 \pm 0,1$            | $34 \pm 2,1$ | $34 \pm 1,0$ |               |              |              |
| 2                                      |                          |              |              | $0,7 \pm 0,1$ | $20 \pm 1,4$ | $33 \pm 1,3$ |

Tableau 3

5 Synthèse de (pro-)filaggrine

| Témoin       | Placebo      | Extrait de pois de<br>terre | Filladyn®    |
|--------------|--------------|-----------------------------|--------------|
| $16 \pm 1,5$ | $18 \pm 0,5$ | $22 \pm 1,2$                | $21 \pm 1,6$ |

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée au mode de réalisation décrit.  
Des modifications restent possibles, notamment du point de vue de la  
constitution des divers éléments ou par substitution d'équivalents  
10 techniques, sans sortir pour autant du domaine de protection de  
l'invention.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation de fractions protéiniques solubles extraites, qui
  - (a) lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, présentent au moins une bande dans des conditions non-réductrices ;
  - (b) possèdent une masse moléculaire moyenne dans la gamme allant de 500 à 500 000 Daltons ;
  - (c) sur la base de la proportion de protéines, présentent une teneur totale en azote comprise entre 0,005 et 0,5 % en masse et une teneur en aminoazote comprise entre 0,0005 et 0,01 % en masse ;
  - (d) sont solubles dans l'eau et dans des électrolytes aqueux, mais cependant insolubles dans l'éthanol ou l'acétone ;
  - (e) forment des précipités dans des solutions aqueuses avec de l'acide trichloroacétique ou de l'acide picrique,
- pour la stimulation de la synthèse de filaggrine.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'on utilise des fractions qui contiennent au moins un inhibiteur de protéase.
3. Utilisation selon les revendications 1 et/ou 2, caractérisée en ce que l'on utilise des fractions qui sont obtenues par extraction de graines de légumineuses.
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'on utilise des fractions que l'on obtient par extraction des graines du pois de terre, ou noix Bambara, ou voandzou (*Voandzeia subterranea*).



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2811894

N° d'enregistrement  
national

FA 590545  
FR 0009486

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Revendications<br>concernées | Classement attribué<br>à l'invention par l'INPI      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                 |                              |                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | FR 2 761 264 A (LABORATOIRES<br>SEROBIOLOGIQUES)<br>2 octobre 1998 (1998-10-02)<br>* le document en entier *                                                                                                                                                                       | 1-4                          | A61K7/48<br>A61K35/78<br>A61K38/00<br>A61K38/56      |
| D                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | & WO 98 42305 A<br>1 octobre 1998 (1998-10-01)<br>---                                                                                                                                                                                                                              |                              |                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | FREIS ET AL.: "new original botanical<br>proteins: composition,<br>biological/biophysical effects and<br>interest in care cosmetology"<br>SEIFE-ÖLE-FETTE-WACHSE,<br>vol. 126, 6 avril 2000 (2000-04-06), pages<br>17-30, XP000993470<br>Augsburg, DE<br>* le document en entier * | 1-4                          |                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | FR 2 778 565 A (SILAB)<br>19 novembre 1999 (1999-11-19)<br>* le document en entier *                                                                                                                                                                                               | 1-4                          |                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | US 5 322 839 A (VOEGELI ET AL.)<br>21 juin 1994 (1994-06-21)<br>* le document en entier *                                                                                                                                                                                          | 1-4                          | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHÉS (Int.CL.7)<br>A61K |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 94 18944 A (COLETICA)<br>1 septembre 1994 (1994-09-01)<br>* le document en entier *                                                                                                                                                                                             | 1-4                          |                                                      |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Examineur                    |                                                      |
| 1 juin 2001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Fischer, J.P.                |                                                      |
| <p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br/>A : arrière-plan technologique<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons</p> <p>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                              |                                                      |

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

**RECHERCHE INCOMPLÈTE  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 590545  
FR 0009486

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait  
l'objet de recherches complètes:  
aucune

Revendications ayant fait  
l'objet de recherches incomplètes:  
1-4

Raison:

Les revendications 1-4 ont trait à une très grande variété de composés (fraction protéiniques solubles extraites pour la stimulation de la synthèse de la filaggrine). Un fondement et/ou un exposé ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible.

D'autre part la revendication 1 a trait à l'utilisation d'un produit défini au moyen des paramètres suivants:

- a) lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium, présentation d'au moins une bande dans des conditions non-réductrices.
- b) masse moléculaire moyenne dans la gamme allant de 500 à 500000 Daltons.
- c) teneur totale en azote comprise entre 0,005 et 0,5 % en masse et une teneur en aminoazote comprise entre 0,0005 et 0,01% en masse.
- d) solubles dans l'eau et dans les électrolytes aqueux et insolubles dans l'éthanol ou l'acétone.
- e) formation de précipités dans des solutions aqueuses avec de l'acide trichloroacétique ou de l'acide picrique.

Le manque de clarté découlant de l'utilisation de ces paramètres est tel qu'une recherche significative et complète est impossible.

Par conséquent la recherche a été effectuée pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les exemples et les extraits de plantes cités dans la description et les revendications (graines du pois de terre ou noix Bambara, ou Voandzeia Subterranea) et dans l'esprit général de l'invention.