

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
30 janvier 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/007905 A2

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : A61K 7/40
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/02380
- (22) Date de dépôt international : 8 juillet 2002 (08.07.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 01/09366 13 juillet 2001 (13.07.2001) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : VINCIENCE [FR/FR]; 655, route du Pin Montard, Les Bouillides Sophia Antipolis Cedex, F-06410 Biot (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DAL FARRA, Claude [FR/FR]; 30, chemin de San Peyre, F-06650 Opio (FR). DOMLOGE, Nouha [SY/FR]; 10, traverse du Barri, F-06560 Valbonne (FR).
- (81) États désignés (national) : AU, BR, CA, CN, CO, DZ, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, MA, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, UA, US, UZ, ZA.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**  
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement
- Publiée :**  
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COSMETIC OR DERMATOLOGICAL USE OF PEPTIDES FOR PROMOTING ADHESION BETWEEN SKIN CELLS

(54) Titre : UTILISATION COSMETIQUE OU DERMATOLOGIQUE DE PEPTIDES POUR AUGMENTER L'ADHESION ENTRE LES CELLULES CUTANÉES

(57) Abstract: The invention concerns the use for preparing a cosmetic or dermatological composition, of a sufficient amount of peptides of sequence (Gly-Pro-Gln)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, wherein: n ranges between 1 and 3, and the amino acids can be in the form L, D or DL; the peptides or the composition being designed to: promote adhesion between skin cells, promote cell adhesion, to provide curative and/or preventive treatment for ageing skin symptoms (of physiological or solar origin) and to enhance skin appearance. In a preferred embodiment of the invention, said peptide is of sequence (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à l'utilisation pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique, d'une quantité efficace de peptides de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, dans laquelle n est compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL; les peptides ou la composition étant destinés à: augmenter l'adhésion entre les cellules cutanées, augmenter l'adhésion cellulaire, traiter de manière curative et/ou préventive les manifestations cutanées du vieillissement (d'origine physiologique et solaire) et améliorer l'aspect de la peau. Selon un mode de réalisation actuellement préféré de l'invention, le peptide précité est de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.



WO 03/007905 A2

## UTILISATION COSMETIQUE OU DERMATOLOGIQUE DE PEPTIDES POUR AUGMENTER L'ADHESION ENTRE LES CELLULES CUTANEEES

La présente invention se rapporte à l'utilisation pour la préparation d'une composition  
5 cosmétique ou dermatologique, d'une quantité efficace de peptides de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>, dans laquelle n est compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL ; les peptides ou la composition étant destinés à :

- augmenter l'adhésion entre les cellules cutanées,
- augmenter l'adhésion cellulaire,
- 10 - traiter de manière curative et/ou préventive les manifestations cutanées du vieillissement (d'origine physiologique et solaire) et améliorer l'aspect de la peau.

Selon un mode de réalisation actuellement préféré de l'invention, le peptide précité est de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

15 Le vieillissement cutané est un phénomène complexe qui est dû à de nombreux facteurs endogènes et exogènes. Cliniquement, on observe l'apparition de rides et ridules, une perte de l'élasticité cutanée, un relâchement des tissus cutanés et sous-cutanés...

De nombreuses voies de recherches sont proposées pour lutter contre le vieillissement, parmi lesquelles la protection contre l'environnement (soleil, pollutions...), l'activation de  
20 la régénération cellulaire, le renforcement de la matrice extracellulaire (collagène et élastine). Récemment, des études ont montré l'importance de l'adhésion kératinocytes - jonction dermo-épidermique dans le traitement des peaux âgées.

De façon générale, en augmentant l'adhésion des cellules entre elles, et l'adhésion entre les cellules et la matrice extra-cellulaire, il est possible de prévenir, voire de traiter le  
25 relâchement de la peau.

Cette dernière voie de recherche, prometteuse, est encore peu étudiée, alors que le rapprochement cellule-matrice ne peut que favoriser les échanges que l'on sait maintenant nombreux entre la cellule et son milieu environnant complexe.

30 Élément principal de la matrice extra-cellulaire, le collagène participe à la structure, à la consistance de la peau. Très étudié pour ses nombreuses fonctions, il est aussi abondamment utilisée en cosmétique.

Bien que son utilisation se soit réduite depuis les problèmes de l'ESB, le collagène demeure très employé notamment au travers des collagènes marins (natifs et hydrolysats). L'industrie cosmétique récemment sensibilisée à l'utilisation des peptides en biologie cutanée (séquences dérivées de l'alpha-MSH, de certains neuropeptides comme le NPY et la SP...), est à la recherche de peptides ayant une activité forte au niveau cutané.

Aussi est-il logique de voir de nombreuses études sur des séquences peptidiques essayant de mimer l'activité du collagène. Ces séquences essayent de se rapprocher soit d'une région spécifique du collagène, soit de sa forme très particulière.

10 On constate donc que subsiste le besoin d'un nouveau dérivé du collagène, ayant une action sur l'adhésion des cellules cutanées.

Or, la demanderesse a trouvé, de façon surprenante et inattendue, qu'une quantité efficace d'un peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  a une action sur l'adhésion cellulaire.

15

A la connaissance de la demanderesse, il n'a jamais été décrit dans l'art antérieur l'utilisation d'un peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  en cosmétique.

Ainsi, l'invention a pour objet premier l'utilisation pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique, d'une quantité efficace de peptides de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  dans laquelle n est compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL ; les peptides ou la composition étant destinés à augmenter l'adhésion entre les cellules cutanées.

20  
25 Par la suite, le terme « adhésion entre les cellules cutanées » doit s'entendre d'une part par l'adhésion entre les cellules cutanées et la matrice extra-cellulaire, et d'autre part par l'adhésion entre les cellules.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique, d'une quantité efficace de peptides de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  dans laquelle n est compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL ; les peptides ou la composition étant destinés à augmenter l'adhésion cellulaire.

30

L'invention se rapporte encore à l'utilisation pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique, d'une quantité efficace de peptides de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> dans laquelle n est compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL ; les peptides ou la composition étant destinés à traiter de manière curative et/ou préventive les manifestations cutanées du vieillissement (d'origine physiologique et solaire) et améliorer l'aspect de la peau.

10 Selon un mode de réalisation actuellement préféré de l'invention, le peptide précité est de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

Les peptides de l'invention peuvent être modifiés par acylation sur leur fonction N-terminale et/ou par estérification sur leur fonction C-terminale.

15 Les peptides de l'invention peuvent être obtenus par synthèse chimique ou enzymatique à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs dérivés.

Les peptides de l'invention peuvent aussi être obtenus par hydrolyse ménagée de protéines naturelles (animale ou végétale).

20 Les peptides de l'invention peuvent enfin être obtenus par biotechnologie (utilisation d'un micro-organisme modifié ou non par génie génétique).

25 L'homme de l'art, connaissant le métier de l'extraction et de la purification des peptides et protéines, pourra aisément envisager d'autres procédés d'obtention des peptides décrits par la demanderesse.

30 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le peptide précité est préalablement solubilisé dans un ou plusieurs solvants cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables comme l'eau, le propylène glycol, le butylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, l'éthanol, le propanol ou l'isopropanol.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le peptide précité est préalablement solubilisé dans un vecteur cosmétique ou pharmaceutique comme les

liposomes ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites, et plus généralement solubilisé dans, ou fixé sur, tout vecteur cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

- 5 Pour donner un ordre de grandeur, dans la présente invention, le peptide de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).

- 10 Pour donner un ordre de grandeur, dans la présente invention, le peptide de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).

Préférentiellement, les compositions selon la présente invention se présenteront sous une forme galénique adaptée à l'administration par voie topique cutanée, et couvrent toutes les formes cosmétiques ou dermatologiques. Ces compositions doivent donc contenir un milieu cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau, les poils ou les cheveux. Ces compositions pourront notamment se présenter sous forme de crèmes, émulsions huile-dans-eau, eau-dans-huile ou émulsions multiples, solutions, suspensions, ou encore poudres, adaptées à une application sur la peau, les lèvres et/ou les cheveux.

20 Ces compositions peuvent être plus ou moins fluides et avoir l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un sérum, d'une pommade, d'un gel, d'une pâte ou d'une mousse. Elles peuvent aussi se présenter sous forme solide, comme un stick ou être appliquées sur la peau sous forme d'aérosol. Elles peuvent être utilisées comme produit de soin et/ou comme produit de maquillage de la peau.

30 Ces compositions comprennent, de façon connue, les adjuvants nécessaires à leur formulation, tels que solvants, épaississants, diluants, anti-oxydants, colorants, filtres, pigments, charges, conservateurs, parfums, absorbeurs d'odeur. Dans tous les cas, ces adjuvants, ainsi que leurs proportions, seront choisis de manière à ne pas nuire aux propriétés recherchées dans l'invention. Ces adjuvants peuvent, par exemple, correspondre à 0,01 à 20 % du poids total de la composition.

Lorsque la composition de l'invention est une émulsion, la phase grasse peut représenter de 5 à 80 % en poids et de préférence de 5 à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les émulsionnants et coémulsionnants utilisés dans la composition seront choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. Par exemple, ils  
5 peuvent être utilisés en une proportion allant de 0,3 à 30 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

Bien entendu, l'homme de métier veillera à choisir les éventuels composés complémentaires, actifs ou non-actifs, et/ou leurs quantités, de telle sorte que les propriétés  
10 avantageuses du mélange ne soient pas, ou sensiblement pas, altérées par l'adjonction envisagée.

Aussi, un autre objet de l'invention consiste en une composition cosmétique ou dermatologique, caractérisée en ce qu'elle contient, dans un milieu cosmétiquement ou  
15 dermatologiquement acceptable, un peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  et préférentiellement de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_2\text{-NH}_2$ .

Dans les compositions de l'invention, le peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement  
20 en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).

Dans les compositions de l'invention, le peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_2\text{-NH}_2$  est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement  
25 en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).

L'invention concerne enfin un procédé cosmétique pour le traitement des manifestations du vieillissement, consistant à appliquer, sur la peau ou les cheveux, la composition telle que définie précédemment.

30 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples donnés à titre illustratif et non limitatif.

### Exemple 1 – Stabilité du peptide (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>

Le peptide (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> a été analysé à une concentration de 10<sup>-4</sup> M par HPLC avec une colonne type C18 et un gradient linéaire eau/TFA 0,1 % - acétonitrile/TFA 0,1 %.

- 5 Aucune dégradation du peptide n'a été observée après 24 heures à 25 °C, 37 °C et 60 °C. De plus, après 8 jours à 25 °C, le peptide ne présente toujours pas de dégradation.

- Des fibroblastes et des kératinocytes humains sont cultivés pendant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Pendant ce temps, les cellules peuvent libérer dans le milieu de culture des enzymes. Ensuite, le milieu de culture est retiré pour être mis en présence du peptide.
- 10 Après 24 heures, le peptide ne présente pas de dégradation.

- Lorsque le peptide est appliqué sur des fibroblastes et kératinocytes en culture, un dosage HPLC du milieu de culture révèle que la concentration en peptide décroît rapidement en quelques heures.
- 15

Ces données, prises dans leur ensemble, suggèrent la possibilité d'une pénétration du peptide dans la cellule. Cette hypothèse est ensuite confortée par les tests d'efficacité exposés dans l'exemple 2.

### 20 Exemple 2 – Effets du peptide de l'exemple 1 sur l'adhésion cellulaire

L'étude est réalisée dans des plaques de 96 puits, sur des kératinocytes cultivés dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

- Selon les puits, différents peptides de 3 à 25 acides aminés sont incubés à une concentration de 35 ppm. Les contrôles négatifs ne contiennent pas de peptide et les contrôles positifs sont effectués avec du collagène I à une concentration de 60 ppm.
- 25

- Après 3 heures, les puits sont totalement remplis de milieu, hermétiquement fermés, retournés et agités sur un agitateur tridimensionnel pendant 20 minutes. Puis les plaques sont vidées du milieu et ensuite le milieu restant est aspiré. 100 µl de MTT à 1 mg/ml sont ajoutés par puits et laissés pendant 3 heures à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. La solution est enfin retirée, 100 µl de DMSO ajoutés et la lecture est faite à 560 nm contre 630 nm.
- 30

Pour la plupart des peptides et pour les contrôles sans peptide une densité optique de 0,49 UDO est obtenue à 540 nm.

Pour le collagène I testé à 60 ppm, la densité optique est de 0,68 UDO.

Pour le peptide de l'exemple 1 (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> testé à 5 ppm, la densité optique est de 0,62 UDO.

- 5 En conclusion, après seulement 3 heures de contact avec les kératinocytes, le peptide (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> apporte une adhésion cellulaire semblable à celle du collagène I, bien qu'utilisé en concentration plus faible que le collagène.

### Exemple 3 – Préparation de compositions

10

Ces compositions ont été obtenues par simple mélange des différents composants. Les quantités indiquées sont données en pourcentage de poids.

#### 1-Emulsion huile dans eau

15

##### Phase huileuse :

■ Montanov 68 (Cetearyl Alcohol and Cetearyl Glucoside)	5.00	%
■ Huile de Jojoba	5.00	%
■ Huile de Vaseline	5.00	%
20 ■ Isopropyl Palmitate	7.00	%

##### Phase aqueuse :

■ Glycérine	5.00	%
■ Allantoïne	0.10	%
■ Peptide de l'exemple 1	5.00	%
25 ■ Sepigel 305 (Polyacrylamide and C13-14 Isoparaffin and Laureth-7)	0.30	%
■ Conservateur	0.50	%
■ Parfum	0.50	%
■ Eau	qsp	100 %

#### 30 2- Gel

■ Carbopol Ultrez 10 (sol. à 2% )	25.00	%
■ Triéthanolamine	0.50	%

	■ Peptide de l'exemple 1	1.0	%
	■ Conservateur	0.20	%
	■ EDTA (séquestrant)	0.10	%
	■ Parfum	0.50	%
5	■ Eau	qsp	100 %

### **3- Lotion**

	■ Mono Propylène Glycol	1.00	%
10	■ Allantoïne	0.30	%
	■ Glycérine	1.00	%
	■ Cetiol HE (PEG-7 Glyceryl Cocoate)	1.00	%
	■ Peptide de l'exemple 1	1 ppm	
	■ Conservateur	0.20	%
15	■ Parfum	0.50	%
	■ Eau	qsp	100 %

**REVENDICATIONS**

1. Utilisation pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique, d'une  
5 quantité efficace de peptides de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  dans laquelle n est  
compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL ; les  
peptides ou la composition étant destinés à augmenter l'adhésion entre les cellules  
cutanées.
- 10 2. Utilisation pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique, d'une  
quantité efficace de peptides de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  dans laquelle n est  
compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL ; les  
peptides ou la composition étant destinés à augmenter l'adhésion cellulaire.
- 15 3. Utilisation pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique, d'une  
quantité efficace de peptides de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  dans laquelle n est  
compris entre 1 et 3, et où les acides aminés peuvent être sous la forme L, D ou DL ; les  
peptides ou la composition étant destinés à traiter de manière curative et/ou préventive  
les manifestations cutanées du vieillissement (d'origine physiologique et solaire) et  
20 améliorer l'aspect de la peau.
4. Utilisation selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le peptide  
est de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_2\text{-NH}_2$ .
- 25 5. Peptides, tels que définis dans l'une des revendications précédentes, modifiés par  
acylation sur leur fonction N-terminale et/ou par estérification sur leur fonction C-  
terminale.
6. Peptides, tels que définis dans l'une des revendications précédentes, obtenus par  
30 synthèse chimique ou enzymatique à partir des acides aminés constitutifs ou de leurs  
dérivés.
7. Peptides, tels que définis dans l'une des revendications précédentes, obtenus par  
hydrolyse ménagée de protéines naturelles.

8. Peptides, tels que définis dans l'une des revendications précédentes, obtenus par biotechnologie.
- 5 9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le peptide est préalablement solubilisé dans un ou plusieurs solvants cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables comme l'eau, le propylène glycol, le butylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, l'éthanol, le propanol ou l'isopropanol.
- 10 10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 et 9, caractérisée en ce que le peptide est préalablement solubilisé dans un vecteur cosmétique ou pharmaceutique comme les liposomes ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites, et plus généralement solubilisé dans, ou fixé sur, tout vecteur cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.
- 15 11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 et 9 à 10, caractérisée en ce que le peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).
- 20 12. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 et 9 à 11, caractérisée en ce que le peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_2\text{-NH}_2$  est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).
- 25 13. Composition cosmétique ou dermatologique, caractérisée en ce qu'elle contient, dans un milieu cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable, un peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  et préférentiellement de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_2\text{-NH}_2$ .
- 30 14. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le peptide de séquence  $(\text{Gly-Pro-Gln})_n\text{-NH}_2$  est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).

15. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que le peptide de séquence (Gly-Pro-Gln)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> est utilisé en une concentration représentant de 0,0005 à 500 ppm (p/p) et préférentiellement en une concentration représentant de 0,05 à 50 ppm (p/p).

5

16. Procédé cosmétique pour le traitement des manifestations du vieillissement, consistant à appliquer, sur la peau ou les cheveux, la composition selon les revendications 13 à 15.