



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

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 7/48, 37/18, C07K 7/06	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/15279 (43) Date de publication internationale: 17 septembre 1992 (17.09.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00191 (22) Date de dépôt international: 2 mars 1992 (02.03.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/02510 1er mars 1991 (01.03.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): L'OREAL [FR/FR]; 14, rue Royale, F-75008 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BITRI, Lofti [FR/ FR]; 556, avenue Louis-Ravas, Résidence Las-Rèbes (Bât. 1C), F-34000 Montpellier (FR). BAREY, Michel [FR/FR]; 8, rue J.-Mascré, F-92330 Sceaux (FR). DAR- MANTON, Patrick [FR/FR]; 6, rue Auboin, F-92320 Bourg-la-Reine (FR).		(74) Mandataire: STALLA-BOURDILLON, Bernard; Cabinet Nony & Cie, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i>
(54) Title: COSMETIC COMPOSITION CONTAINING AT LEAST ONE PURIFIED PEPTIDE AS ACTIVE PRINCIPLE OBTAINABLE BY HYDROLYSIS OF CASEIN WITH OPIOD ACTIVITY (54) Titre: COMPOSITION COSMETIQUE CONTENANT COMME INGREDIENT ACTIF AU MOINS UN PEPTIDE PURIFIE POUVANT ETRE OBTENUE PAR HYDROLYSE DE CASEINE A ACTIVITE OPIOIDE (57) Abstract A cosmetic composition is characterised in that it contains at least one purified peptide as active principal obtainable by hydrolysis or proteolysis of milk caseins. This composition is particularly useful for improving the appearance of skin irritated by the effect of sunshine or other irritants. (57) Abrégé Composition cosmétique caractérisée par le fait qu'elle contient comme ingrédient actif au moins un peptide purifié pou- vant être obtenu par hydrolyse ou protéolyse de caséines du lait. Cette composition est destinée notamment à améliorer l'aspect de la peau irritée par l'action du rayonnement solaire ou d'autres agents irritants.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

Composition cosmétique contenant comme ingrédient actif au moins un peptide purifié pouvant être obtenue par hydrolyse de caseine à activité opioïde.

La présente invention a pour objet des compositions cosmétiques contenant comme ingrédient actif au moins un peptide pouvant être
5 obtenu par hydrolyse ou protéolyse de caséines du lait.

On sait que les caséines sont des protéines phosphorées qui précipitent à partir du lait écrémé à un pH de 4,6 à température ambiante.

On connaît, parmi les constituants des caséines, quatre
10 constituants majeurs : les caséines α_{s1} , α_{s2} , bêta et Kappa.

On sait que certains peptides pouvant être obtenus par hydrolyse de caséine ont une activité de type opioïde, cette activité pouvant être mise en évidence notamment par l'effet inhibiteur de la
15 contraction de l'iléon de cobaye stimulé électriquement. Cette inhibition est réversible sous l'action de la naloxone, qui est un antagoniste spécifique de la morphine. L'activité des peptides de caséine peut également être mise en évidence par l'inhibition des contractions induites par stimulation électrique du vas deferens de la
20 souris ou du rat, cette inhibition étant ici encore réversible sous l'action de la naloxone.

On a maintenant découvert que les peptides à activité opioïde pouvant être obtenus notamment par hydrolyse ou protéolyse de caséines du lait, ou des fractions peptidiques les contenant, ont des
25 propriétés cosmétiques intéressantes, qui permettent de les utiliser comme ingrédients actifs dans des compositions cosmétiques.

La présente invention a donc pour objet une composition cosmétique caractérisée par le fait qu'elle contient, comme ingrédient actif, au moins un peptide à activité opioïde pouvant être obtenu par
30 hydrolyse ou protéolyse de caséines du lait. La composition de l'invention est notamment une composition cosmétique pour la peau.

L'ingrédient actif peut être au moins un peptide purifié à activité opioïde, obtenu soit par synthèse peptidique, soit par purification d'un hydrolysate de caséines. L'ingrédient actif peut
35 également être constitué par une fraction peptidique contenant au moins un peptide à activité opioïde, cette fraction pouvant être

obtenue par purification partielle d'un hydrolysats total de caséïnes, par exemple par les méthodes chromatographiques, par exemple par chromatographie d'adsorption, chromatographie d'exclusion (tamisage moléculaire) ou chromatographie d'affinité, ou par les méthodes de
5 filtration sur membranes, notamment par ultrafiltration.

Les peptides ou fractions peptidiques utilisés comme ingrédients actifs dans les compositions de l'invention sont donc au moins partiellement purifiés, ce qui exclut l'incorporation comme ingrédient actif d'un hydrolysats total de caséine.

10 Les peptides présents comme ingrédients actifs dans les compositions cosmétiques de l'invention sont choisis parmi :

- l'heptapeptide :

Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu

ou l'hexapeptide correspondant :

15 Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu.

Les deux peptides ci-dessus ont été isolés à partir d'hydrolysats d' α_{s1} caséine ; voir par exemple C. ZIOUDROU et al, J.BIOL CHEM 254, n°7, 2446-2449 (1979).

- L'undécapeptide :

20 Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn Ser Leu,

- L' heptapeptide correspondant :

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile (encore appelé bêta-casomorphine-7),

- et le pentapeptide correspondant :

25 Tyr Pro Phe Pro Gly (encore appelé bêta-casomorphine-5).

On sait que l'undécapeptide, à activité opioïde modérée, lui-même précurseur de l'hepta et du pentapeptide à activité plus importante, provient de la bêta-caséine ; voir par exemples BRANTL et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1211-1216 (1979) et Life
30 Sci. 28, 1903-1909 (1981).

Certains peptides à activité opioïde qui sont mentionnés ci-dessus peuvent également être préparés par hydrolyse ou protéolyse de gluten de blé ou de protéines de soja ; voir par exemple C. ZIOUDROU et al., article déjà cité.

35 En outre, la synthèse de certains de ces peptides a été décrite par Spyros Loukas et al., Biochemistry 22 (19), pp 4567-4573 (1983).

Généralement, le ou les peptides à activité opioïde sont présents, dans la composition de l'invention, à raison de 0,1 à 5 % en poids.

On a en outre découvert un procédé particulièrement intéressant pour préparer des peptides ou fractions peptidiques utilisables dans les compositions cosmétiques de l'invention.

Ce procédé est caractérisé par le fait que :

- a) soit l'on soumet une solution de caséine à une hydrolyse acide à un pH non supérieur à 4,0 et à une température de 20 à 100°C,
 - 10 b) soit l'on soumet une solution de caséine à l'action d'une protéase de *Staphylococcus aureus*,
- puis que, dans les deux cas, on purifie selon les méthodes usuelles les fractions peptidiques obtenues et réunit les fractions peptidiques purifiées ayant une activité opioïde.

15 Dans des modes de réalisation particuliers, le procédé de l'invention peut également présenter les caractéristiques suivantes, prises isolément ou en combinaison :

- on effectue par exemple l'hydrolyse acide à un pH de 3,5 environ ; la concentration de la caséine dans la solution de départ est par exemple de 1 à 10 % en poids ; la caséine de départ est par 20 exemple une caséine alcalisoluble, ou une caséine selon Hammarsten, ou encore une caséine précipitée au pH isoélectrique à partir d'un lait écrémé ; la durée de l'hydrolyse dépend de la température ; on peut déterminer facilement dans chaque cas la durée de la réaction d'hydrolyse (généralement entre 15 min et 70 heures environ), de 25 préférence en déterminant par des expériences de routine le temps d'apparition d'une activité opioïde optimale dans les fractions peptidiques obtenues ;

- on effectue la réaction de protéolyse en utilisant de 25 à 50 unités d'enzyme par mg de caséine de départ ; la caséine de départ est 30 notamment une alpha-caséine ; le temps optimal de la réaction peut être déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide 17,5 % (SDS-PAGE) : par dépôts successifs d'aliquotes du milieu réactionnel enrichi en SDS (0,5 %) et en glycérol (10 %). L'hydrolyse s'accompagne d'une disparition progressive de la bande correspondant à 35 l'alpha-caséine et de l'apparition de fractions protéiques de poids moléculaire inférieur.

-4-

La protéase de *S. aureus* est par exemple celle de *S. aureus* Strain V8 type XVII-B commercialisée par SIGMA ;

- selon une variante, on peut faire précéder la protéolyse enzymatique d'un clivage de la caséine de départ avec du bromure de cyanogène, dont on sait qu'il coupe les liaisons peptidiques dans lesquelles une méthionine est impliquée par son carboxyle ; on utilise le bromure de cyanogène généralement à raison de 2,5 g/g d' α_S -caséine ; on opère par exemple en solution d'acide formique à 70 % ; voir OTANI et al. AGR.BIOL.CHEM. 50(3)-607-1986 ;
- 10 - la purification des fractions peptidiques obtenues peut être faite selon les méthodes usuelles, notamment par chromatographie d'exclusion ou par échanges d'ions ou par interactions hydrophobes ; après mise au point du procédé de purification par des expériences de routine, on pourra opérer par exemple de façon à isoler et/ou à réunir
- 15 les fractions peptidiques ayant une activité opioïde ; cette activité opioïde peut être déterminée selon les méthodes classiques telles que l'inhibition des contractions induites par stimulation électrique sur l'iléon de cobaye ou sur le vas deferens chez le rat ou la souris, cette inhibition étant levée par la présence d'un antagoniste de la
- 20 morphine tel que la naloxone ; pour la description de ces tests classiques voir par exemple : Method used for the study of opioids receptors-LESLIE-Pharmacological Reviews-Vol.39, n° 3-1987.

- On peut également purifier partiellement les fractions peptidiques à l'aide de membranes ayant un seuil de coupure approprié
- 25 (par exemple 5000) qui laissent passer les peptides de masse moléculaire inférieure au seuil de coupure, et qui retiennent les protéines ou fragments protéiques de masse moléculaire supérieure, y compris les protéases utilisées dans le procédé de protéolyse.

- Les fractions peptidiques utilisables comme ingrédient actif
- 30 dans les compositions de l'invention sont notamment les fractions exemptes de peptides de masse moléculaire supérieure à 5000, et en particulier de peptides de masse moléculaire supérieure à 3000.

- Les peptides présents dans les compositions de l'invention peuvent également être obtenus selon des procédés analogues à partir
- 35 de protéines du soja ou du gluten.

Les compositions de l'invention présentent notamment, lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, un effet calmant et/ou régénérant, permettant d'en améliorer l'aspect.

Ces propriétés peuvent être utilisées notamment pour réaliser
5 des compositions destinées à atténuer ou à éliminer les effets de l'irritation de la peau provoquée notamment par l'action du rayonnement solaire ou par l'action d'autres agents irritants physiques, chimiques ou biologiques ; ou encore des compositions permettant de lutter contre les effets du vieillissement de la peau,
10 afin d'en améliorer l'aspect.

Les compositions de l'invention contiennent les fractions peptidiques décrites ci-dessus en association avec un véhicule cosmétique approprié, c'est-à-dire un véhicule compatible avec l'application sur la peau et les muqueuses. Ledit véhicule cosmétique
15 est un véhicule classique permettant de présenter la composition notamment sous la forme de solutions aqueuses ou hydroalcooliques, d'émulsions (laits ou crèmes), sous la forme de gels aqueux, sous la forme de solides comme les bâtons (colorés ou non) pour les lèvres, ou encore sous la forme d'aérosols.

20 Les excipients permettant de préparer ces diverses formes de compositions cosmétiques sont connus et décrits notamment dans les ouvrages classiques de cosmétologie.

Les compositions de l'invention peuvent contenir en outre des adjuvants usuels tels que des parfums, des agents colorants, des
25 agents épaississants, des agents séquestrants, des modificateurs de pH, des agents conservateurs, des filtres UV, des tensioactifs ou émulsifiants, des corps gras, des polymères, etc...

Les compositions de l'invention peuvent se présenter notamment sous la forme de gels, de laits, de crèmes, d'émulsions ou de pâtes
30 constituant des compositions pour la toilette ou pour les soins de la peau, notamment après l'exposition au soleil, des compositions pour le bain, des compositions de protection contre le rayonnement solaire, des crèmes ou lotions pour les soins des mains, ou des bâtons pour les lèvres.

35 Ces compositions cosmétiques sont préparées selon les méthodes usuelles.

-6-

L'invention a également pour objet l'utilisation comme ingrédient actif, dans la préparation d'une composition cosmétique, d'au moins un peptide à activité opioïde tel que défini précédemment.

L'invention concerne en outre un procédé de traitement cosmétique consistant à appliquer sur la peau une quantité efficace d'une composition cosmétique telle que définie précédemment.

On a également découvert que les peptides décrits ci-dessus présentent, chez l'homme, au contact de la peau et des muqueuses, des propriétés pharmacologiques intéressantes, notamment des propriétés cicatrisantes et apaisantes. Ces propriétés peuvent être mises à profit dans des compositions telles que des baumes gingivaux, des solutions constituant des bains de bouche, des comprimés sublinguaux, des pastilles à sucer, des pâtes à mâcher, ou des encore des films ou pansements imprégnés. Ces compositions, qui contiennent lesdits peptides généralement à raison de 0,05 à 5 % en poids, en combinaison avec des excipients et adjuvants classiques, sont préparées selon les méthodes usuelles. L'invention a donc également pour objet l'utilisation des peptides tels que définis ci-dessus, éventuellement sous la forme d'hydrolysats ou de fractions peptidiques d'hydrolysats au moins partiellement purifiés, comme principes actifs dans la préparation d'une composition cicatrisante et/ou apaisante pour la peau et les muqueuses. Les compositions buccales peuvent en outre servir notamment au traitement des aphtes. L'invention concerne également un procédé de traitement correspondant de la peau ou des muqueuses, dans lequel on applique sur la peau ou les muqueuses, une quantité efficace d'une composition telle qu'elle vient d'être définie.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

30

EXEMPLES DE PREPARATION DE FRACTIONS PEPTIDIQUES

EXEMPLE 1 : Hydrolyse de l'alpha-caséine par la protéase de *Staphylococcus aureus*.

La caséine de départ est l'alpha-caséine commercialisée par Sigma, qui contient 85 % d'alpha_{s1}-caséine.

-7-

On solubilise l'alpha-caséine (5 g) dans 100 ml d'une solution tampon Tris HCl 125 mM, pH 6,8, en présence de 0,5 % de dodécylsulfate de sodium et de 10 % de glycérol. On ajoute la protéase de S.aureus Strain V8 Type XVII-B (commercialisée par Sigma) à raison de 50

5

unités/mg de caséine.
On laisse incuber à 37°C. L'hydrolyse de l'alpha-caséine peut être suivie par électrophorèse en gel de polyacrylamide, comme il a été indiqué précédemment.

En procédant à une étude systématique, et en fixant le temps d'hydrolyse à 3 heures, il est apparu que la concentration d'enzyme efficace pour hydrolyser la caséine est de l'ordre de 25 à 50

10

unités/mg de caséine.

On rappelle qu'une unité de protéase est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 µM d'alpha-phényl ester de l'acide N-t-butoxycarbonyl-L-glutamique par minute à pH 7,8 et à 37°C..

15

Par ailleurs, en fixant la concentration enzymatique à 50 unités/mg de caséine, le temps d'hydrolyse est compris entre 2 et 3 heures environ.

En variante, il est possible d'effectuer un traitement préliminaire de clivage de l'alpha-caséine par le bromure de cyanogène suivi d'une purification des peptides par tamisage moléculaire.

20

Par exemple, on solubilise 100 mg d'alpha-caséine (Sigma) dans une solution d'acide formique à 70 %. On ajoute, en deux fois, 250 mg de bromure de cyanogène. On laisse réagir pendant 24 heures sous

25

agitation. Les peptides obtenus sont séparés par tamisage moléculaire sur une colonne de Sephadex G50, équilibrée avec un tampon TEMED HCl 20 mM, pH 5,5, en présence d'urée 4,5 M. Le pic d'exclusion contient notamment un mélange de peptides ayant 61 et 63 résidus d'acides aminés, dont le second contient l'heptapeptide d'alpha_{sl}-caséine.

30

Les peptides obtenus sont alors soumis à l'hydrolyse sous l'action de la protéase de S.aureus, comme décrit précédemment.

EXEMPLE 2 : Hydrolyse acide.

On utilise comme produit de départ une solution de caséine selon Hammarsten (Merck réf. 2242) ou encore la caséine alcalisoluble (Merck réf. 2241).

35

On rappelle que la caséine alcalisoluble ainsi que la caséine selon Hammarsten sont de: caséines totales ($\alpha + \beta + \kappa$).

On solubilise la caséine dans un tampon acétate 50 mM, pH 3,5, la concentration de la caséine pouvant varier de 1 à 10 % en poids.

5 Une étude systématique a montré que l'on peut opérer par exemple à température ambiante (20°C) pendant 70 heures, à 35°C pendant 50 heures, à 43°C pendant 45 heures ou à 100°C pendant 15 min, en agitant pendant toute la durée de l'hydrolyse.

10 Après centrifugation dans les conditions suivantes (30000 g ou mieux 50000 g pendant 15 minutes à 4°C) on obtient une fraction peptidique dont on a vérifié qu'elle présente des propriétés de type opioïde dans les tests sur iléon de cobaye et sur vas deferens de souris ou de rats.

15 La fraction peptidique peut être concentrée par exemple par lyophilisation puis amenée à un volume déterminé par addition d'eau distillée ou d'une solution de NaCl à 0,9 % ou encore d'une solution tampon.

20 On peut également purifier davantage la fraction peptidique obtenue par une opération de filtration sur gel, par exemple sur Sephadex G75 équilibré et élué avec un tampon Tris, HCl 50mM, pH 8,8. Par mesure de la densité optique des éluats à 220 nm on obtient un profil d'éluion avec deux pics principaux : le deuxième pic correspond à une fraction ayant une activité de type opioïde plus importante.

25 Le rendement en peptides à activité opioïde est environ dix fois supérieur au rendement obtenu par protéolyse à l'aide de pepsine selon la méthode décrite par C. ZIOUDROU et al., article cité précédemment.

30 Pour l'utilisation dans les compositions cosmétiques selon l'invention, les fractions peptidiques (qui sont obtenues, par voie chimique comme par voie enzymatique, à pH acide) sont neutralisées par une base appropriée telle que l'hydroxyde de sodium.

EXEMPLES DE COMPOSITIONS

EXEMPLE A : Gel après-soleil

5	CONSTITUANTS	% en poids
	Hydrolysat de caséine obtenu selon l'exemple 1	3,00
	Polymère carboxyvinylique	0,30
10	Propylène glycol	20,00
	Acide 2-hydroxy 4-méthoxybenzophénone 5-sulfonique	0,05
	Sel de potassium de l'acide éthylène diaminetétracétique	0,02
15	Triéthanolamine	0,42
	FDC Blue 1	0,0002
	Huile de ricin hydrogénée oxyéthylénée à 60 moles d'oxyde d'éthylène (OE)	0,5
	Parfum	0,20
20	Parahydroxybenzoate de méthyle	0,2
	Alcool éthylique à 96 %	6,5
	Eau q.s.p.	100,00

25 On peut remplacer l'hydrolysat de caséine par celui de l'exemple 2.

Cette composition a été préparée de la façon suivante :

Dans un mélangeur, on prépare le gel en laissant gonfler sous agitation pendant deux heures le polymère carboxylique dans une phase aqueuse chauffée à 70°C renfermant le conservateur, le propylène glycol et le sel de potassium de l'acide éthylènediaminetétracétique.

Puis à 40°C, on rajoute sous agitation :

- l'acide 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone 5-sulfonique solubilisé dans l'eau avec la triéthanolamine,
- 35 - l'hydrolysat de caséine préalablement solubilisé dans l'eau additionnée de parahydroxybenzoate de méthyle.
- le colorant

-10-

- le parfum peptisé par l'huile de ricin hydrogénée dans une phase contenant l'alcool éthylique et de l'eau.

Ce gel appliqué sur la peau a un effet protecteur et apaisant.

5

EXEMPLE B : Emulsion apaisante après-soleil

	CONSTITUANTS	% en poids
10	Hydrolysate de caséine obtenu selon l'exemple 1 *	1
	Mélange d'alcool cétylstéarylique et cétylstéarylique oxyéthyléné (33 OE)	3
	Mono/distéarate de glycérol	1
15	Huile de vaseline	6,5
	Myristate d'isopropyle	3
	Polydiméthyl siloxane	0,5
	Alcool cétylique	1,0
	Ditertiobutyl-4-hydroxytoluène	0,03
20	Conservateur	0,3
	Parfum	0,3
	Eau q.s.p.	100,00

* ou de l'exemple 2

25

On a préparé cette émulsion de la façon suivante :

La phase grasse est émulsionnée sous agitation à 65°-70°C avec la phase aqueuse renfermant tous les constituants hydrosolubles, sauf l'hydrolysate de caséine et le parfum. L'hydrolysate de caséine est rajouté sous agitation lorsque la température de l'émulsion atteint 35°C. Enfin, on introduit le parfum.

30

Cette émulsion est appliquée sur la peau pour son effet apaisant après une longue exposition au soleil et en cas de "coup de soleil".

35

EXEMPLE C : Crème pour les lèvres

5	CONSTITUANTS	% en poids
10	Cire émulsifiante (Polywax NP)	6,00
	Mélange d'huile minérale et	
	d'alcool de lanoline	3,50
	Myristate de myristyle	2,00
	Huile de silicone	2,00
	Stéarate de glycérol	1,20
15	Cire d'abeilles	0,80
	Cire de paraffine	1,00
	Glycérol	6,00
	Polyvinylpyrrolidone (PVP-K30 de GAF)	2,00
	Hydrolysate de caséine obtenu	2,50
20	à l'exemple 1	
	Conservateur	0,20
	Ammoniaque q.s.p. pH = 6,5	
	Eau	q.s.p. 100,00
25		

* ou à l'exemple 2

Pour préparer cette crème, la phase grasse est maintenue à 70°C puis est émulsionnée dans la phase aqueuse chauffée à la même température. L'hydrolysate de caséine est ensuite ajouté à 30-35°C sous agitation, ainsi que (éventuellement) un parfum. Le pH est ajusté à froid.

Cette crème est particulièrement adaptée aux lèvres gercées ou crevassées, en particulier en raison du froid.

EXEMPLE D : BAUME GINGIVAL POUR BEBE

	CONSTITUANTS	% en poids
5	Hydrolysate de caséine obtenu selon l'exemple 1	2,00
	Propylène glycol	5,00
	Glycérol	20,00
10	Acide polyacrylique	2,00
	Agent aromatisant	0,10
	Conservateurs	0,15
	Hydroxyde de sodium, qsp pH = 7	
15	Eau	q.s.p. 100,00

On peut remplacer l'hydrolysate de caséine par celui obtenu à l'exemple 2.

20 Préparation

On réalise un gel en mélangeant l'acide polyacrylique, la moitié de l'eau et une partie du conservateur.

Le lendemain, on rajoute dans l'ordre et sous agitation :

- l'hydrolysate de caséine préalablement mélangé au glycérol,
- 25 - le reste du conservateur solubilisé dans l'eau
- l'agent aromatisant en solution à 2 % dans le propylène glycol
- l'hydroxyde de sodium en solution aqueuse

Une agitation de 45 minutes, avec dégazage, termine la fabrication.

- 30 - On applique ce baume sur les gencives des nouveau-nés pour calmer les douleurs des premières dents.

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique caractérisée par le fait qu'elle contient comme ingrédient actif au moins un peptide, au moins partiellement purifié, choisi parmi :

Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu,

5 Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu,

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn Ser Leu,

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile, et

Tyr Pro Phe Pro Gly.

10 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée par le fait que ledit peptide est présent à raison de 0,1 à 10 % en poids, en particulier de 0,1 à 5 % en poids.

15 3. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que ledit ingrédient actif est une fraction peptidique au moins partiellement purifiée, contenant au moins un peptide tel que défini dans la revendication 1.

4. Composition selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que ladite fraction peptidique est exempte de peptides de masse moléculaire supérieure à 5000.

20 5. Composition selon la revendication précédente, caractérisée par le fait que ladite fraction peptidique est exempte de peptides de masse moléculaire supérieure à 3000.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait que le peptide ou la fraction peptidique quelle contient peut être obtenu par un procédé dans lequel
25 a) soit l'on soumet une caséine à une hydrolyse acide à un pH non supérieur à 4,0 et à une température de 20 à 100°C,
b) soit l'on soumet une caséine à l'action d'une protéase de *Staphylococcus aureus*,
puis, dans les deux cas, on purifie selon les méthodes usuelles les fractions peptidiques obtenues.

30 7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait qu'elle contient ledit ingrédient actif dans un véhicule cosmétique approprié.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous la
35

forme d'une solution aqueuse ou hydroalcoolique, d'une émulsion, d'un gel aqueux, ou sous la forme d'un bâton, coloré ou non, pour les lèvres.

5 9. Utilisation comme ingrédient actif, dans la préparation d'une composition cosmétique, d'au moins un peptide ou fraction peptidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

10 10. Utilisation selon la revendication 9, dans la préparation d'une composition cosmétique destinée à améliorer l'aspect de la peau irritée par l'action du rayonnement solaire ou d'autres agents irritants, ou destinée à lutter contre les effets du vieillissement de la peau.

15 11. Procédé de traitement cosmétique, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau une quantité efficace d'une composition telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.

20 12. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que l'on applique ladite composition pour améliorer l'aspect de la peau irritée par l'action du rayonnement solaire ou d'autres agents irritants, ou pour lutter contre les effets du vieillissement de la peau.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 92/00191

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ A61K 7/48; A61K 37/18; C07K 7/06		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	A61K; C07K; C12P	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	US, A, 3 061 512 (DAVID W. ANDERSON ET AL.) 30 October 1962 see column 1, line 54- line 67; claims 1-6	1-12
Y	CH-- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 97, No. 21, 22 November 1982, Columbus, Ohio, US; abstract No. 175260Q, C. ZIOUDROU ET AL: "Synthetic opioid alpha-casein peptides. Structure activity relationship" & Adv. Endog. Exog. Opioids, Proc. Int. Narc. Res. Conf., 12th 1981, 392-5 see abstract	1-12
Y	US, A, 3 558 770 (A. L. GORDON ET AL.) 26 January 1971 see column 1, line 53 - line 61; claims 1-6	1-12
Y	EP, A, 0 019 829 (HANSJÖRG TESCHEMACHER ET AL.) 10 December 1980 see claims 1-20	1-12
A	US, A, 4 524 136 (BYUNG S.-LEE ET AL.) 18 June 1985 see column 1, line 19 - column 25; claims 1-7	1-12
	-- ./.	
* Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "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. "&" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search 19 June 1992 (19.06.92)		Date of Mailing of this International Search Report 14 July 1992 (14.07.92)
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, No. 15, 10 October 1983, Columbus, Ohio, US; abstract No. 118021E, S. LOUKAS ET AL.: "Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins" & Biochemistry 1983, 22(19), 4567-73 (cited in the application) see abstract --	1-12
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, No. 7, 14 February 1983, Columbus, Ohio, US; abstract No. 52128R, V. BRANTL ET AL.: "Opiate-like acting acting compounds in milk and milk products. 2. Isolation, structure analysis and biological effects of beta-casomorphins" & Milchwissenschaft 1982, 37(11), 641-4 see abstract --	1-12
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, No. 3, 21 January 1980, Columbus, Ohio, US; abstract No. 15233B, AGNES HENSCHEN ET AL.: "Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone" & Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979, 360(9), 1217-24 see abstract	1-12

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200191
SA 57850**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 19/06/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-3061512		None	
US-A-3558770	26-01-71	None	
EP-A-0019829	10-12-80	DE-A- 2921216	04-12-80
		AT-T- 5314	15-12-83
		AU-A- 5984080	22-12-80
		WO-A- 8002696	11-12-80
		US-A- 4681871	21-07-87
US-A-4524136	18-06-85	None	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 92/00191

Demande Internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 A61K7/48; A61K37/18; C07K7/06		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	A61K ; C07K ; C12P	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	US,A,3 061 512 (DAVID W. ANDERSON ET AL.) 30 Octobre 1962 voir colonne 1, ligne 54 - ligne 67; revendications 1-6	1-12
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 97, no. 21, 22 Novembre 1982, Columbus, Ohio, US; abstract no. 175260Q, C. ZIOUDROU ET AL: 'Synthetic opioid alpha-casein peptides. Structure activity relationship' & Adv. Endog. Exog. Opioids, Proc. Int. Narc. Res. Conf., 12th 1981, 392-5 voir abrégé	1-12
Y	--- US,A,3 558 770 (A. L. GORDON ET AL.) 26 Janvier 1971 voir colonne 1, ligne 53 - ligne 61; revendications 1-6 --- -/-	1-12
^o Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ "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 postérieurement à la date de dépôt international ou à 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 "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		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
19 JUIN 1992	14. 07 92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	SIATOU E. 	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)	
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸		
Y	EP,A,0 019 829 (HANSJÖRG TESCHEMACHER ET AL.) 10 Décembre 1980 voir revendications 1-20	1-12		
A	US,A,4 524 136 (BYUNG S. LEE ET AL.) 18 Juin 1985 voir colonne 1, ligne 19 - colonne 25; revendications 1-7	1-12		
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 15, 10 Octobre 1983, Columbus, Ohio, US; abstract no. 118021E, S. LOUKAS ET AL.: 'Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins' & Biochemistry 1983, 22(19), 4567-73 cité dans la demande voir abrégé	1-12		
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 7, 14 Février 1983, Columbus, Ohio, US; abstract no. 52128R, V. BRANTL ET AL.: 'Opiate-like acting compounds in milk and milk products. 2. Isolation, structure analysis and biological effects of beta-casomorphins' & Milchwissenschaft 1982, 37(11), 641-4 voir abrégé	1-12		
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, no. 3, 21 Janvier 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 15233B, AGNES HENSCHEN ET AL.: 'Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone' & Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979, 360(9), 1217-24 voir abrégé	1-12		

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

FR 9200191
SA 57850

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

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 19/06/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A-3061512		Aucun	
US-A-3558770	26-01-71	Aucun	
EP-A-0019829	10-12-80	DE-A- 2921216	04-12-80
		AT-T- 5314	15-12-83
		AU-A- 5984080	22-12-80
		WO-A- 8002696	11-12-80
		US-A- 4681871	21-07-87
US-A-4524136	18-06-85	Aucun	