

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 23.02.93.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 02.09.94 Bulletin 94/35.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société Anonyme dite : COLETICA*
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : *Perrier Eric et Allard Roland.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Cabinet Germain & Maureau.*

⑤4 Compositions pharmaceutiques et cosmétiques à base d'albumine végétale, préparations contenant de telles compositions et procédé de préparation.

⑤7 Composition pharmaceutique et notamment dermatologique, ou cosmétique, comprenant de l'albumine à titre de principe actif seul ou en combinaison avec au moins un autre principe actif, caractérisée en ce que l'albumine est d'origine végétale et se présente dans ladite composition sous la forme d'une fraction de protéines solubles, dans leur état natif, en phase aqueuse non saline, à pH compris entre 4 et 7, la teneur de ladite fraction en dites protéines solubles étant d'au moins 25 % en poids sec des protéines totales de ladite fraction.

FR 2 701 847 - A1



**Compositions pharmaceutiques et cosmétiques à base d'albumine
végétale, préparations contenant de telles compositions
et procédé de préparation**

La présente invention concerne des compositions
5 pharmaceutiques et notamment dermatologiques, et cosmétiques pour
application topique, contenant à titre de principe actif seul, ou en
combinaison avec au moins un autre principe actif, de l'albumine, des
préparations contenant de telles compositions, qui formulées de manière
appropriée sont destinées à une application topique, ainsi qu'un procédé
10 pour fabriquer de telles préparations.

L'albumine est une fraction protéique naturelle définie comme
une fraction de protéines solubles, dans leur état natif, en solution
aqueuse non saline à pH compris entre 4 et 7. Selon l'invention, on entend
par "albumine" une telle fraction protéique particulièrement prise à l'état
15 pur ou encore, prise à l'état de fraction enrichie en protéines solubles dans
un mélange d'autres protéines végétales, les protéines solubles
représentant alors une teneur au moins égale à 25% en poids sec de
protéines totales.

En dermatologie et cosmétologie, l'albumine d'origine animale,
20 et en particulier celle extraite de sérum de bovins ou d'équidés, est utilisée
depuis très longtemps car ses propriétés, qui sont les suivantes, lui
permettent de nombreuses applications :

- diminution immédiate mais non durable du réseau micro-
dépressionnaire cutané,
- 25 - obtention d'un "effet tenseur" cutané,
- bon pouvoir hydratant sur les couches superficielles de
l'épiderme,
- action sur la régénération cellulaire,
- très grand confort à l'utilisation,
- 30 - molécules naturelles et biodégradables disponibles en grande
quantité.

Ces propriétés sont exploitées dans de nombreuses
préparations pharmaceutiques ou cosmétiques, parmi lesquelles les
principales sont les suivantes :

- en ampoules dans lesquelles l'albumine animale est fortement concentrée (5 à 30% d'une solution d'albumine à 30%) et est utilisée pour son "effet tenseur" cutané immédiat,

- dans des formules où l'albumine animale en concentration assez élevée (2 à 10% d'une solution d'albumine à 30%) est utilisée pour son action de dynamisant cellulaire,

- dans des formules du type émulsion huile dans l'eau, dans lesquelles l'albumine animale en faible concentration (1 à 5% d'une solution d'albumine à 30%) est utilisée pour l'effet de confort qu'elle apporte.

En vue d'obtenir de nouveaux principes actifs d'origines largement diversifiées, les recherches dans le domaine cosmétique s'orientent de plus en plus vers des extraits végétaux extrêmement bien caractérisés.

La présente invention a précisément découvert que des compositions comprenant de l'albumine d'origine végétale qui conduisent à des effets cosmétiques largement supérieurs à ceux obtenus avec l'albumine d'origine animale. De façon très inattendue, l'albumine végétale se comporte en formulation comme l'albumine d'origine animale et en particulier comme celle du sérum bovin.

Ce comportement est particulièrement surprenant car les structures physicochimiques des albumines animales et végétales, s'agissant aussi bien des masses moléculaires, que des acides aminés constitutifs, des structures spatiales, des points isoélectriques..., ainsi que leurs fonctions respectives sont très différentes.

Par une formulation appropriée de compositions contenant de l'albumine végétale, selon l'invention, on s'est aperçu que le spectre des propriétés de l'albumine végétale était au moins aussi large que celui de l'albumine de sérum de bovins, et que certaines activités, étaient fortement renforcées.

L'albumine végétale est en général un mélange protéique complexe, constitué par les protéines fonctionnelles que l'on retrouve dans les graines, et est une fraction protéique définie selon la classification de OSBORNE (OSBORNE T.B. et CAMPBELL G.F., J. Am Chem. Soc., 20, 348-362 (1998)).

Si les protéines végétales et en particulier des protéines de céréales (blé, orge, maïs...) sont largement utilisées dans l'alimentation humaine, comme dans la panification et dans d'autres industries alimentaires de cuisson, leurs applications à d'autres domaines sont rares.

- 5 Les protéines végétales issues des légumineuses et des oléagineux ont été peu étudiées et sont très peu utilisées.

Pourtant, les espèces végétales fournissant des graines récoltées de façon industrielle comprennent, les céréales ayant une teneur en protéines de 10 à 15%, les oléagineux ayant une teneur en protéines voisine de 25% et les légumineuses ayant une teneur en protéines voisine de 55%.

L'albumine contenue dans les compositions de l'invention est obtenue essentiellement à partir de graines choisies parmi les graines de légumineuses, les graines d'oléagineux et les graines de céréales.

- 15 Si le taux de protéines des différentes graines végétales est essentiel, la teneur relative en albumine est encore plus importante pour le choix du végétal, à effectuer.

Le tableau I suivant montre, pour différentes espèces végétales, leur teneur en protéines totales et la teneur en albumine des protéines totales.

TABLEAU I

Source de protéines	Teneur en protéines * %	Teneur en Albumine * % de protéines
Céréales	10 - 15	10-15
Oléagineux	≈ 25	20-40
Légumineuses	≈ 25	15-35

* valeurs moyennes

- 25 Ce tableau montre que l'espèce des légumineuses fait partie des espèces les plus concentrées en albumine. Pour des raisons pratiques, c'est elle que l'on utilisera au cours des essais expérimentaux développés plus loin.

Selon l'invention, l'albumine est directement extraite de graines choisies parmi les graines de légumineuses, les graines d'oléagineux et les

graines de céréales ou bien elle est obtenue à partir d'extraits protéiques concentrés en albumine de végétaux ayant une teneur en protéines totales au moins égale à 50%.

Avantageusement, l'extrait protéique concentré est un isolat
5 protéique dont la teneur en protéines totales est comprise entre 70 et 98%.

Ces extraits sont disponibles dans le commerce ou préparés préalablement à l'extraction de l'albumine à partir des graines.

Pour cela, après élimination des écorces et des germes, les
10 graines sont broyées et les principales fractions en amidon sont éliminées. L'extrait protéique est alors purifié puis séché, afin de faciliter le stockage et la manutention des produits intermédiaires.

Selon l'invention, les compositions se présentent sous la forme de solutions, et en particulier de solutions aqueuses, dans lesquelles la
15 concentration en albumine est au moins égale à 2,5 % en poids sec.

Selon une autre présentation de compositions de l'invention, elles sont sous forme solide, et leur matière sèche représente une proportion pondérale élevée, au moins égale à 90%.

Un autre objet de l'invention est une préparation
20 pharmaceutique, notamment dermatologique, ou cosmétique incorporant une composition de l'invention et un support pharmaceutiquement ou cosmétologiquement acceptable, destinée à une application topique.

Une préparation de l'invention, quand elle est formulée de manière appropriée, peut constituer soit une crème de soin avec une
25 teneur en albumine comprise entre 0,05 % et 5 % du poids sec, soit une lotion ou un lait pour le visage et/ou pour le corps, avec une teneur en albumine comprise entre 0,05 % et 5 % du poids sec, soit une solution ou sérum à effet tenseur cutané immédiat avec une teneur en albumine comprise entre 5 et 30 % du poids sec.

30 La présente invention concerne aussi un procédé pour préparer une préparation pharmaceutique ou cosmétique, contenant de l'albumine végétale, ce procédé comprenant les étapes suivantes :

- par extraction en phase aqueuse à partir d'un extrait végétal protéique concentré, puis centrifugation, on sépare la fraction albumine,
- 35 - on concentre l'albumine par ultrafiltration sur membrane, jusqu'à une concentration comprise entre 2 et 70%,

- on incorpore l'albumine végétale obtenue, en solution aqueuse, à un support pharmaceutiquement ou cosmétologiquement acceptable.

Avantageusement, l'albumine obtenue est préparée sous forme stabilisée par l'addition d'auxiliaires de stabilisation, tels que des alcools (méthanol, éthanol,...) ou des acides gras à chaînes courtes ou leurs sels (caprylate de sodium) ou de l'acétyltryptophane de sodium, puis chauffage et filtration. Elle est avantageusement protégée contre toute attaque microbienne par l'addition de conservateurs tels que les dérivés de parabènes, le phénoxyéthanol, ou différents types de glycol.

Après l'étape de concentration, l'albumine concentrée peut être séchée par tout procédé de séchage connu non dénaturant, mais en particulier par atomisation à basse température ou par lyophilisation, et ceci dans un souci de faciliter la manutention et le stockage de l'albumine.

L'albumine sous forme solide ainsi obtenue est avantageusement stérilisée par l'oxyde d'éthylène ou par rayonnements β ou γ .

Pour permettre son incorporation en vue d'obtenir une préparation de l'invention, l'albumine sous forme solide est préalablement dissoute dans un faible volume d'eau ou solution aqueuse.

Les compositions de l'invention peuvent, quand elles sont formulées de manière appropriée, constituer des préparations pharmaceutiques ou cosmétiques et notamment des préparations du type émulsion huile dans l'eau ou eau dans l'huile, des lotions, des sérums.

Par application topique de telles préparations, un effet tenseur cutané immédiat est produit, cet effet étant largement supérieur à celui obtenu avec l'albumine bovine utilisée dans des conditions similaires.

On observe aussi les effets suivants :

- effet filmogène aussi important que celui obtenu avec l'albumine bovine,
- effet hydratant,
- effet "miroir" permettant une bonne préparation de la peau aux différentes étapes du maquillage,
- effet substantif élevé, lié à la présence de protéines de masses moléculaires importantes dans la fraction albumine, ainsi qu'à une

teneur non négligeable en acides aminés soufrés, l'effet substantif d'un produit étant défini par son taux de rétention sur la zone d'application.

Dans les exemples qui vont suivre, chacune des étapes du procédé pour obtenir une préparation de l'invention est détaillée, puis
5 différentes applications de compositions de l'invention sont présentées et les effets et avantages de préparations contenant de telles compositions mis en évidence.

La Figure unique illustre les effets cosmétiques d'une préparation de l'invention, en représentant les courbes de déformation
10 obtenues par aspiration de peaux traitées par une solution à effet tenseur cutané.

EXEMPLE 1 : Cet exemple illustre chacune des étapes de la préparation d'une composition de l'invention à partir de pois.

15

1) Préparation de l'isolat à partir de graines de pois

Le Pois (*Pisum sativum*) est essentiellement constitué de fibres solubles et insolubles, d'amidon riche en amylose et en amylopectine, et
20 de protéines.

Après une première étape de décorticage où les fibres externes de la graine sont enlevées mécaniquement, les grains sont concassés grossièrement et l'amidon, qui constitue le principal composé, est éliminé
mécaniquement par différence de densité.

25 La fraction mineure contenant une teneur importante en protéines est purifiée une seconde fois de manière à éliminer presque totalement l'amidon résiduel. Elle est alors ajustée à une teneur minimale de 88 % en protéines et est appelée isolat protéique de pois. Elle est également accessible dans le commerce sous cette appellation.

30 Dans cet isolat de pois, la fraction albumine représente environ 13 à 14 % des protéines totales des deux variétés de pois testées le plus couramment, c'est-à-dire *Century* et *Trapper*.

2) Préparation d'une composition contenant de l'albumine à partir d'isolat de pois

L'isolat de pois obtenu en 1) est traité comme suit:

- 5 a) Dissolution de 10 Kg de l'isolat de pois dans 100 litres d'eau déminéralisée sous agitation vigoureuse.
- b) Ajustement du pH (entre 4,7 et 5,3) à l'aide de l'acide chlorhydrique 6N et de la soude 6N. Ces valeurs de pH ont été préalablement déterminées comme étant les valeurs auxquelles la solubilité
- 10 de la fraction protéique soluble de pois est maximale.
- c) Agitation maintenue pendant 18 heures à 4°C pour l'obtention d'un mélange très homogène.
- d) Centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes sur une centrifugeuse travaillant en discontinu. Récupération du surnageant.
- 15 e) Ultrafiltration sur membranes possédant un seuil de coupure de 10.000 D. Concentration de la matière sèche jusqu'à une valeur de 20%.
- f) Lyophilisation puis stérilisation par rayons gamma.

3) Caractérisation de la fraction albumine ainsi purifiée

Suivant les techniques d'analyse utilisées, la fraction albumine du pois permet d'isoler plus ou moins de constituants différents ; ainsi, après une extraction des albumines dans des conditions non dénaturantes:

- 25 - deux constituants principaux peuvent être mis en évidence par ultracentrifugation,
- le passage sur colonne Sephadex G-150 permet d'isoler trois composés, ayant les masses moléculaires suivantes : 78.000, 47.000 et 26.000 daltons,
- 30 - une électrophorèse sur gel à pH 10 permet de révéler six composés majeurs et plusieurs composés mineurs,
- une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS ne permet de révéler que deux constituants majeurs avec des poids moléculaires de 25.000 et 15.000 D.

Les analyses physico-chimiques sur de l'albumine végétale peuvent donner les résultats ci-après :

Résultats donnés en g pour 100 g de produit :

	Matière sèche	92
5	Matières minérales totales	9
	Azote total (N)	11
	Protéines totales (Nx6,25*)	70.6
	Sucres (dosage à l'anthrone)	12.4
	pH à 3 %	4.5 - 7.5

10 * facteur de conversion de l'azote total en protéines totales, obtenu à partir de la quantité d'acides aminés constitutifs des protéines ayant un radical portant des groupements aminés.

15 Une analyse des acides aminés de cette fraction albumine a été réalisée sur station SYSTEM 6300 (BECKMAN). Les résultats sont les suivants :

	Acides aminés	Nombre * de résidus	Acides aminés	Nombre * de résidus
	Asp	110.09	Leu	29.74
	Thr	67.30	Tyr	13.83
20	Ser	36.26	Phe	14.68
	Glu	169.82	Lys	90.34
	Gly	118.43	His	20.39
	Ala	172.51	Arg	38.27
	Val	48.26	Cys	2.32
25	Met	3.31	Pro	39.13
	Ile	25.3	Trp	nd

**Aminogramme de l'albumine de pois
(en nombre de résidus pour 1000 résidus totaux)*

30 **EXEMPLE 2** : Cet exemple présente une variante de la préparation d'une composition contenant de l'albumine à partir d'isolat de pois, de l'exemple 1.

35 a) Dissolution de 10 Kg de l'isolat de pois dans une quantité d'eau déminéralisée comprise entre 50 et 1000 litres sous agitation

vigoureuse. Plus la quantité d'eau mise en oeuvre est importante, plus l'extraction est optimale.

b) Ajustement du pH, à l'aide de tout autre acide fort (HCl, H₂SO₄..) ou faible (acide sorbique, acide acétique, acide lactique..) et à l'aide de toute autre base forte (NaOH, KOH..) ou faible (sorbate, acétate ou lactate de Na ou de K), ou encore à l'aide de tampons phosphate, citrate ou acétate (à une molarité préférentiellement inférieure à 1M), entre 4,7 et 5,3. Ces valeurs de pH ont été préalablement déterminées comme étant les valeurs auxquelles la fraction protéique soluble de pois est maximale.

c) Agitation maintenue pendant une durée pouvant aller de 1 à 24 heures à une température comprise préférentiellement entre 4°C et 30°C pour l'obtention d'un mélange très homogène mais non dégradé.

d) Centrifugation à haute vitesse à l'aide de centrifugeuse travaillant en continu ou en discontinu. Récupération du surnageant.

e) Ultrafiltration sur membranes possédant un seuil de coupure compris entre 2.000 et 100.000 D, mais préférentiellement compris entre 5.000 et 20.000 D. Con-centration de la matière sèche jusqu'à une valeur comprise entre 2 et 70 % mais préférentiellement voisine de 20 %.

f) Séchage par tout type de procédé non dénaturant, comme l'atomisation à basse température ou la lyophilisation. Stérilisation par oxyde d'éthylène ou par rayonnements bêta ou gamma.

EXEMPLE 3 : Cet exemple illustre la préparation d'une composition de l'invention sous forme liquide.

Le même protocole opératoire que l'exemple 1 ou 2 est suivi mais le produit n'est pas séché et il est conservé sous forme liquide, et correspond à une concentration en matière sèche comprise entre 2 et 70% mais préférentiellement voisine de 20 %. Le produit est alors stabilisé par l'ajout d'auxiliaires de stabilisation, tels que ceux cités précédemment, et protégé contre toute attaque microbienne par l'ajout de conservateurs tels que les dérivés de parabènes, le phénoxyéthanol... Il peut être ensuite chauffé 10 heures à 60°C puis filtré à nouveau pour être présenté sous forme liquide, stable, sans trouble.

EXEMPLE 4 : Cet exemple illustre un autre procédé de préparation d'une composition de l'invention à partir d'un isolat de pois.

5 a) Dissolution de 10 Kg de l'isolat de pois dans 100 litres d'eau déminéralisée sous agitation vigoureuse.

b) Extraction des protéines en tampon phosphate pH7, NaCl 1M.

10 c) Précipitation des protéines par addition de sulfate d'ammonium à 70% de saturation, et centrifugation avec élimination du surnageant.

d) Redissolution des protéines en tampon phosphate pH7, NaCl 0,2M.

e) Dialyse contre de l'eau permutée : les globulines précipitent.

f) Centrifugation et récupération du surnageant.

15 g) Ultrafiltration sur membranes possédant un seuil de coupure de 10.000 D. Concentration de la matière sèche jusqu'à une valeur de 20 %.

h) Lyophilisation puis stérilisation par rayons gamma.

20 **EXEMPLE 5** : Cet exemple présente une variante du procédé de préparation de l'exemple 4.

25 a) Dissolution de 10 Kg de l'isolat de pois dans une quantité d'eau déminéralisée comprise entre 50 et 1000 litres sous agitation vigoureuse. Plus la quantité d'eau mise en oeuvre est importante, plus l'extraction est optimale.

b) Extraction à l'aide de toute autre solution tampon : tampons phosphate, citrate ou acétate ou aconitate ou succinique ou borate, et à l'aide d'une concentration en sel comprise entre 0,1 et 3M.

30 c) Précipitation des protéines, par addition de sulfate d'ammonium à une concentration au moins supérieure à 50% de saturation, ou par tout autre agent de précipitation des protéines y compris les solvants organiques. Centrifugation et élimination du surnageant.

35 d) Redissolution des protéines dans tout tampon ou tout milieu salin solubilisant préférentiellement la fraction albumine ainsi que, dans une moindre mesure les globulines.

e) Elimination des sels par dialyse ou par diafiltration afin de faire précipiter les globulines non solubles dans l'eau permutée.

f) Centrifugation et récupération du surnageant.

g) Ultrafiltration sur membranes possédant un seuil de coupure
5 compris entre 2.000 et 100.000 D, mais préférentiellement voisin de 5.000 à 20.000 D. Con-centration de la matière sèche jusqu'à une valeur comprise entre 2 et 70 % mais préférentiellement voisine de 20 %.

h) Séchage par tout type de procédé non dénaturant, comme l'atomisation à basse température ou la lyophilisation. Stérilisation par
10 oxyde d'éthylène ou par rayonnements bêta ou gamma.

EXEMPLE 6 :

De la même manière que dans l'Exemple 3, la composition
15 obtenue dans les Exemples 4 et 5 jusqu'à l'étape g) n'est pas séchée et est conservée sous forme liquide pour correspondre à une concentration en matière sèche comprise entre 2 et 70 % mais préférentiellement voisine de 20 %. Le produit est alors stabilisé par l'ajout d'auxiliaires de stabilisation, et de conservateurs.

20

EXEMPLE 7 : Cet exemple illustre la préparation de compositions selon l'invention à partir de lupin ou de féverole.

Le concentrât (50% de protéines) ou l'isolat protéique de lupin
25 ou de féverole sont dans ce cas utilisés comme matériaux de base pour l'extraction de l'albumine végétale.

Dans ces extraits protéiques de lupin ou de féverole, la fraction albumine représente environ 20 % des protéines totales.

Après avoir déterminé le pH optimal de travail, c'est-à-dire le
30 pH pour lequel, les quantités de protéines solubilisées sont maximales, l'albumine est extraite puis purifiée par un des protocoles opératoires décrit dans les exemples 1 ou 4 et leurs variantes. Ce pH n'est pas identique pour tout concentrât et tout isolat de lupin ou de féverole, et doit être adapté suivant les cas.

35 L'albumine ainsi extraite de lupin ou de féverole possède les mêmes caractéristiques générales que celles de l'albumine extraite de pois.

L'extrait sec lyophilisé est très hygroscopique, et possède une couleur caractéristique qui va d'une teinte beige pâle à une couleur jaune plus soutenue.

5 **EXEMPLE 8** : Cet exemple présente la dernière étape du procédé de l'invention pour obtenir des préparations cosmétiques ou pharmaceutiques.

10 Les fractions albumines extraites de graines de différentes espèces végétales, peuvent facilement être incorporées dans tous les types de formulations cosmétiques ou pharmaceutiques du type gel aqueux, émulsions Huile dans Eau (H/E) ou Eau dans Huile (E/H), pour obtenir des préparations selon l'invention. Dans tous les cas, l'albumine végétale est incorporée dans la phase aqueuse des émulsions où elle se
15 dissout très facilement.

 Si la forme sèche est utilisée, on préférera dissoudre préalablement l'albumine dans une faible quantité d'eau, puis l'ajouter à température modérée, préférentiellement en fin de formulation.

20 1) L'exemple de formulation suivant illustre une préparation cosmétique de l'invention qui formulée de manière appropriée, constitue une crème de soin.

	INGREDIENTS	NOM CTFA*	%	FOURNISSEUR
A/	Carbopol 940	Carbomer	0,50	Goodrich
	Propylene glycol	Propylene glycol	2,00	
	Glycerin	Glycerin	8,00	
	Distilled water	Water	58,10	
B/	Dragil (2/027011)	Glycol stearate	8,00	Dragoco
	Liquid Pcl (2/066210)	Cetearyl octanoate (and) Isopropyl myristate	3,00	Dragoco
	Solid Pcl (2/066220)	Stearyl heptanoate	2,00	Dragoco
	Dragosantol (2/012681)	Bisabolol	0,30	Dragoco
C/	Bactericid MB (2/012582)	Butylene glycol (and) Ethylparaben (and) Methylparaben (and) Propylparaben	0,50	Dragoco
	Dragocid forte (2/027045)	Ethoxydiglycol (and) Diisopropyl adipate (and) Methylparaben (and) Dehydroacetic acid (and) Sorbic acid	0,50	Dragoco
D/	Caustic soda (10%)	Caustic soda (10%)	1,80	
E/	Biobranil watersoluble (2/012600)	Water (and) Wheat bran lipids (and) Propylene glycol (and) Ethoxydiglycol (and) PEG-40 Castor oil (and) Tocopherol	2,00	Dragoco
	Aloe Vera gel (2/912800)	Aloe Vera gel	2,00	Dragoco
F/	Composition de l'invention (ETIVAL) obtenue selon l'Exemple 1 Water	Pea extract	0,50	Demanderesse
			10,00	
G/	Coviox T 50	Tocopherol	0,30	Henkel
H/	Perfume (NP 3164)		0,50	Dragoco

* selon la nomenclature de The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA).

2) L'exemple de formulation suivant illustre une préparation cosmétique de l'invention qui, formulée de manière appropriée, constitue une lotion démaquillante pour le visage.

	INGREDIENTS	NOM CTFA	%	FOURNISSEUR	
A/	Propylene glycol	Propylene glycol	2,00	Demanderesse	
	Glycerin	Glycerin	4,00		
	Composition de l'invention (ETIVAL) obtenue selon l'Exemple 1	Pea extract	0,50		
	Distilled water	Water	88,35		
	Tween 80	Polysorbate 80	2,00		I.C.I.
	Tego betain L7	Cocamidopropyl betaine	2,00		Goldschmidt
B/	Bactericid MB (2/012582)	Butylene glycol (and) Ethylparaben (and) Methylparaben (and) Propylparaben	1,00	Dragoco	
C/	Perfume		0,15		

3) Le dernier exemple de formulation illustre une préparation cosmétique de l'invention qui, formulée de manière appropriée, constitue une solution à effet tenseur cutané.

INGREDIENTS	NOM CTFA	%	FOURNISSEUR
A/ Jaguar C 162	Hydroxypropyl Guar hydroxypropyltri-amonium chloride	1,50	Rhône Poulenc Meyhall
Distilled water	water	39,30	
Composition de l'invention (ETIVAL) obtenue selon l'Exemple 1	Pea extract	0,50	Demanderesse
Glycerin	Glycerin	20,00	
B/ Dragosantol (2/012681)	Bisabolol	0,20	Dragoco
Perfume (0/214550)		0,40	Dragoco
Neo PCL watersoluble (2/966212)	Nonoxynol-12 (and) PEG-5 octanoate (and) water	6,00	Dragoco
Propylene glycol	Propylene glycol	15,00	
Ethyl diglycol	Ethyl diglycol	10,00	
C/ Caustic soda (10%)	Caustic soda (10%)	0,10	
D/ Ext. sp. almond (2/033130)	Propylene glycol (and) Almond extract	2,00	Dragoco
Ext. sp. avocado (2/0325599)	Water (and) Avocado extract	2,00	Dragoco
Ajidew N 50	Sodium PCA	3,00	Ajinomoto

EXEMPLE 9 : Evaluation de l'effet tenseur immédiat de la préparation obtenue ci-dessus, par mesure de l'élasticité *in vivo*.

5 Une des utilisations les plus importantes d'albumine bovine en cosmétologie consiste à l'incorporer à des concentrations voisines de 5-10 % (en poids sec), dans des ampoules de quelques millilitres, quelquefois appelées "ampoules coup d'éclat". L'utilisation d'un tel sérum permet en général d'obtenir pendant quelques heures, un effet tenseur très marqué sur les ridules du visage.

10 Afin de déterminer si de telles propriétés pouvaient être obtenues avec l'albumine végétale extraite selon l'exemple 1, on a réalisé un test *in vivo* sur dix volontaires, afin de mesurer l'élasticité de la peau après application d'une préparation cosmétique contenant 10 % en poids sec d'albumine végétale ou d'albumine bovine.

15

1 - PROTOCOLE

a - Principe

20 L'élasticité de l'épiderme humain est évaluée *in vivo* sur volontaires, par aspiration d'une zone infime à l'intérieur d'un capteur soumis à dépression.

Après une seule aspiration, les paramètres de la courbe de déformation suivants sont exploités: élasticité, plasticité, extensibilité, hystérèse, tonicité.

25 Après trois aspirations, les paramètres de la courbe de déformation suivants sont exploités: fatigue cutanée, souplesse, extensibilité, hystérèse, fermeté.

b - Conditions expérimentales

30 **Sujets** : 10 sujets âgés de 22 à 57 ans, à types de peau divers, capables de suivre les indications de traitement données.

Critères d'exclusion. Femmes enceintes, femmes allaitant, fumeurs, peaux couperosées, peaux présentant des dermites ou eczémas de contact.

35 Installation des sujets. Dans une pièce calme à température constante de 25° C, équipée de fauteuils de relaxation.

Application : Le produit, préparé selon l'Exemple 1, est appliqué une fois sur la face externe de l'avant bras sur des zones délimitées de 2 cm x 2 cm à raison de 3 mg/cm².

5 2 - MESURES

Les mesures sont effectuées avant l'application puis 30 minutes, 2 heures, 4 heures et 6 heures après l'application.

10 Le capteur maintenu parfaitement vertical par un guide est placé au contact de la peau et soumis à son propre poids.

Pour la face externe de l'avant bras la dépression exercée est fixée à 300 mbars pendant 2 secondes.

L'intervalle de repos entre deux aspirations est de 1 seconde.

Nombre de répétitions de l'aspiration : 3

15 Les courbes de déformation obtenues sont représentées sur la figure qui représente la déformation en mm en fonction du temps en seconde.

20 3 - PARAMETRES ETUDIES (cf. Fig)

OA correspond à la partie élastique et réversible de la déformation.

AB représente la déformation visco élastique de la peau. Cette déformation n'est pas totalement réversible.

25 OB correspond à l'extensibilité totale de la peau intégrant extensibilités élastique et visco élastique.

BC correspond aux forces de rappel de la peau et peut être traduite par le terme de "tonicité".

OB - BC représente l'hystérèse ou la déformation résiduelle.

30 O'D représente l'extensibilité après trois aspirations.

La valeur BD correspond à l'augmentation de l'extensibilité sous l'effet des aspirations successives et représente le phénomène de fatigue cutanée. Plus elle est importante plus la peau est relâchée.

O'D' représente la déformation résiduelle après trois tractions.

35 La souplesse est déterminée à partir de ces deux paramètres.

Le rapport BC/OA correspond à la fermeté. Il est généralement inférieur à 1.

4 - INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

5

Les comparaisons de moyennes obtenues sur un petit nombre de sujets peuvent ne pas être statistiquement significatives.

Il se dégage cependant certaines tendances qu'il est possible de définir en examinant le comportement de chaque sujet.

10

L'interprétation portera principalement sur trois paramètres: l'extensibilité totale et l'hystérèse déterminées après une aspiration, la souplesse déterminée après trois aspirations.

On dégagera ainsi quatre types de comportement:

15

Sujet de type A:

L'extensibilité totale augmente, l'hystérèse diminue. La peau est plus élastique et plus souple traduisant un effet positif du produit.

20

Mais si la souplesse diminue ou se trouve égale à zéro, le traitement n'a pas agi sur le phénomène de fatigue cutanée et son effet n'est positif que sur une déformation brutale et unique.

Sujet de type B

25

L'extensibilité totale augmente et l'hystérèse augmente après une aspiration. La peau est devenue plus extensible mais la déformation résiduelle est plus importante par suite de forces de rappel moindres ou par une diminution de la zone élastique.

Ceci traduit un relâchement plus ou moins important et correspond généralement à une augmentation du phénomène de fatigue cutanée.

30

C'est le comportement typique de peaux vieilles.

Il n'y a donc pas d'effet positif du traitement sauf s'il s'agit d'épidermes desséchés et raidis qui vont acquérir de ce fait une plus grande extensibilité, améliorant ainsi la sensation de confort.

Sujet de type C

L'extensibilité diminue et l'hystérèse diminue après une seule aspiration.

Ce comportement correspond à une "raideur", à une élasticité
5 et à une tonicité plus importantes.

Le phénomène de fatigue cutanée doit également diminuer.

Sujet de type D

L'extensibilité diminue et l'hystérèse augmente.

10 Dans ce cas, on observe une augmentation de la raideur qui n'est pas accompagnée d'une augmentation de la tonicité.

La déformation résiduelle est plus importante.

Donc il y a manque d'élasticité. L'effet du produit peut être
uniquement un effet tenseur.

15

5 - INTERPRÉTATION GLOBALE DES RÉSULTATS

Comme indiqué précédemment, les comparaisons de moyenne
obtenues sur un petit nombre de sujets pouvant ne pas être
20 statistiquement significatives, on expose les tendances observées en
faisant intervenir le nombre de sujets ayant réagi selon cette tendance (n).
On obtiendra une différence corrigée Δc :

$$\Delta c = (M_{21} - M_0) \times n$$

25

6 - RESULTATS

Echantillons : Les essais ont porté sur les produits suivants:

- Albumine bovine: Lyophilisât lot 203003 en solution à 10 %
dans l'eau distillée: solution transparente jaune pH : 6,90

30 - Albumine végétale Lyophilisât lot 160492 en solution à 10 %
dans l'eau distillée: solution opaque jaune-beige. Un dépôt crémeux se
forme rapidement. Cette solution sera agitée avant l'application afin de
l'homogénéiser. pH : 4,95.

35 0,15 % de parahydroxybenzoate de méthyle sodé est ajouté à
chaque solution; les valeurs de pH sont alors les suivantes: - Albumine
bovine : 7,6 - Albumine végétale : 5,15.

Application :

Chaque solution est appliquée une fois sur la face externe de l'avant bras des sujets.

5

Résultats :

Ils sont rassemblés dans les tableaux 2 et 3 suivants.

Le Tableau 2 présente les valeurs expérimentales de déformation exprimées en mm.

10 Le Tableau 3 présente les pourcentages de variation par rapport à l'état initial.

Dans les Tableaux 2 et 3, AB est l'albumine bovine, AV est l'albumine végétale.

TABLEAU 2

	ÉLASTICITÉ		PLASTICITÉ		EXTENSIBILITÉ		HYSTERESE		TONICITÉ	
	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV
T0	75,82	77,46	24,18	22,54	110,90	119,90	29,44	23,38	70,56	76,62
T30mn	73,47	69,85	26,53	30,15	94,50	93,80	23,96	17,22	76,04	82,78
T2h	76,07	75,34	23,93	24,66	106,90	99,30	27,58	22,78	72,42	77,22
T4h	76,95	76,17	23,05	23,83	104,60	106,90	24,64	21,54	75,36	78,46
T6h	78,78	77,83	21,22	22,17	108,20	109,30	20,50	22,40	79,50	77,60

	FATIGUE CUTANEE		SOUPLESE		EXTENSIBILITÉ III		HYSTERESE 3ème		FERMETE	
	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV
T0	8,40	8,90	77,44	78,35	119,30	128,80	33,21	27,35	0,93	0,99
T30mn	10,50	7,80	79,89	77,02	105,00	101,60	25,37	18,73	1,04	1,21
T2h	9,10	8,00	79,30	80,75	11,00	107,30	30,77	23,50	0,96	1,03
T4h	8,10	9,00	81,82	81,34	112,70	115,90	26,21	23,19	0,98	1,03
T6h	8,00	7,80	82,35	80,38	116,20	117,10	23,69	25,97	1,01	1,00

TABLEAU 3

% variation	ÉLASTICITÉ		PLASTICITÉ		EXTENSIBILITÉ		HYSTERESE		TONICITÉ	
	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV
T30mn	-3,00	-9,80	9,70	33,80	-14,80	-21,80	-18,60	-26,30	7,80	8,00
T2h	0,30	-2,70	-1,00	9,40	-3,60	-17,20	-6,30	-2,60	2,60	0,80
T4h	1,50	-1,70	-4,70	5,70	-5,70	-10,80	-16,30	-7,90	6,80	2,40
T6h	3,90	0,50	-12,20	-1,60	-2,40	-8,80	-30,40	-4,20	12,70	1,30

% variation	FATIGUE CUTANEE		SOUPLESE		EXTENSIBILITÉ III		HYSTERESE 3ème		FERMETE	
	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV	AB	AV
T30mn	25,00	-12,40	3,20	-1,70	-12,00	-21,10	-23,60	-31,50	11,90	22,00
T2h	8,30	-10,10	2,40	3,10	-2,80	-16,70	-7,30	-14,10	2,90	4,50
T4h	-3,60	1,10	5,65	3,80	-5,50	-10,00	-21,10	-15,20	5,40	4,60
T6h	-4,80	-12,30	6,30	2,60	-2,60	-9,10	-28,70	-5,00	8,60	0,81

Discussion :

Si l'on ne considère que les résultats significatifs obtenus pour chaque produit on constate que:

- 30 minutes après l'application, l'albumine végétale montre un effet tenseur complet :
- l'élasticité diminue,
- les extensibilités 1er et 3ème tirages diminuent,
- la fermeté augmente.

L'albumine végétale provoque de plus une diminution du fatigue cutanée par rapport à T₀, ce qui est positif car il n'y a pas de relâchement de la peau.

L'albumine bovine entraîne une diminution de l'extensibilité 1er tirage et de l'hystérèse 3ème tirage mais le fatigue cutanée augmente. Le produit est tenseur par effet immédiat mais la peau se relâche au cours des tractions successives.

2 heures après l'application, l'albumine bovine n'a d'activité significative sur aucun des paramètres de la courbe de déformation.

L'albumine végétale n'agit significativement que sur les extensibilités du 1er et du 3ème tirages. L'effet tenseur se maintient puisque la peau est moins extensible.

4 heures après l'application, l'albumine bovine n'agit que sur la souplesse en l'augmentant. Il n'y a plus d'effet tenseur depuis T₃₀ min.

L'albumine végétale, de même que 2 heures après l'application, n'agit que sur les extensibilités 1er et 3ème tirage. La peau est tendue mais le produit n'agit pas sur les autres paramètres.

6 heures après l'application, l'albumine végétale n'a plus d'action significative quel que soit le paramètre considéré.

7 - CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales décrites, les résultats obtenus permettent de classer les deux produits, de la façon suivante, pour leur effet tenseur :

- 1er : Albumine végétale
- 2ème : Albumine bovine

EXEMPLE 10 : Evaluation d'autres effets cosmétiques

L'évaluation de l'effet filmogène de l'albumine végétale a été réalisée en faisant sécher à l'air libre ou dans une étuve à 45°C, un fin film d'une solution d'albumine à 20% ; les résultats ont été comparés avec les films obtenus à partir d'autres protéines végétales (soja, blé..) ou animales (collagène, albumine bovine..). Les capacités filmogène de l'albumine végétale sont, exception faite du collagène, supérieures ou égales à toutes les autres protéines testées.

L'incorporation de très faibles quantités d'albumine végétale dans les préparations cosmétiques données dans l'exemple 7, permet d'obtenir un effet cosmétique très important, puisque encore détectable lorsqu'une concentration en albumine végétale de 0,1 % est utilisée.

Utilisée dans le sérum tenseur à 0,5 %, l'albumine végétale permet d'obtenir un effet tenseur net, et permet également d'obtenir un "effet miroir" qui peut être mis à profit dans les formulations de préparation de la peau aux différentes étapes du maquillage.

En conclusion, l'albumine végétale est un ingrédient polyvalent qui est très riche en différents acides aminés indispensables, et qui peut permettre d'apporter aux préparations cosmétiques qui le contiennent, des capacités émulsifiantes naturelles, un effet tenseur important, ainsi qu'une stabilité et une texture très intéressantes.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique et notamment dermatologique, ou cosmétique, comprenant de l'albumine à titre de principe actif seul ou en combinaison avec au moins un autre principe actif, caractérisée en ce
5 que l'albumine est d'origine végétale et se présente dans ladite composition sous la forme d'une fraction de protéines solubles, dans leur état natif, en phase aqueuse non saline, à pH compris entre 4 et 7, la teneur de ladite fraction en dites protéines solubles étant d'au moins 25 % en poids sec des protéines totales de ladite fraction.

10 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite albumine est obtenue à partir de graines choisies parmi les graines de légumineuses, les graines d'oléagineux et les graines de céréales.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite albumine est directement extraite de graines choisies parmi
15 les graines de légumineuses, les graines d'oléagineux et les graines de céréales.

4. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite albumine est séparée d'extraits protéiques concentrés, d'origine végétale, ayant une teneur en protéines au moins égale à 50%.

20 5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que la concentration de ladite albumine est extraite d'isolats protéiques végétaux ayant une teneur en protéines comprise entre 70 et 98 %.

6. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'une solution dont la teneur en albumine
25 est au moins égale à 2,5 % du poids sec.

7. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme solide ou matière sèche.

8. Préparation pharmaceutique et notamment dermatologique, ou cosmétique, destinée à une application topique, caractérisée en ce
30 qu'elle incorpore une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et un support pharmaceutiquement ou cosmétologiquement acceptable .

9. Préparation cosmétique selon la revendication 8, caractérisée en ce que, formulée avec un support cosmétologiquement acceptable, elle
35 constitue une crème de soin dont la teneur en albumine est comprise entre 0,05 % et 5 % en poids sec.

5 **10.** Préparation cosmétique selon la revendication 8, caractérisée en ce que, formulée avec un support cosmétologiquement acceptable, elle constitue une lotion ou un lait pour le visage et/ou le corps, dont la teneur en albumine est comprise entre 0,05 % et 5 % en poids sec.

11. Préparation cosmétique selon la revendication 8, caractérisée en ce que, formulée avec un support cosmétologiquement acceptable, elle constitue une solution à effet tenseur cutané immédiat dont la teneur en albumine est comprise entre 5 % et 30 % en poids sec.

10 **12.** Procédé pour préparer une préparation selon la revendication 8, caractérisé en ce que :

- par extraction en phase aqueuse à partir d'un extrait protéique concentré, puis centrifugation, on sépare une fraction albumine,
- on concentre l'albumine par ultrafiltration sur membrane,
- 15 jusqu'à une concentration comprise entre 2 et 70 % en poids sec,
- on incorpore l'albumine obtenue, en solution aqueuse, à un support pharmaceutiquement ou cosmétologiquement acceptable.

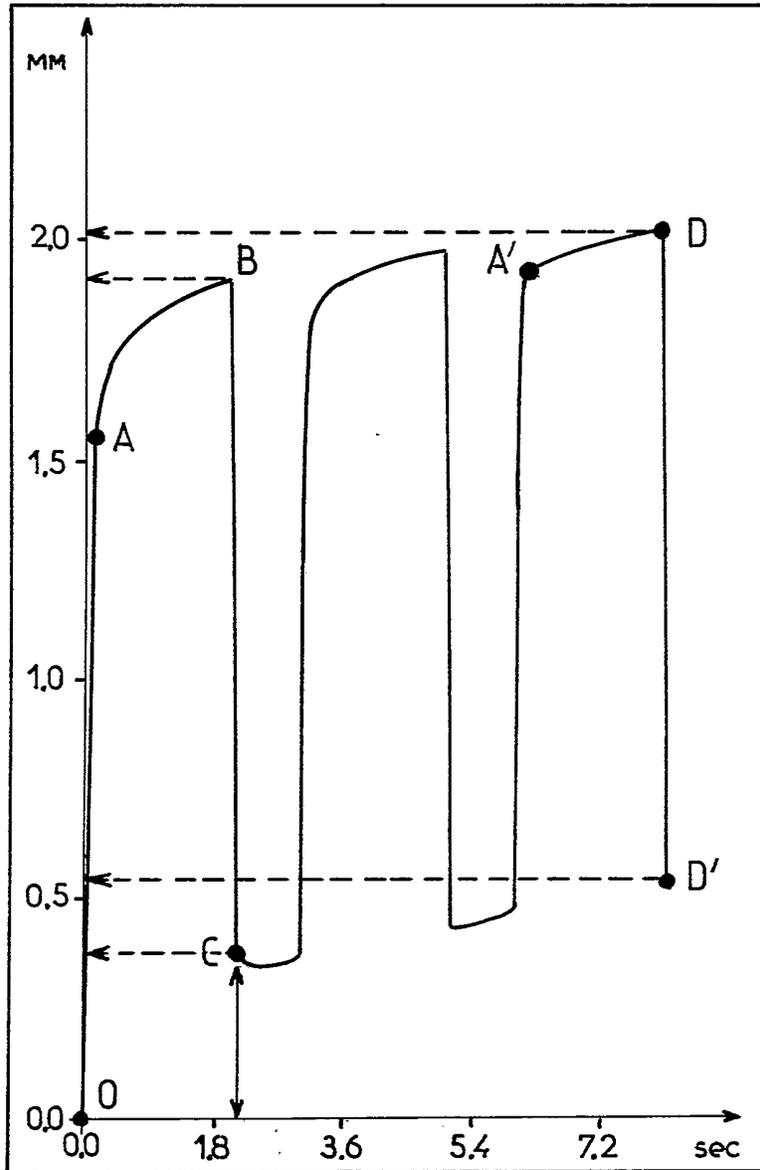
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que, après concentration de l'albumine par ultrafiltration, on prépare une
20 solution stable par ajout d'auxiliaires choisis parmi les alcools comme le méthanol et l'éthanol, des acides gras à chaînes courtes ou leurs sels comme le caprylate de sodium et l'acétyltryptophane de sodium, puis chauffage et filtration.

14. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que
25 l'albumine concentrée est séchée par lyophilisation ou atomisation à basse température.

15. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'albumine séchée est stérilisée par l'oxyde d'éthylène ou par des rayonnements β ou γ .

30 **16.** Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'avant l'incorporation dans la préparation, l'albumine séchée est dissoute dans un faible volume d'eau.

1/1



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national
FA 483366
FR 9302349

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP-A-0 459 566 (UNILEVER PLC.) * le document en entier * ----	1-3,6,8, 9
A	WO-A-91 12730 (ENERGENETICS INC.) * le document en entier * ----	1-3,6,8, 12
A	WO-A-90 05521 (DRAGOCO GERBERDING & CO GMBH) * le document en entier * ----	1-3,6,8, 12
A	WO-A-91 15117 (BASIC BIO SYSTEMS INC) * le document en entier * ----	1-3,6,8, 12
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11, no. 246 (C-439) & JP-A-62 053 909 (KUROODA JAPAN KK) 9 Mars 1987 * abrégé * ----	1-3,6,8, 9,12
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13, no. 491 (C-650) & JP-A-01 193 207 (NISSHIN OIL MILLS LTD) * abrégé * ----	1-3,6,8, 11,12,14
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13, no. 402 (C-633) & JP-A-01 146 811 (NISSHIN OIL MILLS LTD) * abrégé * -----	1-3,6,8, 12

DOMAINES TECHNIQUES
RECHERCHES (Int.Cl.5)

A61K

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

Date d'achèvement de la recherche

20 Octobre 1993

Examineur

COUCKUYT, P

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un
autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication
ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date
de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant