



(72) MAINGAULT, Martine, FR

(71) INSTITUT FRANÇAIS DU PETROLE, FR

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> A61K 31/70, A61K 7/021, A61K 7/48

(30) 1995/06/28 (95/08.085) FR

(54) **UTILIZATION OF SOPHOROLIPIDS AS THERAPEUTICALLY  
ACTIVE SUBSTANCES OR COSMETIC PRODUCTS, IN  
PARTICULAR FOR THE TREATMENT OF THE SKIN**

(54) **UTILISATION COMME SUBSTANCES  
THERAPEUTIQUEMENT ACTIVES OU PRODUITS  
COSMETIQUES DES SOPHOROLIPIDES, EN PARTICULIER  
POUR LE TRAITEMENT DE LA PEAU**

(57) La présente invention concerne une nouvelle utilisation d'un composé sophorolipidique, des sels pharmaceutiquement acceptables de la forme acide du sophorolipide et de l'ester de la forme acide sophorolipide désacétylé comme substances thérapeutiquement actives dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal, et plus particulièrement comme activateur de macrophages, comme fibrinolytique, comme cicatrisant, comme desquamant et comme dépigmentant. Application au traitement de la peau.

(57) The present invention relates to a new utilization of a sophorolipidic compound, pharmaceutically acceptable salts of the acid form of the sophorolipid and of the ester of the deacetylated sophorolipid acid form as therapeutically active substances in a method for the therapeutic treatment of the human or animal body, and more particularly as activator of macrophages, as fibrinolytic agent, as healing agent, as desquamation agent and as depigmentation agent. Application to the treatment of the skin.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 31/70</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/01343</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 16 janvier 1997 (16.01.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/00991 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 25 juin 1996 (25.06.96) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 95/08085 28 juin 1995 (28.06.95) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT FRANÇAIS DU PÉTROLE [FR/FR]; 4, avenue de Bois-Préau, F-92506 Rueil-Malmaison (FR). <b>(72) Inventeur; et</b> <b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement):</b> MAINGAULT, Martine [FR/FR]; L'Humeau-du-Bray, F-49260 Saint-Macaire-du-Bois (FR). <b>(74) Mandataire:</b> ANDRÉEFF, François; Institut Français du Pétrole, 4, avenue de Bois-Préau, F-92506 Rueil-Malmaison (FR).	<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.          Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 13 mars 1997 (13.03.97)	
<b>(54) Title:</b> UTILIZATION OF SOPHOROLIPIDS AS THERAPEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCES OR COSMETIC PRODUCTS, IN PARTICULAR FOR THE TREATMENT OF THE SKIN		
<b>(54) Titre:</b> UTILISATION COMME SUBSTANCES THERAPEUTIQUEMENT ACTIVES OU PRODUITS COSMETIQUES DES SOPHOROLIPIDES, EN PARTICULIER POUR LE TRAITEMENT DE LA PEAU		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The present invention relates to a new utilization of a sophorolipidic compound, pharmaceutically acceptable salts of the acid form of the sophorolipid and of the ester of the deacetylated sophorolipid acid form as therapeutically active substances in a method for the therapeutic treatment of the human or animal body, and more particularly as activator of macrophages, as fibrinolytic agent, as healing agent, as desquamation agent and as depigmentation agent. Application to the treatment of the skin.</p>		
<b>(57) Abrégé</b>		
<p>La présente invention concerne une nouvelle utilisation d'un composé sophorolipidique, des sels pharmaceutiquement acceptables de la forme acide du sophorolipide et de l'ester de la forme acide sophorolipide désacétylé comme substances thérapeutiquement actives dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal, et plus particulièrement comme activateur de macrophages, comme fibrinolytique, comme cicatrisant, comme desquamant et comme dépigmentant. Application au traitement de la peau.</p>		

**UTILISATION COMME SUBSTANCES THERAPEUTIQUEMENT ACTIVES OU  
PRODUITS COSMETIQUES DES SOPHOROLIPIDES, EN PARTICULIER POUR LE  
TRAITEMENT DE LA PEAU.**

La présente invention concerne une nouvelle utilisation des sophorolipides appartenant au groupe des glycolipides.

Les sophorolipides encore appelés sophorosides sont généralement obtenus par fermentation d'un substrat au moyen d'une souche bactérienne appropriée. Des procédés de production de ces sophorolipides sont notamment décrits dans le brevet FR-A-2.399.438, la demande internationale PCT/FR91/01027 ou les brevets US-A-3.205.150 et US-A-3.312.684 et dans la publication JALS vol 65, n°9, 1988, 1460-1466, Asmer, H, Jetal; "Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. Ces sophorolipides sont constitués de plusieurs classes. On distingue en particulier les formes lactones acétylées ou non en position 6' et 6" du sophorose et les formes acides acétylées ou non en position 6' du sophorose. La chaîne lipidique varie quant à elle en fonction de la longueur de chaîne des acides la constituant, du nombre et de la position des insaturations et de la position de l'hydroxylation.

La demande de brevet WO 95/34282 décrit et exemplifie les sophorolipides en tant qu'agent de protection des cheveux et de la peau et notamment pour ses propriétés anti-radicalaires et anti-élastasiques.

Le brevet US 4305 961 décrit une composition cosmétologique comprenant, en tant qu'humidifiant, des groupements hydroxyalkyl étherifiés sur toutes les fonctions alcool secondaires et sur les groupes acétylés de sophorolipides.

Enfin, Inoue, dans Proc World conf. biotechnol fats oil, ind, 1988, 206-9 " Bio-surfactants in cosmetic applications" décrit les sophorolipides en tant qu'humidifiant de la peau.

Les sophorolipides ont déjà été utilisés sous la forme lactone en cosmétique dans le traitement des cheveux pour combattre

les pellicules comme le décrit le brevet EP-B209.783 et comme agent bacteriostatique dans les déodorants.

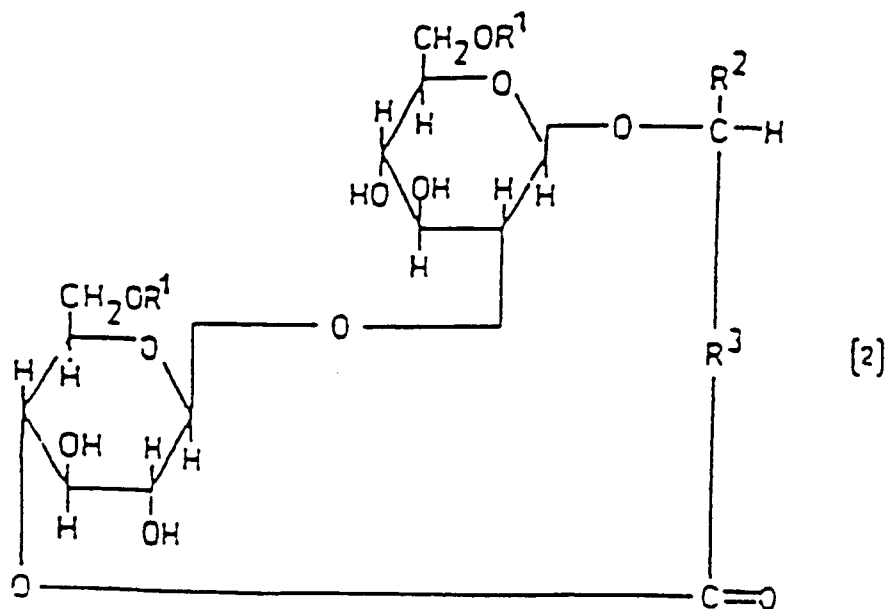
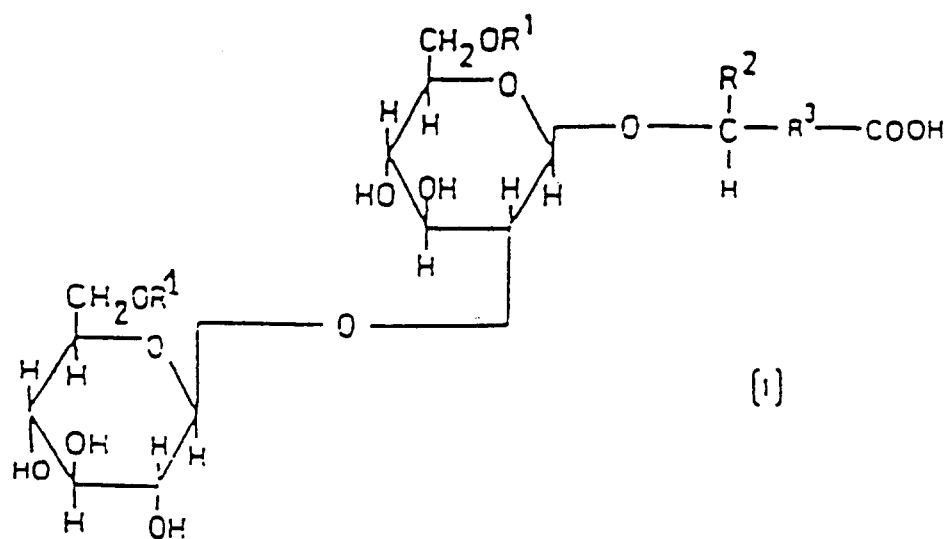
En résumé, ces documents décrivent des applications cosmétologiques des sophorolipides.

Le but de la présente invention est de démontrer que les sophorolipides présentent en outre des activités biologiques élevées s'avérant particulièrement intéressantes pour le traitement de la peau en général et en particulier pour le traitement des plaies et le traitement à des fins esthétiques ou thérapeutiques de la peau.

L'invention concerne à cet effet un composé sophorolipidique répondant aux formules générales (1) ou (2) dans lesquelles R1 représente l'hydrogène ou un groupe acétyle, et R2 l'hydrogène ou un reste alkyle comportant 1 à 9 atomes de carbone, lorsque R3 est un reste hydrocarboné saturé à 7 à 16 atomes de carbone, ou bien R2 représente l'hydrogène ou un groupe méthyle lorsque R3 est un reste hydrocarboné insaturé à sels pharmaceutiquement acceptables du composé de formule (1) pour leur utilisation comme substances thérapeutiquement actives dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

L'invention concerne également un composé sophorolipidique de la formule générale (1) ayant subi une désacétylation et une estérification du groupe carboxylique pour son utilisation comme substance thérapeutiquement active dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation de ce composé sophorolipidique comme substance active dans le traitement de la peau.



Selon des formes de réalisation préférées de l'invention, ce composé sophorolipidique peut être utilisé comme activateur des macrophages, comme fibrinolytique, comme cicatrisant en particulier dans le traitement des plaies ou comme agent favorisant la desquamation du fait de son action sur la cohésion des cornéocytes ou bien encore comme agent dépigmentant ou bien encore comme inhibiteur partiel de mélanogénèse en particulier pour le traitement des taches brunes.

L'invention concerne encore des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles renferment un excipient pharmaceutiquement inerte et en tant que principe actif au moins un composé représenté par les formules (1) ou (2) indiquées ci-dessus, un sel d'au moins un composé de formule (1) indiquée ci-dessus ou au moins un composé de formule (1) désacétylé dont le groupe carboxylique est estérifié.

L'invention concerne enfin l'utilisation d'un composé représenté par les formules (1) ou (2) indiquées ci-dessus, d'un sel d'un composé de formule (1) ou d'un composé de formule (1) désacétylé dont le groupe carboxylique est estérifié, pour l'obtention d'une composition cosmétique destinée à favoriser la desquamation ou la dépigmentation de la peau.

L'invention sera bien comprise à la lecture de la description suivante d'exemples de réalisation en référence aux tableaux annexes dans lesquels :

le tableau 1 est représentatif des quantités d'Interleukine-1 libérées par des macrophages selon les produits testés ;

le tableau 2 montre l'action de fibrinolyse in vitro ;

les tableaux 3A et 3B représentent la toxicité des produits de l'invention à l'égard de différents types de cellules ;

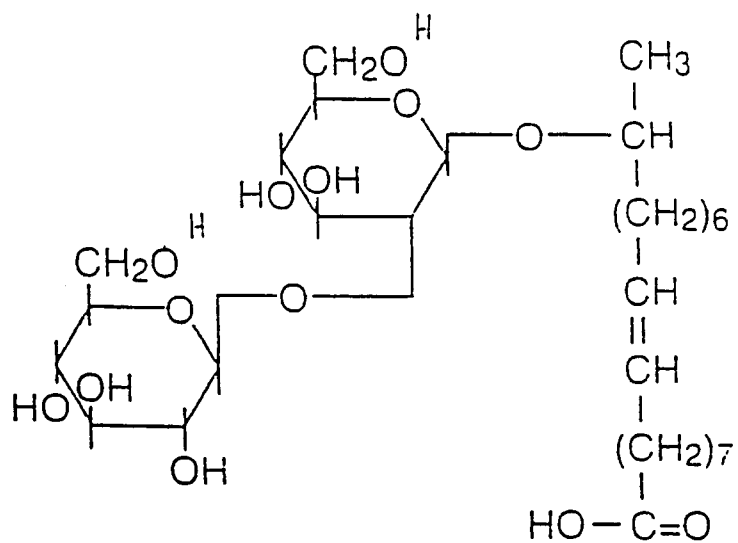
le tableau 4 représente les résultats d'un test de desquamation et

le tableau 5 représente les résultats d'un test de dosage de la mélanine dans des mélanocytes ayant été placées en contact avec les produits de l'invention.

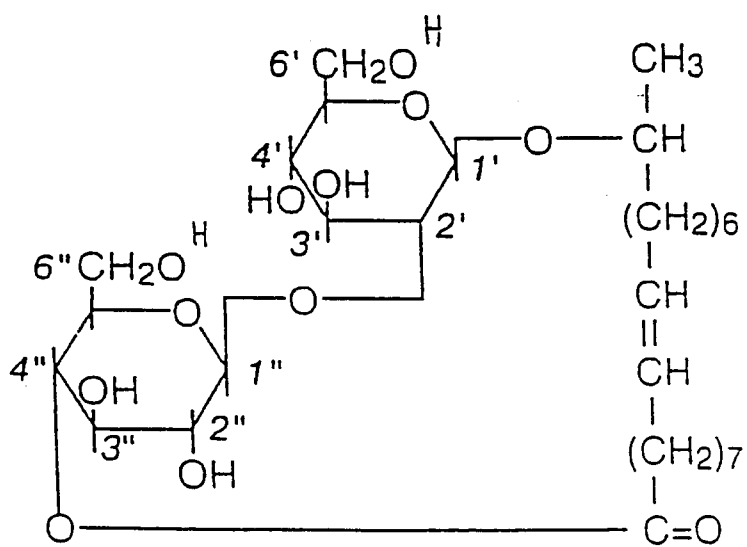
Comme le montrent les formules développées (1) et (2) ci-dessus, la partie lipidique des sophorolipides peut varier. Ces sophorolipides se présentent d'ailleurs généralement sous forme d'un mélange de différents sophorolipides. Toutefois l'hydroxyacide gras le plus abondant est l'acide 17-hydroxyoctadéc-9-énoïque encore appelé acide 17-hydroxyoléïque. En conséquence, tous les essais cités ci-dessous sont réalisés avec un sophorolipide sous forme acide représenté par la formule (a) ou avec un sophorolipide sous forme lactone représenté par la formule (b).

Le sophorolipide (a) aurait pu être également utilisé sous forme de sel ou d'ester. En effet une estérification au moins partielle sur résines H<sup>+</sup> du groupement carboxylique d'un sophorolipide désacétylé de formule (1) peut être obtenue par des alcools tels que le méthanol, ce qui conduit à l'obtention d'esters méthyliques de la forme acide totalement désacétylée. En fonction de la nature des composés du mélange, cette estérification peut être précédée d'une désacétylation et

(a)



(b)



d'une délactonisation sensiblement totales des sophorolipides par saponification suivie d'une neutralisation. Le sophorolipide peut être aussi sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalino-terreux tel que Na, Ca ou Mg.

L'inventeur de la présente invention a constaté que les sophorolipides de la présente invention présentent une activité pro-inflammatoire puisqu'ils montrent une forte capacité d'activation des monocytes et macrophages in vitro objectivée par la libération d'IL-1. Or, on sait que plusieurs facteurs tels que les cytokines et les facteurs de croissance jouent un rôle important dans le processus de cicatrisation des plaies. Parmi ces facteurs, on trouve le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance plaquettaire (PDGF) et le facteur de croissance transformant-bêta (TGF-bêta). En plus de ces facteurs, les cytokines telles que l'Interleukine-1 (IL-1), le facteur de nécrose tumoral (TNF) et l'Interleukine-6 (IL-6) jouent également un rôle important dans le processus de cicatrisation des plaies. Ces facteurs agissent par différentes voies, en combinaison avec d'autres matériaux, pour induire la prolifération des éléments dermiques et épidermiques tels que les fibroblastes. Les effets biologiques de l'Interleukine-1 sont pléiotropiques d'où son intérêt. En effet, l'IL-1 affecte la différenciation, la croissance et l'activité de nombreux types cellulaires dans l'organisme. Au sein du système immunitaire, l'IL-1 agit comme second signal nécessaire pour l'activation du circuit IL-2 par les lymphocytes T activés. Elle potentialise également l'action d'autres cytokines. Elle contribue à la différenciation des lymphocytes B et à leur production d'immunoglobulines. Elle modifie la perméabilité vasculaire par l'intermédiaire de la libération de médiateurs par les cellules endothéliales et induit l'apparition à leur surface d'un facteur possédant une activité procoagulante. Par son

action proliférative sur les fibroblastes, elle intervient dans la phase de réparation.

Pour démontrer l'effet d'activation des macrophages par les sophorolipides, un test Elisa sandwich a été réalisé sur le surnageant d'un milieu de culture contenant des macrophages. Ce test, réalisé par exemple au moyen d'un kit Inter Test 1 x X (marque déposée), montre l'effet des sophorolipides sur la libération de l'Interleukine-1 par les macrophages. Les concentrations d'interleukine 1 libérées respectivement du fait de la présence d'un sophorolipide acide et d'un sophorolipide sous forme lactone sont précisées dans le tableau 1. A titre de comparaison, il est également indiqué la concentration d'interleukine IL 1 obtenue par l'action de lipopolysaccharides considérés comme produits de référence. Un témoin négatif a également été utilisé. On constate que les sophorolipides sous leur forme acide présente à une concentration de  $10^{-5}$  M une action équivalente aux lipopolysaccharides alors qu'ils présentent une action double de celle des lipopolysaccharides à une concentration de  $10^{-4}$  M. Ce test démontre clairement la capacité des sophorolipides en tant qu'activateurs des macrophages à induire une libération des cytokines. Du fait de leur aptitude à induire la libération par les macrophages du système immunitaire, de diverses Interleukines, cytokines et facteurs de croissance simultanément, les sophorolipides peuvent être utilisés comme médicament, comme produit de pansement ou comme substance active pour le traitement des plaies généralement en relation avec une application topique. Ces sophorolipides peuvent s'appliquer à tout type de plaie. On peut citer à titre d'exemples de manière non exhaustive, les plaies traumatiques ou chirurgicales telles que les sutures, les plaies suintantes chroniques (escarres) ou non, les plaies ou ulcères variqueux, les plaies artéritiques...

Pour le traitement des plaies toutes les formes galéniques connues à ce jour peuvent être retenues. Ainsi, à titre d'exemples, les sophorolipides peuvent être inclus dans des gels ou pommades à étaler sur la plaie, dans des matrices solides notamment hydrocolloïdes, dans des alginates non tissés, dans des gazes, qui sont elles-mêmes utilisées en recouvrement de plaies. Des poudres ou granulats contenant les sophorolipides associés à une matrice (dextranomère, alginate de calcium, collagène...) sont également formulables pour un recouvrement des plaies par saupoudrage. De même, ces sophorolipides peuvent être associés à des adjuvants classiques de formulation tels que des polymères viscosifiants, des stabilisants, des antioxydants, des régulateurs d'osmolalité, des tampons pour former des compositions pharmaceutiquement acceptables.

Les sophorolipides, en activant les macrophages, induisent la libération de différentes cytokines dont l'un des rôles est également d'augmenter le recrutement de monocytes circulants (chimiotactisme) au niveau de la plaie. Outre leur activité sur les autres espèces cellulaires par le biais des cytokines, les macrophages activés ont pour rôle la phagocytose des bactéries, cellules et débris cellulaires qui encombrant la plaie. Cette action détersive est indispensable pour l'évolution favorable d'une plaie. En particulier les plaies chroniques telles que les escarres présentent un dépôt fibreux nécrotique qu'il est impératif d'éliminer pour permettre le bourgeonnement de la plaie donc le début de sa cicatrisation. Il en est de même pour d'autres types de plaies où l'absorption des exsudats et des débris tissulaires nécrotiques favorise le bourgeonnement. Les sophorolipides permettent donc de déterger indirectement la plaie par stimulation des macrophages.

Leur activité est également directe sur la plaque de nécrose. En effet, l'inventeur a constaté que les sophorolipides avaient une activité fibrinolytique objectivée in vitro par le suivi de la lyse d'un caillot de fibrine. Cette lyse a été mesurée à partir d'un caillot de fibrine reconstitué avec de la thrombine bovine et du fibrinogène humain. Le caillot obtenu est recouvert par 0,5 ml de PBS contenant l'échantillon. La modification de l'épaisseur du gel de fibrine à 4 heures et 24 heures permet de quantifier l'activité fibrinolytique. Les résultats exprimés en pourcentage de lyse sont résumés dans le tableau 2. Cette activité va donc favoriser une fibrinolyse au niveau des plaies, permettant d'agir sur la plaque d'escarre et d'induire un meilleur bourgeonnement, ainsi qu'une meilleure oxygénation tissulaire. De plus, les sophorolipides, de par leur propriété tensioactive, solubilisent les débris, molécules et détachent les cellules mortes du lit de la plaie. Cette dernière action est plus particulièrement due à leur rôle sur la desquamation qui sera décrit ci-après.

Les actions conjuguées de fibrinolyse, de détersion tensioactive et de stimulation macrophagique font des sophorolipides de l'invention des molécules actives utiles pour la fabrication de produits de pansement, de médicaments et de compositions pharmaceutiques notamment prévus pour la phase de détersion des plaies.

Leur innocuité et leur activité permettent de les utiliser aux autres stades de la cicatrisation, à savoir granulation et épithélialisation en modulant leur concentration dans les formules de produits utilisés. Ceci n'est possible qu'en raison de la faible cytotoxicité des sophorolipides comme le montrent les tableaux 3A et 3B. La toxicité des produits de l'invention a été évaluée au moyen d'un test de viabilité au

rouge neutre sur deux types cellulaires de la peau, les cellules L929 et d'autres fibroblastes du derme et les cellules NCTC 2544 et des kératinocytes de l'épiderme. Les résultats présentés dans les tableaux 3A, 3B correspondent au taux de viabilité cellulaire exprimé en % par rapport au témoin négatif. Ainsi, par exemple, dans le tableau 3A, le sophorolipide forme acide permet à une concentration de  $10^{-6}M$  le maintien en vie de 99,65 % des fibroblastes présents au départ. On constate à travers ces résultats que la forme acide est 10 fois moins toxique que la forme lactone. Cette caractéristique se révèle particulièrement intéressante en raison des propriétés déjà révélées dans le tableau 1. Elle tendrait à démontrer que les sophorolipides forme acide pourraient se révéler plus intéressants que la forme lactone pour une application au traitement des plaies.

Les exemples 1 à 3bis ci-après correspondent à trois compositions pharmaceutiques présentant chacune une forme galénique différente, utilisées chacune à un stade différent de la cicatrisation.

Les compositions pharmaceutiques présentent habituellement une concentration de 0,01 à 5% en poids de composé sophorolipidique (matière sèche). Toutefois la plage de concentrations envisageables dans le cadre de telles compositions peut être comprise entre 0,01 et 35% en poids de matière sèche .

Exemple 1 :

la composition ci-après correspond à celle d'un gel utilisé dans la phase de detersion :

Eau purifiée qsp 100

Carbomer 940 1 %

Tromethamine 0,8 %

polyvinylpyrrolidone 1 %

chlorure de sodium 0,6 %  
imidazolidinylylurée 0,3 %  
Acide citrique 0,1 %  
sophorolipide 0,01 - 5 %  
Panthénol 0,6 %  
Acide glutamique 1 %  
Méthylparabène 0,2 %  
Benzoate de sodium 0,2 %  
Sorbate de potassium 1 %  
Acemannane hydrogel 4 %  
Métabisulfite de sodium 0,3 %

Exemple 2 :

La composition ci- après correspond à celle d'un hydrogel imprégnant une compresse utilisée au cours du stade de granulation.

Alginate de propylène glycol 5 %  
Polyquaternium-20 0,1 %  
Sophorolipide 0,01 à 5 %  
eau purifiée qsp 100

Exemples 3 et 3bis :

Les compositions ci-après correspondent à celles d'un hydrogel appliqué sous forme d'une pellicule sur un film de polyuréthane, l'ensemble étant utilisé au cours de la phase d'épithélialisation

Exemple 3 :

Acémannane 5 %  
Xanthane 1 %  
Polyquaternium-10 2 %  
Sophorolipide 0,01 a 5 %  
Gluconate de potassium 0,2 %  
Eau purifiée qsp 100

Exemple 3 bis :

Sophorolipide 0,01 à 5 %

lipacide 0,05 %

sorbate de potassium 0,1 %

Eau purifiée qsp 100

Parallèlement à cette action des sophorolipides dans le traitement des plaies, l'inventeur de la présente invention a constaté que les sophorolipides activent la desquamation physiologique en agissant sur le détachement des cornéocytes. Il est rappelé que l'action desquamante d'un produit consiste à éliminer la partie superficielle de la couche protectrice de l'épiderme (stratum corneum). Cette couche protectrice est constituée de kératinocytes au stade terminal de différenciation appelés cornéocytes. Il était déjà connu que les hydroxy-acides tels que l'acide lactique n'entraînent pas de désagrégation des cornéocytes des couches supérieures du stratum corneum comme le font les agents kératolytiques. En réalité, ils diminuent l'épaisseur de la couche cornée par une action sur la cohésion cornéocytaire au niveau des couches inférieures nouvellement formées. Ce rôle a également été démontré pour les sophorolipides au moyen des expérimentations qui suivent. Il a été choisi comme modèle cellulaire pour l'étude une culture de kératinocytes placée dans des conditions favorisant la différenciation des cellules. Les actions des sophorolipides forme acide A, des sophorolipides forme lactone B et de l'acide lactique sur le détachement des cornéocytes du modèle cellulaire choisi ont été testées in vitro en parallèle. Les résultats sont fournis dans le tableau 4. Dans chaque expérimentation, il a été déterminé la différence moyenne T60-T0 (cornéocytes/ml) ainsi que le taux de cornéocytes détachés exprimé en pourcentage par rapport au témoin négatif (%/TN). La significativité statistique (test t de Student) des différences entre les échantillons et le témoin négatif est exprimé par p qui demeure inférieur à 0,001

pour tous les essais réalisés. Le coefficient de variation CV est obtenu comme suit :

$$CV = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

La viabilité cellulaire, mesurée par le test au Rouge Neutre est exprimée par rapport au témoin négatif (%). Lorsqu'une dose réponse est réalisée, l'activité du produit peut être définie par la concentration T200. La T200 est la concentration qui entraîne une libération de cornéocytes double de celle observée avec le témoin négatif. Le tableau 4 montre que pour l'acide lactique la T200 correspond sensiblement à une concentration de  $10^{-3}$  M alors qu'elle correspond à une concentration de  $10^{-4}$  M pour les sophorolipides. Les sophorolipides sont donc dix fois plus actifs que l'acide lactique. Cette action sur la cohésion intercornéocytaire des sophorolipides s'accompagne d'une action sur la flexibilité de la couche cornée et d'une action d'hydratation de l'épiderme. Ces sophorolipides pourront donc être employés en dermatologie dans de multiples indications: ichtyose, acné, xérose, peeling... mais également en cosmétique comme exfoliant ou comme produit anti-rides ou comme produit régénérant. En effet, les applications thérapeutiques impliquent incidemment des applications en cosmétique. Ces applications en cosmétique sont particulièrement surprenantes eu égard à l'application en cosmétique qui avait été décrite dans le brevet EP-B209.783. En effet dans ce document on utilisait le sophorolipides pour combattre les pellicules. Or, on n'utilise généralement pas un produit desquamant pour traiter des pellicules car un effet contraire à l'effet attendu sera obtenu. Cette nouvelle application des sophorolipides en cosmétique déduite de leur utilisation en thérapeutique n'est donc pas évidente au regard de l'application cosmétique déjà connue. De manière analogue à ce qui a été décrit ci-dessus concernant le traitement des

plaies, les formes galéniques des compositions pharmaceutiques ou cosmétiques pour favoriser la desquamation sont diverses. A titre d'exemple, il est fourni ci-après une composition cosmétique favorisant la desquamation de la peau utilisée comme crème régénérante anti-rides :

glyceryl stéarate SE	12 %
ceteareth - 12	1 %
octyldodecanol	10 %
sophorolipide acide	0,01 à 5 %
isopropyl myristate	6 %
huile de germe de blé	4 %
huile de fleur de passion	3 %
glycérine	5 %
eau	qsp 100

Parallèlement à cette action de desquamant, il a également été trouvé que les composés sophorolipidiques de l'invention peuvent être utilisés comme inhibiteur partiel de la mélanogénèse et en particulier comme dépigmentant ou pour le traitement des taches brunes en thérapeutique ou en cosmétique. On constate que le vieillissement cutané entraîne un ralentissement des fonctions épidermiques : la mélanine n'arrive plus de façon homogène à la surface de la peau, se concentre à l'intérieur de certaines cellules et des taches brunes apparaissent principalement sur les mains, les avant-bras et le décolleté. Les sophorolipides en agissant sur la mélanogénèse, en particulier en réduisant la production de mélanine, peuvent permettre l'élimination progressive de cette pigmentation. Cette action de dépigmentation est amplifiée par l'effet des sophorolipides sur le détachement des cellules superficielles du fait de leur rôle de desquamant. Pour mettre en évidence, cette action des sophorolipides, il a été procédé comme suit : on a placé en culture des mélanocytes. A J7 et

J14, les mélanocytes sont récupérés, lavés (Phosphate Buffer Salin : PBS) et centrifugés (20 000 rpm 20 minutes + 4 °C). Les culots sont repris en PBS/Triton X-100 (1 % v/v) et soniques durant 30 secondes. Le lysat cellulaire est ultracentrifugé (105 000 rpm 40 minutes + 4 °C). Le culot obtenu est alors repris dans 1 ml de PBS. Le taux de protéine est déterminé par méthode calorimétrique (Biorad) puis ajusté à 1,5 mg/ml. Le taux en mélanine est alors déterminé, après hydrolyse par la soude 1N, durant 4 heures à 90 °C, par lecture spectrophotométrique à 420nm contre une gamme étalon réalisée avec une mélanine de synthèse [Sigma].

Ces résultats sont exprimés en % TN, c'est à dire en pourcentage d'augmentation de synthèse de mélanine calculé comme suit :

$100 - (\text{teneur en mélanine du produit testé} \times 100 / \text{teneur en mélanine TN})$

TN correspond au témoin négatif

Le produit testé est soit de l'acide linoléique, acide gras polyinsaturé, soit un sophorolipide acide A. Le tableau 5 montre que contrairement à l'acide linoléique, les sophorolipides forme acide engendrent une réduction de la synthèse de mélanine. Outre les applications au traitement des taches brunes et à la dépigmentation de la peau, plusieurs applications thérapeutiques ou cosmétiques peuvent être envisagées. De ce fait, à nouveau, les formes galéniques sont diverses. Il est toutefois fourni ci-après un exemple d'une crème anti-taches pour les mains utilisée indifféremment en cosmétique ou en thérapeutique :

ceteareth 30	13 %
PEG 7 glyceryl cocoate	20 %
huile de paraffine	5 %
glycérine	20 %
eau	qsp 100

Toutes les utilisations précitées des sophorolipides ne sont mises en oeuvre qu'en relation avec une application topique. On constate également que les préparations pharmaceutiques et cosmétiques peuvent avoir des formes très semblables sinon identiques dans certains cas d'utilisation.

Dans le cadre des applications cosmétiques, la concentration en composés sophorolipidiques selon l'invention peut atteindre 0,01 à 35% en poids de matière sèche.

WO 97/01343

18

PCT/FR96/00991

Tableau 1

Dosage IL 1

libérée par macrophages

	Témoins négatifs T(-)	Sophorolipide forme lactone (B) 10-4M 10-5M 10-6M	Sophorolipide forme acide (A) 10-4M 10-5M 10-6M	Lipopolysaccharides à 25 µg/ml
Concentrations IL-1 pg/ml	27,5	255,4 385,9 345,1	795,6 500,8 287,2	421,61

Tableau 2

## FIBRINOLYSE IN VITRO

	Forme lactone (30 & MS)	Forme acide (10 & MS)	Forme acide				
			10-1M	10-2M	10-3M	10-4M	10-5M
4 Heures	15	75	66	5	0	0	0
24 Heures	33	90	80	40	20	5	0

Lyse du caillot de fibrine exprimée en % par rapport au TN

Tableau 3A  
 CYTOTOXICITE SUR PRIMOCULTURES  
 à 24 Heures

	Sophorolipide forme acide		Sophorolipide forme lactone	
	FIBROBLASTES	KERATINOCYTES	FIBROBLASTES	KERATINOCYTES
Témoïn	100	100	100	100
10-6M	99,65	99,49	100,84	99,56
10-5M	98,65	99,9	100,05	99,56
10-4M	98,35	99,3	91,15	95,89
10-3M	85,73	86,74	5,96	6,58

Taux de viabilité cellulaire exprimé en % par rapport au TN

Tableau 3B  
 CYTOTOXICITE SUR L929 (fibroblastes)  
 ET NCTC2544 (cellules épithéliales)  
 à 24 Heures

	Sophorolipide forme acide		Sophorolipide forme lactone	
	L929	NCTC2544	L929	NCTC2544
5.10-2M	5,47	6,35	5,65	5,86
10-2M	6,18	7,12	5,26	6,49
5.10-3M	7,62	8,34	5,44	6,44
10-3M	100,45	100,45	5,71	6,17
5.10-4M	99,16	99,86	6,63	8,7
10-4M	101,82	100	86,97	85,17
10-5M	100,51	101,4	96,5	95,54

Taux de viabilité cellulaire exprimé en % par  
 rapport au témoin négatif (TN = 100 %)

**Tableau 4**  
**TEST DE DESQUAMATION**

Produits	Témoins	Sophorolipide forme acide			AC Lactique	Sophorolipide forme lactone		
		10-4M	10-5M	10-6M	10-3 M	10-4M	10-5M	10-6M
T60-T0	1167	2278	1944	1555	2500	2389	1833	1528
CV%	14.29	4.22	4.95	12.37	6.67	4.03	9.09	3.15
% /TN	100	195	167	133	214	205	157	131
%viabilité	100.00	98.71	99.75	99.57	99.54	99.14	100.55	98.77

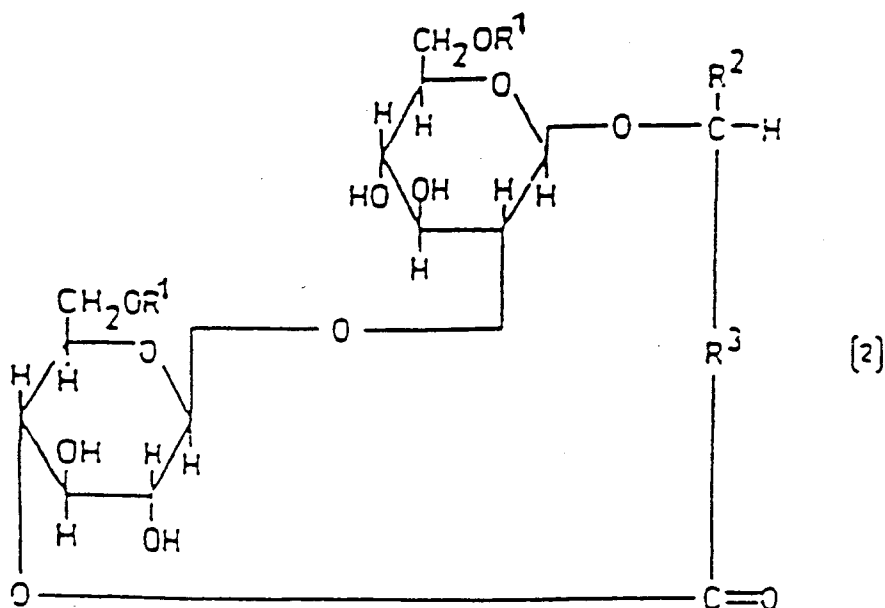
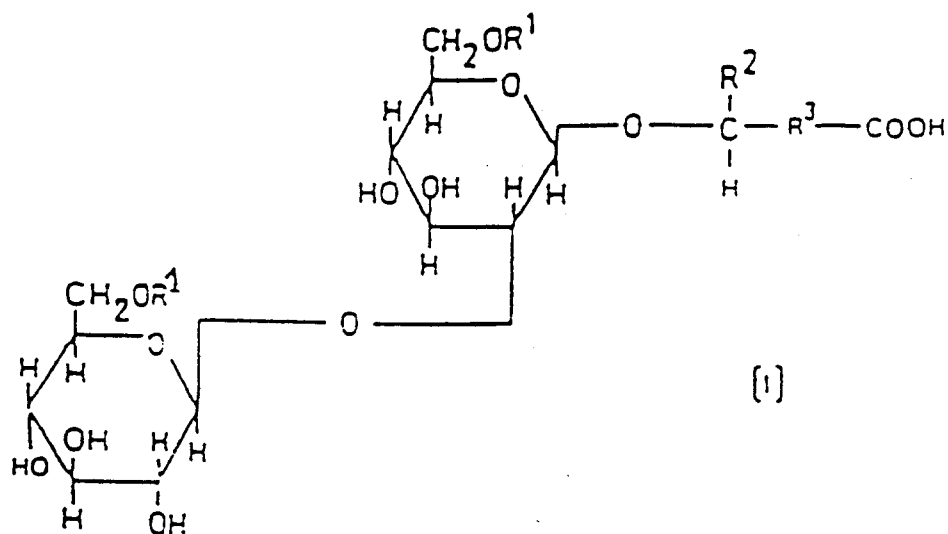
Tableau 5

DOSAGE MELANINE DANS MELANOCYTES APRES 7 ET 14 JOURS				
	sophorolipide forme acide →		DHA	
	%/TN	% TN	% TN	% TN
témoin négatif	100	100	100	100
10-4M	56,2	56,8	109,75	113,6
10-5M	65,8	86,4		
10-6M	93,6	95,4		
	à J7	à J14	à J7	à J14

$\% \text{ TN} = 100 - (\text{Teneur en mélanine du produit testé} \times 100 / \text{Teneur en mélanine du témoin négatif})$ .

## REVENDEICATIONS

1. Composé sophorolipidique répondant aux formules générales (1) ou (2)



dans lesquelles R1 représente l'hydrogène ou un groupe acétyle, et R2 l'hydrogène ou un reste alkyle comportant 1 à 9 atomes de carbone, lorsque R3 est un reste hydrocarboné saturé à 7 à 16 atomes de carbone, ou bien R2 représente

- l'hydrogène ou un groupe méthyle lorsque R3 est un reste hydrocarboné insaturé à 13 à 17 atomes de carbone, et des sels pharmaceutiquement acceptables du composé de formule (1) pour leur utilisation comme substances thérapeutiquement actives dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal.
2. Composé sophorolipidique de la formule générale (1) ayant subi une désacétylation et une estérification du groupe carboxylique pour son utilisation comme substance thérapeutiquement active dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal.
  3. Composé sophorolipidique selon la revendication 1 ou 2, pour son utilisation comme substance active pour le traitement de la peau.
  4. Composé sophorolipidique selon la revendication 1 ou 2, pour son utilisation comme activateur des macrophages.
  5. Composé sophorolipidique selon la revendication 1 ou 2 pour son utilisation comme fibrinolytique.
  6. Composé sophorolipidique selon la revendication 1 ou 2, pour son utilisation comme cicatrisant.
  7. Composé sophorolipidique selon la revendication 1 ou 2, pour son utilisation comme desquamant.
  8. Composé sophorolipidique selon la revendication 1 ou 2, pour son utilisation comme inhibiteur partiel de la mélanogénèse.
  9. Composé sophorolipidique selon la revendication 1 ou 2, pour son utilisation comme dépigmentant.

10. Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment un excipient pharmaceutiquement inerte et en tant que principe actif au moins un composé représenté par les formules (1) ou (2) indiquées dans la revendication 1, au moins un sel de composé de formule (1) indiquée dans la revendication 1 ou au moins un composé de formule (1) indiquée dans la revendication 1, désacétylé et dont le groupe carboxylique est estérifié.
11. Utilisation d'au moins un composé représenté par les formules (1) ou (2) indiquées dans la revendication 1, d'au moins un sel de composé de formule (1) indiquée dans la revendication 1 ou d'au moins un composé de formule (1) indiquée dans la revendication 1, désacétylé et dont le groupe carboxylique est estérifié, pour l'obtention d'une composition cosmétique destinée à favoriser la desquamation de la peau.
12. Utilisation d'au moins un composé représenté par les formules ( 1 ) ou (2) indiquées dans la revendication 1, d'au moins un sel de composé de formule (1) indiquée dans la revendication 1 ou d'au moins un composé de formule (1) indiquée dans la revendication 1, désacétylé et dont le groupe carboxylique est estérifié, pour l'obtention d'une composition cosmétique destinée à favoriser la dépigmentation de la peau.
- 13 - Utilisation selon l'une des revendications 11 et 12 dans laquelle la concentration en composé sophorolipides est comprise entre 0,01 à 35 % en poids des matière sèche.