



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07K 5/083, A61K 7/06, 7/48, 38/06		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/58347 (43) Date de publication internationale: 5 octobre 2000 (05.10.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00531</p> <p>(22) Date de dépôt international: 2 mars 2000 (02.03.00)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 99/03997 30 mars 1999 (30.03.99) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): SEDERMA [FR/FR]; 29, rue du Chemin Vert, Boîte Postale 33, F-78160 Le Perray-en-Yvelines (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et</p> <p>(75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): LINTNER, Karl [FR/FR]; 69, rue de l'Assomption, F-75016 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: COSMETIC OR DERMOPHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING TRIPEPTIDE N-BIOTINYL-GLY-HIS-LYS FOR THE PREVENTION, REDUCTION OR SUPPRESSION OF HAIR LOSS AND STIMULATION OF REGROWTH</p> <p>(54) Titre: COMPOSITIONS COSMETIQUES OU DERMOPHARMACEUTIQUES CONTENANT LE TRIPEPTIDE N-BIOTINYL-GLY-HIS-LYS, POUR PREVENIR, REDUIRE OU SUPPRIMER LA CHUTE DES CHEVEUX AINSI QUE POUR FAVORISER LEUR REPOUSSE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the production of novel tripeptide N-biotinyl-gly-his-lys and the use thereof in cosmetic or dermatopharmaceutical compositions. Said tripeptide can be obtained by synthesis, biotechnology or controlled hydrolysis of plant proteins. The inventive compositions are applied topically for the prevention, reduction or suppression of hair loss and to stimulate regrowth.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Le brevet décrit la préparation, les activités du nouveau tripeptide N-Biotinyl-Gly-His-Lys ainsi que son utilisation dans des compositions cosmétiques ou dermatopharmaceutiques. Ce tripeptide peut être obtenu par synthèse, par biotechnologie ou par hydrolyse ménagée de protéines végétales. Utilisées par voie topique, ces compositions sont avantageusement utilisées pour prévenir, supprimer ou réduire la chute des cheveux, ainsi que pour favoriser leur repousse.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettanie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Malï	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

TITRE *Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques contenant le tripeptide N-Biotinyl-Gly-His-Lys, pour prévenir, réduire ou supprimer la chute des cheveux ainsi que pour favoriser leur repousse.*

La médiatisation de notre Société, par le biais de la publicité, du cinéma et de la télévision, impose de plus en plus une image exacerbée de la jeunesse corporelle, et de ses caractéristiques morphologiques, qui devient une sorte d'idéal dont tout un chacun essaye de se rapprocher.

La chevelure, composante importante de cette image, fait partie des caractéristiques physiques que tout individu expose au regard des autres.

En effet, à tout âge, l'aspect idéal de la chevelure peut être altéré par de nombreux dysfonctionnements physiologiques ou pathologiques. L'exemple le plus connu en est la perte progressive et/ou locale de cheveux dont la calvitie est l'ultime étape.

Les hommes étant préférentiellement touchés par la calvitie à tout âge, le rôle des hormones androgènes a été très rapidement suspecté et démontré (par exemple Jahoda C.A. (1998) *Exp. Dermatol.* **7**:235-248) et confirmé par la perte de cheveux observée chez les femmes après la ménopause et son cortège de dérèglements hormonaux (par exemple Rubin M.B. et al. (1997) *Postgrad. Med.* **102**:129-131). Depuis, un nombre important de dysfonctionnements physiologiques ou pathologiques ont été identifiés: stress psychologiques aussi bien chez la femme que chez l'homme (par exemple: Cash T.F. (1993) *J. Am. Acad. Dermatol.* **29**:568-575); conséquences d'actes médicaux banals (par exemple Wise R.P. et al. (1997) *J.A.M.A.* **279**:117-118); facteurs génétiques liés, ou non, à d'autres pathologies spécifiques comme les risques d'infarctus (par exemple Herrera C.R. et al. (1995) *Am. J. Epidemiol.* **142**:828-833) ou de cancer de la prostate (par exemple: Pan H.J. et al. (1998) *Endocrine* **9**:39-43).

Par ailleurs, la chimiothérapie est bien connue pour provoquer des alopécies rapides et totales par le biais d'un mécanisme, maintenant identifié, qui aboutit à une accélération de l'apoptose du follicule pileux (par exemple Cece R. et al. (1996) *Lab. Invest.* **75**:601-609).

A ce jour, pour corriger l'aspect de l'alopecie, de nombreuses solutions ont été utilisées: application locale d'extraits végétaux ou minéraux de toute sorte,

traitement hormonal par voie topique ou générale, prothèse et autres postiches ou perruques, implants, autogreffes.

Récemment, un type de traitement pharmacologique est apparu avec une nouvelle classe de molécules: les activateurs des canaux potassiques qui, à l'origine, étaient destinés aux traitements de problèmes cardio-vasculaires et non capillaires (par exemple Buhl A.E. (1993) *J. Invest. Dermatol.* **101**:148S-152S).

L'industrie cosmétique est donc tout à fait dans son rôle quand elle recherche en permanence de nouveaux concepts et produits capables de prévenir, réduire ou supprimer la chute des cheveux ou de favoriser leur repousse.

10 L'objet de cette demande de brevet réside dans la découverte, et dans la démonstration, qu'une nouvelle approche du problème de régulation de la perte des cheveux et de leur repousse peut être proposée.

Pour comprendre l'intérêt de notre découverte, quelques rappels succincts du mécanisme et la physiologie de la formation du cheveu (dans *Dermatologie*, Collection Consultation, D^r Michel Jossey, M.A. Editions Paris, 1993:107-114) sont donnés ci-après.

Le cheveu se compose d'une racine et d'une tige.

La première est formée de plusieurs couches de kératine et son extrémité inférieure se renfle en forme de bulbe, encapuchonnant ainsi la papille, riche en vaisseaux sanguins et en terminaisons nerveuses. La racine, ou follicule pileux, est ancrée dans le maillage du tissu cutané constitué par différents types de collagènes: les types I, II, III V et XI, formes fibrillaires, comblent les espaces vides alors que le type IV forme le réseau en feuillet de la lame basale et que le type VII constitue les fibrilles d'ancre des épithéliums squameux stratifiés (par exemple Albert B et al., *Biologie Moléculaire de la cellule*, 3^{ème} éd., Médecine Science, Flammarion ed., Paris, 1997:979-980).

La tige, ou partie libre du cheveu est constituée de kératine et peut être comparée à un ongle (phanère).

A la naissance, nous possédons environ 100.000 follicules pilo-sébacés et comme il ne peut en apparaître d'autres au cours de la vie, il est naturel que ce nombre diminue avec l'âge.

5

10

15

20

25

30

A l'exception du caniche et du mouton mérinos, les poils des mammifères évoluent cycliquement. Chez l'Homme, chaque follicule évolue indépendamment de son voisin selon trois grands phases:

- Anagène, ou phase de croissance, qui dure environ deux ans et qui concerne, à un moment donné, environ 75 % du cuir chevelu. Le cheveu anagène a une tige foncée, de grande taille, à l'extrémité proximale rectiligne et au bulbe pigmenté.
- Catagène qui dure environ 2 semaines et touche 5 % des cheveux. Elle correspond à l'arrêt des divisions cellulaires. Le cheveu, de couleur légèrement foncé, présente alors une extrémité proximale arrondie en massue.
- Télogène qui dure de 3 à 4 mois et concerne environ 20 % des cheveux. C'est une phase de repos et de mort qui entraîne obligatoirement la chute du cheveu.

Après ce cycle, le cheveu tombé est remplacé par un autre, à la condition que le follicule soit resté actif et donc, qu'il soit maintenu dans un contexte tissulaire et physiologique normal ou pour le moins satisfaisant.

Pour cela, il est au moins deux conditions essentielles qui paraissent évidentes:

- le follicule pileux doit *baigner* dans un environnement riche en vaisseaux sanguins pour être *alimenté* correctement et donc, recevoir les nutriments dont il a besoin et éliminer les catabolites produits par son métabolisme,
- le follicule pileux doit être bien ancré dans le tissu cutané grâce à une maillage efficace établi par des molécules de constitution telles les collagènes, notamment ceux des types I, II, III et IV (par exemple Almond-Roesler N. et al. (1997) *Arch. Derm Res.* **289**:698-704).

L'objet de cette demande de brevet réside dans la découverte, et dans la démonstration, que les conditions optimales pour maintenir le follicule pileux du cheveu dans un milieu favorable à sa survie étaient obtenues par l'utilisation topique de notre nouvelle molécule, le N-Biotinyl-Glycine-Histidine-Lysine (ou N-Biotinyl-Gly-His-Lys ou encore le N-Biotinyl-G-H-K).

Ce N-Biotinyl-G-H-K est obtenu par le greffage d'une molécule de biotine sur la partie N-terminale du tripeptide Gly-His-Lys, créant ainsi une nouvelle molécule.

De manière surprenante, et faisant partie intégrante de notre demande de brevet comme activité inventive, nous avons découvert que l'effet contre la chute des cheveux et favorable sur leur repousse avec notre nouveau produit obtenu par greffage de la biotine sur le tripeptide Gly-His-Lys, est largement supérieur à celui que l'on pouvait espérer par la simple additivité des effets connus pour le seul G-H-K et pour la seule biotine, mais que l'on avait ainsi créé une très forte synergie imprévisible même par l'homme de l'art.

Un intérêt supplémentaire apporté par le greffage d'une Biotine sur le tripeptide Gly-His-Lys réside dans une meilleure pénétration cutanée du produit vers le follicule pileux et dans une meilleure stabilité du produit après son incorporation dans la grande diversité galénique de produit final auquel il est destiné.

Séquence Gly-His-Lys - Résumé des connaissances (littérature - brevets)

A ce jour la séquence Gly-His-Lys est décrite dans la littérature comme favorisant la formation de néo-vaisseaux, effet angiogénique très général comme par exemple:

- Peptides contenant la séquence Gly-His-Lys et synthèse du collagène de type I:
Sage E.H. et al. (1994) *J. Hypertens.* **12**:S145-S152,
- Séquence Gly-His-Lys et néovascularisation: Raju K.S. et al. (1984) *Cancer Res.* **44**:1579-1584,
- Séquence Gly-His-Lys + Cu⁺⁺ et synthèse de collagène: Macquard F.X. et al. (1988) *FEBS* **1988**:343-346,

Cette séquence a fait l'objet de brevets parmi lesquels on peut citer:

- WO 89/12441 (1989): compositions cosmétiques destinées à épaisser le tissu adipeux sous-cutané des animaux à sang chaud et/ou la peau en général,
- Parmi d'autres séquences peptidiques, N-acylées ou non, en 1990, nous avions décrit (FR90/13349) le Gly-His-Lys utilisable dans des préparations cosmétiques, sans toutefois en revendiquer d'activité physiologique particulière.

Depuis le dépôt de notre brevet, certains documents ont revendiqués, pour le tripeptide Gly-His-Lys, une activité cosmétique générale:

- en excluant la possibilité de N-acylation par un acide palmitique (FR-95 13543 du 15/11/95),

5

10

15

20

25

30

- en mentionnant qu'un tripeptide, non N-acylé, devant contenir toute association possible d'acides aminés se trouvant dans la thymuline ou dans la thymopoïétine AA (FR-95 13544) sans que la séquence Gly-His-Lys soit mentionnée, glycosylée et de préférence liée à un atome métallique comme le zinc,
- en ne décrivant que l'utilisation de la 3-méthyl-L-His, liée ou non à une autre molécule indéterminée pour faciliter le passage transcutané, en utilisation topique contre les altérations du collagène dues aux UV (WO 90/06102),
- en ne mentionnant qu'une séquence peptidique de 1 à n acides aminés dont l'un est obligatoirement un His, pouvant être greffée à une chaîne d'acide gras de 6 à 24 carbones, et revendiquant des activités émulsifiante, antioxydante, bactéricide, chélatante ou comme filtre solaire (JP 24655/91).

Cette même séquence Gly-His-Lys est utilisée de manière plus ou moins spécifique (brevet FR95/13543 du 15.11.95) dans des médicaments et compositions pour *le traitement préventif et curatif des rides du visage, du cou et des mains, sous forme de lotions, gels en application locale*, ainsi que comme *agent d'activation et de potentialisation des mécanismes physiologiques de coopérations cellulaires*.

Ce brevet revendique également l'utilisation de la séquence Gly-His-Lys seule ou en association avec des activateurs de l' α MSH, pour *l'accélération de la mélanogénèseobtention d'un bronzage naturel et d'une protection totale contre les radiations solaires (UV)*.

Tous ces documents font donc référence à des domaines très éloignés du problème posé et résolu dans cette demande de brevet.

Biotine - Résumé des connaissances (littérature - brevets)

La biotine est une vitamine du groupe B, appelée également vitamine H ou Bios II, qui a été isolée par Kögl F. et Tonnis B. en 1936 à partir du jaune d'oeuf.

Elle stimule directement la différentiation des kératinocytes et doit être apportée par l'alimentation car l'organisme humain ne peut la synthétiser.

La carence en biotine se traduit chez l'animal et chez l'Homme, par des symptômes comme: alopecie, dermatite, anémie, hypercholestérolémie et troubles de l'appareil reproducteur.

Les utilisations de la biotine peuvent être regroupées en deux groupes: applications médicales et comme co-réactif (avec l'avidine) dans des réactions de type ELISA qui servent à mesurer différents constituants biochimiques.

5 Parmi les applications médicales de la Biotine, on peut citer parmi d'autres très nombreux exemples:

- Comme constituant d'un mélange à utiliser dans l'alopecie et dans l'activation de la pousse des cheveux ou l'entretien des phanères, composé d'autres produits comme un extrait végétal (par exemple brevet WO9713492 ou US5750107) ou animal (par exemple US5827510),
- Comme ajout dans la ration de personnes présentant des symptômes de retard mental, de comas d'acidose cétonique, de Candidoses chronique et d'alopecie (par exemple Munnich et al. (1980) *Ann. Med. Interne - Paris* **131**:435-437,
- Comme traitement oral du syndrome de Dupré, dit du *cheveu incoiffable* (par exemple Shelley W.B. et al. *J. Am. Acad. Dermatol.* **13**:97-102).

10 Parmi les méthodes diagnostiques, on peut citer les kits commerciaux de différentes marques comme Boehringer, Sigma, ainsi que des applications plus ponctuelles (Bettens F. et al. (1991) *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **29**:685-688; Chevrier D. et al. (1995), *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **10**:245-501; (Chomel J.J. et al., *J. Virol. Method* **68**:97-104).

15 Tous ces documents font référence soit à des domaines très éloignés du problème posé et résolu dans cette demande de brevet, soit à des solutions différentes puisque si la biotine est mentionnée pour le même type de problème, elle fait partie d'une association de produits dont on ne peut préciser pour chacun l'exacte contribution vis-à-vis de l'activité finale revendiquée.

20 L'objet de notre découverte est donc que nous avons réuni trois caractéristiques dans la seule et unique nouvelle molécule N-Biotinyl-Gly-His-Lys:

- l'action propre du tripeptide sur:
 - la néoformation de vaisseaux sanguins ou sur le maintien du follicule pileux dans un contexte très bien vascularisé pour lui assurer un métabolisme

performant et donc un fonctionnement correct assurant la survie ou la repousse du poil,

➤ la synthèse d'un collagène de qualité assurant un ancrage correct du follicule pileux dans la matrice cutanée,

- 5 • l'action propre de la Biotine sur l'apport en vitamine et cofacteur enzymatique à l'endroit même de son utilisation et où sa carence se traduit macroscopiquement par la perte et/ou par l'absence de repousse des cheveux,

- le greffage de ces deux molécules en une seule qui,

➤ améliore l'ancrage du follicule pileux grâce à l'augmentation de la synthèse de collagène,

➤ augmente la stabilité de ces deux molécules dans le produit final,

➤ augmente la biodisponibilité dans l'environnement ciblé qu'est le follicule pileux,

➤ simplifie le travail de l'homme de l'art en formulation galénique car il n'a plus qu'une seule molécule à incorporer dans une composition complexe au lieu de deux ainsi que par la grande stabilité du Biotinyl-Gly-His-Lys,

➤ crée une synergie évidente par rapport aux activités propres constatées pour la Biotine et pour le tripeptide Gly-His-Lys lorsqu'il sont utilisés soit seul soit en association entre eux.

20 Le N-Biotinyl-Gly-His-Lys, objet de cette demande de brevet, peut être obtenu soit par synthèse chimique classique (en phase hétérogène ou en phase homogène), soit par synthèse enzymatique (Kullman et al., J. Biol. Chem. 1980, 255, 8234) à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés, puis par le greffage sur la partie N-terminale de la Glycine du tripeptide Gly-His-Lys par une molécule de Biotine.

25 La petite taille du tripeptide Gly-His-Lys permet d'en faire la synthèse industrielle, à un coût avantageux et son greffage avec la Biotine représente un faible surcoût par rapport à la synergie ainsi créée. Sa grande activité démontrée en autorise l'utilisation commerciale dans un grand nombre de produits cosmétiques ou dermopharmaceutiques financièrement acceptables.

Le tripeptide Gly-His-Lys peut être obtenu également par fermentation d'une souche de bactéries, modifiées ou non par génie génétique, pour produire les séquences recherchées ou leurs différents fragments.

Le tripeptide Gly-His-Lys peut être obtenu par extraction de protéines d'origine animale ou végétale, préférentiellement végétale, susceptibles de contenir ces séquences au sein de leur structure, suivie d'une hydrolyse contrôlée, enzymatique ou non, qui libère le fragment peptidique de séquence Gly-His-Lys dans les plantes qui sont susceptibles de contenir ces séquences au sein de leur structure. L'hydrolyse ménagée permet de dégager ces fragments peptidiques.

A partir de ce tripeptide obtenu selon un quelconque procédé mentionné ci-dessus, il est facile pour l'homme de l'art de réaliser le produit de l'invention en greffant, par n'importe quel procédé, une molécule de biotine sur la partie N-terminale de la glycine du tripeptide. Sans être exhaustifs, à titre d'exemple, nous indiquons, ci-après deux possibilités.

L'accrochage de la biotine sur les fonctions amines d'un peptide se fait par réaction d'esters activés de la biotine (par exemple : ester de paranitrophenyl ou ester de N-hydroxy-succinimide), ou par tout autre forme d'activation de la biotine (EtOCOCl, DCC, TBTU, BOP, ...). La réaction est alors suivie d'une purification par les méthodes classiques de la chimie des peptides, par exemple la cristallisation, la chromatographie.

L'accrochage peut également se faire directement pendant la synthèse en phase solide du peptide (Lobl et al : Anal. Biochem. , 1988, 170, p1055-1060). Dans ce cas, on utilise un excès de réactif et augmente le temps de couplage pour compenser la faible réactivité. La dernière étape de clivage du peptide n'est pas modifiée du fait de la présence de la biotine sur le peptide.

Dans les deux cas, en raison de la faible solubilité da la biotine dans les solvants organiques classiques, la réaction doit se faire dans le diméthylformamide (DMF). Enfin, il est également possible, sans perdre l'activité revendiquée dans ce brevet, d'estérifier le groupe carboxyle du N-Biotinyl-Gly-His-Lys pour en augmenter la stabilité et la disponibilité tissulaire par facilitation du passage de la barrière lipidique cutanée de ce type de structure essentiellement hydrophile.

A titre d'exemple illustrant l'invention, on cite quelques formules cosmétiques représentatives mais non limitatives de l'invention:

Exemple n° 1: Gel

➤ Carbopol 1342 ^R	0,3
➤ Propylène glycol	2,0
➤ Glycérine	1,0
➤ Vaseline blanche	1,5
➤ Cylomethicone	6,0
➤ Alcool cétylique	0,5
➤ Lubrajel ^R MS	10
➤ Triéthanolamine	0,3
➤ N-Biotinyl-Gly-His-Lys	0,0005
➤ Eau, conservateurs, parfum	qsp 100 g.

Exemple n°2: Crème

➤ Brij ^R 721	2.4
➤ Volopo ^R S72	2.6
➤ Prostéayl-15	
➤ Cire d'abeille	0.5
➤ Abil ^R ZP 2434	3.0
➤ Propylène glycol	3.0
➤ Carbopol ^R 941	0.25
➤ Triéthanolamine	0.25
➤ N-Biotinyl-Gly-His-Lys	0,005
➤ Eau, conservateurs, parfums qsp	100 g

Exemple n°3: Lotion capillaire contre la chute des cheveux

➤ Ethanol DEB100	10
➤ Castor oil	1.5
➤ Incronam 30	1.0
➤ Croduret 40	1.0
➤ PVP k90	0.4
➤ Crotéine K	0.3

➤ Gafquat 755N	0.2
➤ N-Biotinyl-Gly-His-Lys	0,010
➤ Eau, conservateurs, parfums qsp	100 g

Exemple n°4: Shampooing contre la chute des cheveux

➤ Empicol EBS3/M	43.0
➤ Incronam 30	10.0
➤ Empilan CDE	3.0
➤ Castor oil	1.5
➤ Citrol EGMS	2.0
➤ Acide lactique	⇒ pH 6.5-7.0
➤ N-Biotinyl-Gly-His-Lys	0,005
➤ Eau, conservateurs, parfums qsp	100 g

Les activités décrites au début de cette demande sont illustrées par les exemples suivants.

Exemple n° 5: Augmentation de la synthèse de collagène: *in vitro*

La méthode choisie est une variante de celle décrite par Augustin C. et al. (*Skin Pharmacol.* (1997) **10**:63-70) en ce que nous avons utilisé des explants de peau humaine au lieu de fibroblastes pulmonaires humains, ceci afin de rendre nos résultats directement exploitables en cosmétologie.

Ces explants, provenant de plastie mammaire, sont incubés, pendant 72 heures en présence de ^{3}H -proline, avec le N-Biotinyl-Gly-His-Lys sous trois concentrations finales dans le milieu de culture ($1.10^{-4}\%$, $3.10^{-4}\%$ et $1.10^{-3}\%$; soit 1, 3 et 10 ppm). Les explants sont alors lavés, le derme et l'épiderme de chaque explant sont séparés, homogénéisés et lysés. La mesure de l'incorporation de ^{3}H -proline est alors réalisée dans chaque lysat. Les essais sont faits en triplicate.

Parallèlement des contrôles *négatifs* sont réalisés dans le mêmes conditions mais en l'absence du tripeptide. Des contrôles, *positifs*, quant à eux, sont réalisés en remplaçant le tripeptide testé par de la vitamine C.

En présence de 1, 3 ou 10 ppm du N-Biotinyl-Gly-His-Lys, l'incorporation de ^{3}H -proline qui traduit la synthèse de collagène, est augmentée de respectivement $12,5 \pm$

0,8 %, $36,3 \pm 2,2\%$ et $65,1 \pm 3,2\%$ par rapport à ce qui est constaté dans les expériences témoins (sans le N-Biotinyl-Gly-His-Lys).

Dans les mêmes conditions, le produit de référence, l'acide ascorbique, à la concentration de 0.5mM, augmente la synthèse du collagène de 37,4 ($\pm 4,4\%$).

5 Enfin, et ceci est très important dans l'application capillaire car facilitant l'ancreage du follicule, une mesure complémentaire a été réalisée en utilisant un anticorps polyclonal anti-collagène IV (Rockland 600-401-106) et un conjugué anti-immunoglobulines de lapin-péroxydase (Tébu <L42007). S'il y a production, et donc, présence de collagène IV en fin d'incubation avec le N-Biotinyl-Gly-His-Lys, il y a formation d'un complexe dont l'activité peroxydasique peut être quantifiée sur film Kodak MP par la méthode ECL ("enhanced chemiluminescence", Amersham).

10 Dans cette expérience complémentaire, en présence des concentrations de N-Biotinyl-Gly-His-Lys testées précédemment (1, 3 et 10 ppm), la synthèse de collagène IV a été augmentée de respectivement 21, 29 et 37% par rapport aux expériences témoins, donc sans N-Biotinyl-Gly-His-Lys, augmentations comparables à celles obtenues avec la vitamine C dans les mêmes conditions.

15 **Exemple n° 6: Effet sur la chute et la repousse de cheveux: *in vivo***

L'étude portant sur 15 volontaires de sexe masculin, âgés de 26 à 50 ans et présentant des problèmes capillaires, a commencé par la coupe des cheveux, très près de la peau, sur une zone de quelques centimètres carrés.

20 Une microphotographie de la zone ainsi délimitée est alors réalisée.

Trois jours plus tard, une nouvelle macrophotographie de la même zone est prise sous le même angle.

25 Pendant les onze semaines suivantes, à l'exclusion de tout produit cosmétique autre que leur shampooing habituel, les quinze volontaires ont utilisé quotidiennement une lotion contenant 10 ppm de N-Biotinyl-Gly-His-Lys.

A la fin de cette période, le même protocole que précédemment a été utilisé: coupe des cheveux, très près de la peau, sur une zone de quelques centimètres carrés suivie de la prise d'une microphotographie de la zone ainsi délimitée immédiatement et 3 jours après.

Après analyse de ces images, comme une certaine repousse naturelle a eu lieu pendant cette période, il est possible de dénombrer la répartition des cheveux en groupes *anagène*, *catagène* et *télogène*. Comme les photos sont superposables, il est possible de distinguer les endroits où les cheveux ont poussé (*anagène*), où les cheveux n'ont pas subi de changement (*catagène*) et les endroits où les cheveux ont disparu (*télogène*).

Le tableau suivant montre les pourcentages des cheveux présents dans les 3 phases (moyenne \pm SEM) pour chaque groupe, avant et après onze semaines de traitement.

Il est à noter, d'une part que les pourcentages obtenus avant le traitement correspondent aux fourchettes des valeurs trouvées dans la littérature, ce qui valide le panel choisi et la méthode de mesure et que, d'autre part cette amélioration a été constatée chez les 15 volontaires de l'étude.

	Anagène	Catagène	Télogène
Avant le traitement	72,6 \pm 3,38	19,9 \pm 0,3	4,2 \pm 1,73
Après le traitement	86,6 \pm 2,91	12,5 \pm 3,02	0,9 \pm 1,24

Ces résultats vont dans le sens d'une amélioration de la santé des cheveux puisque l'on observe une diminution des scores des deux phases de latence et de perte de cheveux (respectivement - 37 % et -78 % pour les groupes *catagène* et *télogène*) alors que la phase de repousse des cheveux augmente (groupe *anagène*: + 19 %).

Le traitement informatique des microphotographies précédentes permet de mesurer deux autres paramètres significatifs: le volume capillaire apparent et la vitesse de repousse des cheveux

Le tableau suivant montre les différences (*Après traitement* - *Avant traitement*) entre les variations observées pendant les 2 périodes de trois jours (unités arbitraires, moyenne \pm SEM) sur ces deux paramètres: volume capillaire apparent et vitesse de la repousse des cheveux pour chaque groupe.

	Volume apparent	Vitesse de repousse
Avant le traitement	4500 \pm 569	7,4 \pm 1,8
Après le traitement	7600 \pm 634	9,9 \pm 2,7

Ces résultats montrent clairement l'amélioration de la santé des cheveux puisque l'on observe une augmentation du volume apparent (+ 68,8%) et de la vitesse ce repousse des cheveux (+ 33,8 %).

Les deux derniers exemples démontrent clairement l'efficacité *in vitro* et, plus important encore pour le problème posé ici, *in vivo*, du N-Biotinyl-Gly-His-Lys sur l'ensemble des mécanismes qui entretiennent l'environnement du bulbe pileux dans les meilleures conditions possibles et qui se traduit par l'amélioration de la qualité et de la quantité des cheveux.

Sur la base des résultats montrés dans les exemples 5 et 6, l'effet bénéfique sur la synthèse de collagène de qualité et sur la tonicité cutanée autorise l'utilisation du N-Biotinyl-Gly-His-Lys pour tous les soins de la peau en général comme, par exemple, lorsque l'on recherche un effet antirides, raffermissant, tonifiant, sans que cette liste soit limitative.

Les mêmes tests ont été réalisés sur la Biotine seule ou sur le tripeptide Gly-His-Lys seul. Les résultats ne sont pas montré ici mais, l'examen des chiffres montre la présence d'une synergie importante créée par le greffage de la Biotine sur le tripeptide. Par exemple, dans le cas de l'exemple sur la synthèse de collagène, en présence de respectivement 5 ppm du tripeptide Gly-His-Lys ou de 5 ppm de Biotine (ce qui représente approximativement la contribution de chaque molécule dans 10 ppm de Biotinyl-G-H-K), les augmentations étaient de $18,2 \pm 0,3\%$ et $4,1 \pm 0,2\%$. A partir de ces résultats, sur la base de l'additivité des effets, il était possible de s'attendre à une augmentation d'environ 22 % or, le résultat trouvé dans l'exemple N°3 est de $65,2 \pm 3,2\%$ soit environ 3 fois la valeur attendue, ce qui correspond bien à la création d'une forte synergie entre les effets propres des deux molécules par leur greffage chimique.

Le N-Biotinyl-Gly-His-Lys peut être utilisé à des concentrations variant entre 0,5 et 1000 ppm (p/p), préférentiellement entre 1 et 20 ppm (p/p) dans le produit cosmétique ou dermopharmaceutique fini.

Le N-Biotinyl-Gly-His-Lys peut être utilisé sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulé dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-,

micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

Le N-Biotinyl-Gly-His-Lys peut être utilisé dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, pommades, lotions capillaires, shampoings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.

Le N-Biotinyl-Gly-His-Lys peut être utilisé avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits végétaux, extraits tissulaires, extraits marins, filtres solaires, antioxydants.

Sur la base des résultats montrés dans les exemples 5 et 6, l'effet bénéfique sur la synthèse de collagène de qualité et donc sur la tonicité cutanée, autorise l'utilisation du N-Biotinyl-Gly-His-Lys pour tous les soins de la peau en général comme, par exemple, lorsque l'on recherche un effet antirides, raffermissant, tonifiant, sans que cette liste soit limitative; ainsi que pour prévenir, réduire ou supprimer la chute des poils et des cheveux ainsi que pour favoriser leur repousse.

Le N-Biotinyl-Gly-His-Lys est utilisé dans les applications cosmétiques et dermatopharmaceutiques pour tous les soins de la peau (antirides, raffermissant, tonifiant....), sans que cette liste soit limitative; et particulièrement pour prévenir, réduire ou supprimer la chute des poils et des cheveux ainsi que pour favoriser leur repousse.

Le N-Biotinyl-Gly-His-Lys est utilisé soit seul, soit préalablement incorporé dans des préparations cosmétiques ou dermatopharmaceutiques dans la préparation d'un médicament, pour tous les soins de la peau (antirides, raffermissant, tonifiant....), sans que cette liste soit limitative, et particulièrement pour prévenir, réduire ou supprimer la chute des poils et des cheveux ainsi que pour favoriser leur repousse.

Revendications

1. Produit N-Biotinyl-Gly-His-Lys obtenu par le greffage d'une molécule de Biotine sur la partie N-terminale du tripeptide Gly-His-Lys, créant ainsi une synergie par rapport à la simple additivité des effets propres de ces deux produits.
2. Produit selon la revendication 1, estérifié sur le groupe carboxyle de la lysine.
3. Utilisation du biotinyl-tripeptide selon les revendications 1 à 2 dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques.
4. Compositions cosmétiques dermopharmaceutiques selon la revendication 3 caractérisées en ce que le tripeptide Gly-His-Lys est obtenu par synthèse chimique, par voie enzymatique, par fermentation ou par extraction de protéines d'origine végétale.
5. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 4 caractérisées en ce que le tripeptide Gly-His-Lys est utilisé par synthèse peptidique classique en phase homogène ou hétérogène ou par synthèse enzymatique à partir des acides aminés constitutifs.
6. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 5 caractérisées en ce que le N-Biotinyl-Gly-His-Lys selon les revendications 1 à 2 est obtenu soit
 - par greffage de la biotine sur le tripeptide par réaction d'esters activés de la biotine (par exemple : ester de paranitrophenyl ou ester de N-hydroxy-succinimide), ou par tout autre forme d'activation de la biotine (EtOCOCl, DCC, TBTU, BOP, ...); la réaction étant alors suivie d'une étape de purification réalisée par exemple par cristallisation ou par chromatographie,
 - par accrochage de la biotine sur la partie N-terminale de la Glycine directement pendant la synthèse en phase solide du tripeptide; en présence d'un excès de réactif; la dernière étape de clivage du peptide n'étant pas modifiée du fait de la présence de la biotine sur le peptide;sachant que dans les deux cas, en raison de la faible solubilité da la biotine dans les solvants organiques classiques, la réaction doit se faire dans le diméthylformamide (DMF).

7. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 6 caractérisées en ce que le N-Biotinyl-Gly-His-Lys selon les revendications 1 à 2 est utilisé à des concentrations variant entre 0,5 et 1000 ppm (p/p), préférentiellement entre 1 et 20 ppm (p/p) dans le produit fini.
- 5 8. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 7 caractérisées en ce que le N-Biotinyl-Gly-His-Lys selon les revendications 1 à 2 est utilisé sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, ou encapsulé dans des vecteurs comme les macro-, micro- ou nanocapsules, des liposomes ou des chylomicrons, ou inclus dans des macro-, 10 micro- ou nanoparticules, ou dans des microéponges, ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
- 15 9. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 8 caractérisées en ce que le N-Biotinyl-Gly-His-Lys selon les revendications 1 à 2 est utilisé dans toute forme galénique: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, poudres, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.
- 20 10. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 9 caractérisées en ce que le N-Biotinyl-Gly-His-Lys selon les revendications 1 à 2 est utilisé avec tout autre ingrédient habituellement utilisé: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits végétaux, extraits tissulaires, extraits marins, filtres solaires, antioxydants.
- 25 11. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 10 destinées aux soins de la peau, pour obtenir un effet antirides, raffermissant, tonifiant et particulièrement pour prévenir, réduire ou supprimer la chute des poils et des cheveux ainsi que pour favoriser leur repousse.
12. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 3 à 10 utilisées pour la préparation de médicament destiné aux soins de la peau, pour obtenir un effet antirides, raffermissant, tonifiant et particulièrement 30

pour prévenir, réduire ou supprimer la chute des poils et des cheveux ainsi que pour favoriser leur repousse.

13. Utilisation du seul N-Biotinyl-Gly-His-Lys selon les revendications 1 à 2, obtenu selon les revendications 4 à 6 à des concentrations selon la revendication 7, pour la préparation d'un médicament destiné aux soins de la peau, pour obtenir un effet antirides, raffermissant, tonifiant et particulièrement pour prévenir, réduire ou supprimer la chute des poils et des cheveux ainsi que pour favoriser leur repousse.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00531

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C07K5/083 A61K7/06 A61K7/48 A61K38/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 03482 A (ELLEM IND FARMACEUTICA ;SPORTOLETTI GIANCARLO (IT); DAL POZZO ALMA) 17 February 1994 (1994-02-17) page 4, line 8 – line 23 -----	1,3,6,13
A	WO 91 07431 A (PROCYTE CORP) 30 May 1991 (1991-05-30) claims; examples -----	1,3,6,13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>° Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 June 2000		03/07/2000
Name and mailing address of the ISA		Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/00531

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9403482	A 17-02-1994	IT AU EP JP	1261646 B 4703393 A 0656009 A 7509704 T	28-05-1996 03-03-1994 07-06-1995 26-10-1995
WO 9107431	A 30-05-1991	US AT AU AU CA DE DE EP ES FI JP KR NO US	5120831 A 167484 T 652136 B 6878191 A 2068324 A 69032429 D 69032429 T 0500745 A 2116986 T 922151 A 5501567 T 195550 B 921875 A 5550183 A	09-06-1992 15-07-1998 18-08-1994 13-06-1991 14-05-1991 23-07-1998 15-10-1998 02-09-1992 01-08-1998 12-05-1992 25-03-1993 15-06-1999 10-07-1992 27-08-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Office International No
PCT/FR 00/00531

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K5/083 A61K7/06 A61K7/48 A61K38/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 03482 A (ELLEM IND FARMACEUTICA ; SPORTOLETTI GIANCARLO (IT); DAL POZZO ALMA) 17 février 1994 (1994-02-17) page 4, ligne 8 - ligne 23 ----	1,3,6,13
A	WO 91 07431 A (PROCYTE CORP) 30 mai 1991 (1991-05-30) revendications; exemples -----	1,3,6,13

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 26 juin 2000	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 03/07/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document de Internationale No

PCT/FR 00/00531

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9403482	A	17-02-1994	IT 1261646 B AU 4703393 A EP 0656009 A JP 7509704 T	28-05-1996 03-03-1994 07-06-1995 26-10-1995
WO 9107431	A	30-05-1991	US 5120831 A AT 167484 T AU 652136 B AU 6878191 A CA 2068324 A DE 69032429 D DE 69032429 T EP 0500745 A ES 2116986 T FI 922151 A JP 5501567 T KR 195550 B NO 921875 A US 5550183 A	09-06-1992 15-07-1998 18-08-1994 13-06-1991 14-05-1991 23-07-1998 15-10-1998 02-09-1992 01-08-1998 12-05-1992 25-03-1993 15-06-1999 10-07-1992 27-08-1996