



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1004915A3

NUMERO DE DEPOT : 09001039

Classif. Internat. : C08H C07K A61K

Date de délivrance le : 23 Février 1993

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 05 Novembre 1990 à 14H05 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : HEYL CHEMISCH-PHARMAZEUTISCHE FABRIK GmbH & CO. KG. Goerzallee 253, D-1000 BERLIN 37(REPUBLIQUE FEDERALE D'ALLEMAGNE)

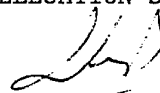
représenté(e)(s) par : DONNE Eddy, BUREAU M.F.J. BOCKSTAEL, Arenbergstraat, 13 - B 2000 ANTWERPEN.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : COLLAGENE, PROCEDE POUR LE PREPARER, ET AGENT COSMETIQUE LE CONTENANT.

PRIORITE(S) 07.11.89 DE DEA 3937076

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 23 Février 1993
PAR DELEGATION SPECIALE :


WUYTS L.
Directeur

COLLAGENE, PROCEDE POUR LE PREPARER, ET AGENT COSMETIQUE LE
CONTENANT

L'invention concerne un collagène dont les résidus de méthionine sont au moins partiellement sulfoxydés, un procédé pour le préparer et un agent cosmétique le contenant.

Le collagène joue un rôle très important dans le tissu conjonctif des mammifères. Il représente de 25 à 30 % de l'ensemble des protéines du corps. On le trouve en particulier dans la peau, les tendons, les ligaments, les vaisseaux sanguins, les cartilages et les os.

Des études ont montrées que le collagène ne représente pas un composé unique. Jusqu'à présent, on en a caractérisé au moins douze types différents. Ces divers types de collagène, qui possèdent des propriétés différentes et auxquels incombent des fonctions biologiques elles-aussi différentes dans l'organisme, sont caractérisés

en particulier par leurs compositions en acides aminés, leurs séquences d'acides aminés, les ponts disulfures entre les chaînes, le pas de la triple hélice, et leurs comportements dans un champ électrique. Par immunolocalisation à l'aide d'anticorps monoclonaux, on a pu également étudié leur répartition dans les différents tissus. C'est ainsi que dans la peau, on trouve surtout les types I et III de collagène. Ces deux types de collagène présentent des compositions très semblables en acides aminés.

En raison de sa composition en acides aminés, le collagène occupe une place particulière parmi les protéines. Il est particulièrement riche en glycocolle. De plus, c'est la seule protéine qui contient l'acide aminé hydroxyproline. Sa teneur en soufre est relativement faible, puisque par exemple, le collagène de type I ne contient pas de cystéine, et que la méthionine est le seul autre acide aminé soufré.

C'est sous la forme de procollagène que les molécules de collagène sont synthétisées dans les fibroblastes et amenées dans les vides intercellulaires. C'est là que s'opère la transformation en collagène, par dégradation du procollagène. Par réticulation entre les différentes molécules de collagène, il se forme enfin du collagène insoluble, tel qu'on le trouve surtout dans le tissu conjonctif âgé. En règle générale, le collagène est constitué par trois chaînes polypeptidiques (masse

moléculaire d'environ 100.000 pour chaque chaîne), qui, prises isolément, forment chacune une hélice à pas gauche, et s'enroulent ensemble en une triple hélice à pas droit. Les deux extrémités de la molécule sont constituées de télépeptides globulaires. Ces télépeptides jouent un rôle important dans la réticulation naturelle des molécules de collagène. On peut facilement les éliminer par voie enzymatique (par exemple à l'aide de pepsine ou de trypsine). La biochimie, la biologie, la biosynthèse et le métabolisme du collagène sont décrits dans beaucoup de travaux scientifiques et d'articles de revues, et par exemple dans les suivants :

Berg, A. ; Einsatz von Proteinen in Kosmetika (Utilisation de protéines en cosmétique) ; Parfümerie und Kosmetik 65 (7), 391 - 401 (1984)

Hein, R., Nehrlich, A., Müller, P., Krieg, T. ; Angeborene Erkrankungen des Kollagens. Klinische Heterogenität und molekulare Defekte (Affections congénitales du collagène) (Hétérogénéité cliniques et défauts moléculaires) ; Internist 26, 420-428 (1985)

Krieg, T., Hein, R., Hatamochi, H., Aumailley, M. ; Molecular and clinical aspects of connective tissue (Aspects moléculaires et cliniques du tissu conjonctif) ; Eur. J. Clin. Invest. 18 (2), 105-123 (1988)

Lindner, H. ; Kollagen in der Kosmetik (Le collagène en cosmétique) ; Parfümerie und Kosmetik 65 (6), 340-346 (1984)

Mayne, B. ; Preparation and applications of monoclonal antibodies to different collagen types (Préparation et applications d'anticorps monoclonaux pour divers types de collagène) ; Clin. Biochem. 21 (2), 111-115 (1988)

Mayne, R., Burgeson, R.E. (Eds.) ; Biology of extracellular matrix : Structure and function of collagen types (Biologie de la matrice extracellulaire : Structure et fonction des types de collagène) ; Academic Press (1987)

Nimni, M.E. ; Collagen : Structure, function and biomaterial properties (Le collagène : Structure, fonction et propriétés en tant que biomatériau) ; NATO ASI, Ser. E 116, 365-383 (1986)

Parkany M. ; Polymers natural origin as biomaterials. 2. Collagen and gelatin (Polymères naturels en tant que biomatériaux .2. Le collagène et la gélatine) ; dans : Macromol. Biomater. ; G.W. Hastings, P. Ducheyne (Eds.) ; CRC, Boca Raton, Floride ; 111-117 (1984)

Piez, K.A. ; Collagen (Le collagène) ; Encycl. Polym. Sci. Eng. 3, 699-727 (1985)

Prockop, D.J., Kivirikko, K.I. ; Heritable diseases of collagen (Affections héréditaires du collagène) ; New Engl. J. Med. 311 (6), 376-386 (1984)

On pourra également se reporter aux publications qui sont citées en référence dans ces articles.

Le collagène présente de nombreuses propriétés avantageuses. En raison de sa capacité élevée de fixation

de l'eau, il joue un rôle important dans la régulation de la teneur en eau de la peau. Il exerce en outre des actions adoucissantes et calmantes. Il stimule la croissance des fibroblastes et accélère la cicatrisation. De plus, il possède également des propriétés hémostatiques.

En raison de ses propriétés avantageuses et de ses très bonnes possibilités d'adaptation, le collagène est à l'heure actuelle utilisé en médecine dans un grand nombre d'indications (par exemple matériau de suture, matériau d'implant, pansement de blessure, arrêt d'hémorragie).

On peut extraire le collagène de différentes sources de collagène, afin de l'utiliser en cosmétique. On l'extrait principalement du tissu conjonctif de jeunes animaux ou d'embryons d'animaux. On utilise de préférence de la peau de veau, dont le collagène se distingue à peine, du point de vue physiologique, du collagène humain. Le collagène tiré de la peau de veau est constitué, pour au moins 90 %, de collagène de type I, et il contient en outre une faible quantité de collagène de type III. On l'utilise soit sans l'avoir modifié, sous la forme de collagène soluble natif, soit après l'avoir modifié par voie enzymatique, sous forme d'atélocollagène ou d'hydrolysate de collagène, ou bien après l'avoir modifié par voie chimique, sous forme de désamidocollagène, d'ester méthylique de collagène, de succinyl-collagène ou de guanidino-collagène.

Les procédés d'extraction du collagène et de modification enzymatique ou chimique du collagène sont

connus et décrits dans un grand nombre de publications et de brevets. Mais il est important, lors de ces opérations, d'éviter une dénaturation de la structure hélicoïdale du collagène. Il faut en outre opérer dans les conditions les plus stériles possibles. A ce propos, on pourra se reporter à l'article de revue de Light, N.D., ; Collagen in skin : Preaparation and analysis (Le collagène dans la peau : préparation et analyse), dans "Methods in skin research (Méthodes en recherche dermatologique)" ; (D. Skerrow, C.J. Skerrow Eds.), John Wiley and Sons Ltd., 559-586 (1985), ainsi qu'aux brevets DE - 20 64 604 et 26 16 939, aux Demandes de Brevets Européens N° 0 052 288, 0 083 868, 0 124 659, 0 132 979, 0 214 035, 0 224 453, 0 233 770 et 0 284 789, et aux Brevets US N° 4 404 033, 4 582 640 et 4 687 518 ; on pourra également se reporter aux publications indiquées dans cet article et dans ces brevets.

La demande DE-20 64 604, ainsi que le brevet US correspondant N° 3 991 184, décrit des produits d'entretien de la peau qui contiennent du collagène soluble natif, possédant une structure de collagène non modifiée et très peu réticulée. Le collagène soluble natif est obtenu à partir de la peau de jeunes animaux ou d'embryons d'animaux, par extraction dans un milieu aqueux faiblement acide, à basse température. La masse moléculaire du collagène ainsi obtenu vaut de 5000 à 50.000.

Le but de l'invention est de préparer des

substances actives cosmétiques, à base de collagène, dont les modes d'action soient bien définis et qui ne présentent aucun effet secondaire indésirable. En outre, leur préparation doit être simple et économiquement réalisable.

On a maintenant trouvé que du collagène comportant des résidus sulfoxydés de méthionine possède des propriétés cosmétiques avantageuses.

L'objet de l'invention est constitué par des collagènes qui sont caractérisés en ce qu'au moins une partie des résidus méthionines contenus dans le collagène se présente sous forme de méthionine-sulfoxyde. En outre, les dérivés de collagène selon l'invention ne sont pas altérés par rapport aux collagènes respectifs utilisés comme produits de départ. Les dérivés de collagène selon l'invention ne sont pratiquement plus sensibles à l'oxygène, puisque leurs atomes de soufre sont déjà oxydés. En outre, comparés aux collagènes initiaux, ils présentent une meilleure solubilité dans l'eau, en particulier dans les milieux aqueux acides, de sorte que les dérivés de collagène selon l'invention peuvent être incorporés en une concentration plus élevée dans les produits d'application.

Les dérivés de collagène selon l'invention sont remarquablement compatibles avec la peau : on n'a pas constaté de réactions allergiques. Ils forment une couche protectrice sur la peau et les cheveux.

On peut réaliser la préparation des dérivés de collagène selon l'invention à partir de toutes les sources

habituelles de collagène. On utilise de préférence la peau de veau, dont le collagène se distingue à peine du collagène humain, du point de vue physiologique, ainsi que du collagène soluble natif, du collagène constitué, pour au moins 90 %, de collagène de type I, du collagène de type I ou III, de l'atélocollagène ou du désamidocollagène. On peut également utiliser des produits intermédiaires provenant de l'industrie de traitement du collagène.

On effectue la préparation du collagène conforme à l'invention en traitant un matériau contenant du collagène (par exemple de la peau de veau ou des produits intermédiaires provenant de l'industrie de traitement du collagène) en présence d'un oxydant, pour en tirer le collagène. Si l'on souhaite réaliser la préparation d'un dérivé de collagène, on effectue en même temps la formation de ce dérivé. C'est ainsi que l'on effectue, pour préparer un atélocollagène à partir de peaux de veaux, la dégradation enzymatique par des protéases, par exemple trypsine ou pepsine, en présence d'un oxydant, de sorte que l'on obtient un atélocollagène sulfoxydé. De la même façon, pour préparer un désamidocollagène, on effectue la désamidation en présence d'un oxydant, de sorte que l'on obtient un désamidocollagène sulfoxydé.

On peut également réaliser la préparation du collagène conforme à l'invention à partir de collagène isolé, ou à partir de collagènes, d'un dérivé isolé, en traitant ce dérivé avec un oxydant approprié.

Les oxydants appropriés sont ceux qui provoquent une sulfoxydation des atomes de soufre des résidus de méthionine contenus dans le collagène, sans modifier par ailleurs ce collagène. Des exemples de tels oxydants sont le peroxyde d'hydrogène, les peroxydes de métaux alcalins comme le peroxyde de sodium, le perborate de sodium, les peracides et les peresters ; des hypohalites, comme des hypohalites alcalins, en particulier un hypochlorite alcalin, par exemple l'hypochlorite de sodium, et les composés qui libèrent in situ des hypohalites ; enfin des chloramines, par exemple la chloramine-T. On utilise cet oxydant à raison de 1,5 à 2,0 équivalents, en particulier de 1,6 à 1,9 équivalents, par équivalent de méthionine. Si nécessaire, l'excès d'oxydant est détruit à la fin de la réaction de la façon habituelle, par addition d'un réducteur, ou bien éliminé par relargage du collagène avec NaCl et redissolution à l'aide d'un tampon citrate.

La réaction s'effectue de préférence en milieu acide, en particulier à pH 2-5, mieux encore à pH 3-4. Il est avantageux d'ajouter un tampon, par exemple un tampon citrate, pour maintenir la valeur du pH dans l'intervalle souhaité.

La température de réaction se situe de préférence dans le domaine de 0 à 20°C, en particulier de 10 à 20°C, et mieux encore de 15 à 17°C. En général, on laisse l'oxydant agir sur le collagène pendant au moins 1 jour, en particulier pendant 2 à 6 jours, et mieux encore pendant 3

à 4 jours.

De préférence, le matériau contenant du collagène est traité au préalable avec l'oxydant, par exemple par aspersion d'une solution de l'oxydant ou immersion dans cette solution. On utilise avantageusement de 0,05 à 0,5 équivalent d'oxydant par kilo de matériau contenant du collagène (teneur en collagène de 30 % environ), en solution aqueuse à 0,05-0,5 % en poids. De préférence, ce traitement préalable dure de 1 à 10 heures, et en particulier de 2 à 5 heures. De préférence, on opère à une température située dans le domaine allant de 20 à 50°C, en particulier de 30 à 50°C, ou bien on asperge le matériau contenant le collagène, à l'état surgelé, avec l'oxydant et on le laisse dégeler.

Dans les conditions ménagées indiquées, on réalise la sulfoxydation des résidus de méthionine dans le collagène, sans que se forment alors les fonctions sulfones correspondantes. Le rendement vaut de 91 à 96 %, par rapport au collagène utilisé. Cette sulfoxydation est réversible : par exemple, on peut transformer à nouveau les dérivés conformes à l'invention en les matériaux de départ, par réaction avec du mercaptoéthanol.

Les collagènes contiennent en général de 5 à 6 résidus de méthionine pour 1000 résidus d'acides aminés. Dans les collagènes conformes à l'invention, de 2 à 5, et de préférence de 2 à 3 de ces résidus de méthionine sont sulfoxydés (voir le tableau ci-dessous).

Les collagènes conformes à l'invention présentent une masse moléculaire d'environ 270.000 à environ 300.000 (déterminée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, dans les conditions indiquées par U.K. Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)).

Pour une caractérisation plus poussée et une estimation de la pureté des collagènes, on peut appliquer les procédés habituels biochimiques et physicochimiques, par exemple HPLC, électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, analyse d'acides aminés, analyse d'azote, techniques de cartographie des peptides, coupure par le bromure de cyanogène, dispersion rotatoire optique. En particulier, on peut déterminer entre autres la teneur en hydroxyproline, l'acide aminé caractéristique du collagène. La proportion de celui-ci vaut 14 % dans du collagène provenant de la peau (Nimni, M. E., (1986), Nato Asi, Ser. E. 116, 365-383).

Dans le procédé conforme à l'invention, les produits se présentent sous forme de solution aqueuse. Cette solution peut être transformée telle quelle, éventuellement après concentration, en agent cosmétique. Les solutions sont pratiquement stériles, en raison de l'utilisation de l'oxydant, de sorte que l'on peut éventuellement renoncer à y incorporer un agent de conservation.

A partir des solutions indiquées, on peut obtenir les dérivés de collagène conformes à l'invention de façon

habituelle, par exemple par séchage par pulvérisation, lyophilisation, etc. Les produits solides obtenus de cette manière peuvent eux aussi être transformés en agents cosmétiques.

Selon un procédé particulièrement préféré, on part de peaux de veaux abattus. Les peaux utilisées sont de préférence surgelées et désinfectées, par exemple à l'aide de chloramine T.

Les peaux sont ensuite réduites en pièces, à l'état dégelé ou de préférence à l'état surgelé. C'est pendant ce broyage ou à sa suite que les peaux subissent le traitement préalable avec l'oxydant utilisé selon l'invention, dans les conditions indiquées ci-dessus.

Les morceaux de peaux ayant subi le traitement préalable sont ensuite hachés menu dans un hachoir à viande. Le hachis obtenu est ensuite traité avec l'oxydant dans les conditions indiquées plus haut. De préférence, le hachis est soumis à une extraction avec un tampon citrate, à 15-17°C, sous agitation. Il est alors particulièrement avantageux de maintenir constante la concentration de l'oxydant, en particulier du peroxyde d'hydrogène, pendant l'étape d'extraction, et par exemple à une valeur de 80 à 120 ppm, en particulier de 90 à 110 ppm.

La bouillie de peaux ainsi obtenue est alors soumise à une filtration sur un sachet filtrant en tissu-filtre en coton plié en double. Si on le désire, on détruit l'excès d'oxydant de la façon habituelle. Le produit ainsi

obtenu présente une masse moléculaire d'environ 295.000 et donne le chromatogramme d'électrophorèse sur gel représenté sur la figure 1. L'analyse d'acides aminés de ce produit donne les résultats indiqués dans le tableau donné plus loin.

L'invention concerne également des produits cosmétiques, qui contiennent des dérivés de collagène conformes à l'invention. Ces produits cosmétiques sont en particulier des produits d'entretien, qui peuvent se présenter sous les formes de crème, masque, produits groupés, lotion, gel, lait, etc... A cette fin, les dérivés de collagène conformes à l'invention sont incorporés dans des supports et auxiliaires cosmétiques habituels.

Les supports appropriés sont par exemple des huiles, comme l'huile de vaseline, l'huile d'avocat, l'huile de paraffine et autres similaires. Les auxiliaires utilisables sont par exemple des émulsifiants, comme des mélanges d'huiles et/ou d'alcools gras ou d'alcools polyéthoxylés, de savons et similaires ; des épaississants, comme de l'alginate de sodium, de la gomme arabique, de la gomme de xanthane, des dérivés de cellulose et similaires ; des gaz propulseurs pour formulation d'aérosols, comme le dioxyde de carbone et l'azote ; des solvants, comme des alcools et similaires.

Les produits cosmétiques conformes à l'invention peuvent également contenir des constituants habituellement incorporés dans les produits de ce type. Parmi ces

constituants, on citera par exemple parfums, colorants, conservateurs, antioxydants, séquestrants, plastifiants, émulsifiants et similaires.

Les produits cosmétiques conformes à l'invention peuvent également contenir des adjuvants cosmétiquement actifs. Parmi ceux-ci, on citera par exemple les agents hydratants, les caroténoïdes, les stabilisants, les agents régulateurs de l'humidité, les agents régulateurs du pH, les agents filtrant les rayons UV-A et UV-B, et similaires.

Les produits cosmétiques conformes à l'invention contiennent en général d'environ 0,01 à 5 %, de préférence d'environ 0,1 à 2 % en poids de dérivé de collagène, par rapport au poids total du produit cosmétique.

Les exemples suivants illustrent la préparation des produits actifs conformes à l'invention.

Exemple 1

a) 250 kg de peaux surgelées de veaux (masques, désinfectés à la chloramine T) sont grossièrement broyés, à l'état surgelé, et simultanément aspergés d'une solution de 2500 ml d'eau oxygénée (30 %) dans 500 l d'eau. On laisse ensuite les morceaux dégeler, pendant environ 2 à 3 heures. On enlève l'eau qui s'est rassemblée, et on lave éventuellement encore une fois les morceaux avec 500 l d'eau. Après les avoir séparés de l'eau, on fait passer les morceaux de peau dans un hachoir.

Dans un récipient de 400 l, on dispose 100 l d'une solution tampon citrate 0,128 M (pH 3,6), à 15-17°C, et 400

ml d'eau oxygénée (30 %). On ajoute ensuite 50 kg de peaux passées au hachoir. Après 30 minutes d'agitation à 15-17°C, on mesure la concentration de peroxyde d'hydrogène. En ajoutant une quantité supplémentaire d'eau oxygénée, on maintient la concentration de peroxyde d'hydrogène à 100 ppm environ. Grâce à ce mode opératoire, on obtient des solutions qui contiennent de 0,4 à 0,8 % de collagène dissous, c'est-à-dire de 600 g à 1200 g par charge. La constance de la concentration de peroxyde d'hydrogène, ici de 100 ppm, correspondant à 40 ml pour 150 l de charge, est d'une importance cruciale pour que le collagène qui passe en solution, et qui n'a pas encore réagi dans la phase hétérogène, puisse se transformer en un collagène comportant des résidus de méthionine sulfoxydés. De plus, cette concentration de peroxyde d'hydrogène fournit un milieu bactériostatique optimal. On agite la suspension pendant 3 jours à 15-17°C, puis on la dilue avec 100 l de tampon et on l'agite pendant 24 h.

Par centrifugation à 10.000 t/min, on obtient une solution de collagène soluble natif, légèrement opalescente, que l'on rassemble avec d'autres extraits, de sorte que la solution contient 0,225 % de collagène soluble (300 µg d'hydroxyproline/ml). On détruit l'excès de peroxyde d'hydrogène selon des procédés connus.

Selon une variante, pour éliminer le peroxyde d'hydrogène, on ajoute du chlorure de sodium au produit de centrifugation, jusqu'à ce que la concentration de chlorure

de sodium vaille 6 % en poids, on sépare par centrifugation les fibrilles précipitées, et on les met enfin en solution dans du tampon citrate 0,128 M.

La conservation s'effectue avec des conservateurs habituels, par exemple du Phénonip (mélange d'esters p-hydroxybenzoates avec du phénoxyéthanol).

La masse moléculaire du collagène sulfoxydé, déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, vaut environ 295.000.

Le produit est caractérisé par le fait que, lors de l'analyse d'acides aminés, le sulfoxyde de méthionine apparaît dans le diagramme d'élution avant l'acide aspartique, et que d'autant moins de méthionine est décelable plus loin.

Pour l'analyse d'acides aminés, on prélève une fraction aliquote de la solution et on y ajoute du chlorure de sodium, jusqu'à ce que la solution contienne 6 % en poids de chlorure de sodium. Le collagène précipité est séparé par centrifugation, dialysé à trois reprises contre de l'acide acétique 0,1 M, puis lyophilisé.

Pour l'analyse d'acides aminés, on hydrolyse 5 mg de collagène lyophilisé dans 10 ml d'HCl 6 N, sous atmosphère d'azote, pendant 2 heures, à $110 \pm 1^\circ\text{C}$. On élimine sous vide l'excès d'acide chlorhydrique, on reprend le résidu dans un tampon d'élution, et on dose les acides aminés par chromatographie par échange d'ions.

TABLEAU 1

Composition en acides aminés, en nombre de résidus
pour 1000

	Collagène		Exemple 1	Exemple 2	Exemple 3
	Type I	Type III	Collagène sulfoxydé natif	Atélo- collagène sulfoxydé	Désamido- collagène sulfoxydé
acide aspartique	45	48	47	48	49
sulfoxyde de méthionine	-	-	3	3	2
méthioninesulfone	-	-	-	-	-
hydroxyproline	93	118	84	86	84
thréonine	17	15	17	17	19
sérine	33	37	33	35	36
acide glutamique	74	70	77	77	80
proline	132	105	130	127	125
glycine	323	344	303	332	307
alanine	107	90	114	111	113
valine	21	14	23	23	24
méthionine	5	5	3	3	4
isoleucine	13	12	19	13	14
leucine	24	18	40	26	30
tyrosine	2	2	1,5	5	6
phénylalanine	12	8	8	8	9
lysine	29	28	30	32	30
histidine	5	8	8	8	6
arginine	52	46	52	54	47

b) Dans les conditions de réaction indiquées ci-dessus, on peut transformer du collagène soluble natif en un collagène correspondant, comportant des résidus sulfoxydés de méthionine (1000 g de collagène soluble natif dans 100 l de tampon citrate 0,128 M (pH 3,6) et 400 ml d'eau oxygénée ; les conditions de traitement et la température sont celles indiquées dans l'exemple 1).

Exemple 2

a) On peut faire réagir les résidus de peau obtenus selon l'exemple 1, ou bien également de la peau fraîche hachée, en présence de peroxyde d'hydrogène, comme on l'a décrit dans l'exemple 1, avec des enzymes comme la trypine ou la pepsine (voir les références indiquées plus haut), pour obtenir un atélocollagène comportant des résidus de méthionine sulfoxydés. La masse moléculaire du produit obtenu, déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS, vaut environ 270.000, et sa composition en acides aminés est indiquée dans le tableau 1.

b) De façon analogue et dans les conditions de réaction mentionnées dans l'exemple 1b, on peut transformer un atélocollagène pur en un atélocollagène comportant des résidus de méthionine sulfoxydés.

Exemple 3

a) On peut faire réagir des résidus de peau obtenus dans l'exemple 1, ou bien encore de la peau fraîche hachée, en présence de peroxyde d'hydrogène, comme on l'a décrit dans l'exemple 1, avec des alcalis ou des acides (voir les

références indiquées plus haut) pour obtenir un désamidocollagène comportant des résidus de méthionine sulfoxydés. La masse moléculaire du produit obtenu, déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, vaut environ 295.000, et sa composition en acides aminés est indiquée dans le tableau 1.

b) de façon semblable et dans les conditions de réaction mentionnées dans l'exemple 1b, on peut transformer du désamidocollagène pur en désamidocollagène comportant des résidus de méthionine sulfoxydés.

La figure 1 représente les chromatogrammes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, pour les produits obtenus selon les exemples 1 à 3. On a réalisé cette électrophorèse sur un gel à 7 %, dans les conditions indiquées par U.K. Laemmli dans Nature, 227, 680-685 (1970). Dans ces conditions, il se produit une dégradation partielle de la triple hélice du collagène, de sorte que le chromatogramme révèle des chaînes γ ayant une masse moléculaire d'environ 300 kD, des chaînes β ayant une masse moléculaire d'environ 200 kD et des chaînes α ayant une masse moléculaire d'environ 100 kD. Les produits de dégradation protéolytique ne sont pas décelables.

Dans les exemples suivants, on peut utiliser les dérivés de collagène des exemples 1 à 3 sous forme de la solution obtenue ou sous forme de produits solides.

Exemple 4

Crème pour la peau :

dérivé de collagène	0,1 g
polyoxyéthylène-cétyl-éther	1,5 g
alcool cétylique	2 g
huile de vaseline	6 g
huile d'avocat	4 g
lanoline	4 g
parfum, autant que nécessaire	
eau stérile, complément à	100 g

Exemple 5

Lait corporel :

dérivé de collagène	1 g
huile de paraffine	5 g
huile de vaseline	7 g
conservateur	0,15 g
stéarate de triéthanolamine	5 g
acide stéarique	3 g
eau stérile, complément à	100 g

Exemple 6

Lotion pour la peau :

dérivé de collagène	0,5 g
conservateur	0,15 g
polyvinylpyrrolidone	3 g
éthanol	20 g
eau stérile, complément à	100 g

Exemple 7

gel pour la peau :

dérivé de collagène	0,5 g
conservateur	0,15 g
éthanol	40 g
propylène-glycol	42 g
acide acrylique polymérisé (Carbopol 940, de la firme Goodrich Chemical Co.)	1 g
eau stérile, complément à	100 g

REVENDICATIONS

1. Collagène, caractérisé en ce qu'au moins une partie des résidus de méthionine contenus dans ce collagène se présente sous forme de sulfoxyde de méthionine.

2. Collagène selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il dérive d'un collagène choisi parmi un collagène soluble natif, un atélocollagène, un désamidocollagène et un collagène constitué, pour au moins 90 %, de collagène de type I.

3. Collagène selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que, pour 1000 résidus d'acides aminés dans ce collagène, de 2 à 5, en particulier 2 ou 3 résidus de méthionine sont sulfoxydés.

4. Procédé de préparation d'un collagène selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on transforme un matériau contenant du collagène, en présence d'un oxydant approprié, en un collagène ou un dérivé de collagène, ou bien en ce que l'on traite du collagène isolé ou un dérivé isolé de collagène avec un oxydant approprié.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on utilise, comme oxydant, du peroxyde d'hydrogène ou un peroxyde de métal alcalin.

6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que l'on utilise l'oxydant en une quantité de 1,5 à 2,0 équivalents, en particulier de 1,6 à 1,9 équivalent, par équivalent de méthionine.

7. Procédé selon l'une des revendications 4 à 6,

caractérisé en ce que l'on utilise, comme produit de départ, de la peau de veau, un collagène soluble natif, un atélocollagène ou un désamidocollagène.

8. Procédé selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que l'on opère en milieu acide, en particulier à un pH de 2 à 5, en particulier de 3 à 4.

9. Procédé selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisé en ce que l'on opère à une température située dans le domaine allant de 0 à 20°C, et en particulier de 10 à 20°C.

10. Procédé selon l'une des revendications 4 à 9, caractérisé en ce que l'on traite au préalable, avec l'oxydant, le matériau contenant du collagène.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que, avant le traitement préalable, le matériau contenant du collagène est réduit en petits morceaux, à l'état surgelé.

12. Agent cosmétique, contenant au moins un collagène selon l'une des revendications 1 à 3 ou un collagène obtenu selon l'une des revendications 4 à 11.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 9001039
BO 2817

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
Y	GB-A-915 441 (ARMOUR AND COMPANY) *Document en entier* ---	1-11	C08H1/06 C07K15/00 A61K7/48
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 21, 26 Mai 1969, Columbus, Ohio, US; abstract no. 93211C, POURADIER J. ET AL.: 'METHIONINE SULFOXIDE OF GELATINS.' page 15 ; * abrégé *	1-11	
A	DIE NAHRUNG vol. 19, no. 4, 1975, pages 341 - 347; E. DAVIDKOVA ET AL.: 'EINIGE ERKENNTNISSE UEBER DIE WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN PEROXIDEN UND KOLLAGEN.'		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C08H C07K A61K C09H
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
LA HAYE		LENSEN H, W, M,	
14 JANVIER 1992			
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 9001039
BO 2817

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

14/01/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A-915441		Aucun	