

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 719 846

② N° d'enregistrement national : **94 05901**

⑤ Int Cl⁶ : C 08 B 37/00, 37/12, C 07 H 11/00, A 61 K 7/40,
31/725, C 12 N 5/02

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 13.05.94.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 17.11.95 Bulletin 95/46.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *SIMER, Laboratoires Science et Mer
— FR.*

⑦② Inventeur(s) : *Bodeau-Bellion Christine et Fournier
Dominique.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : *Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.*

⑤④ Oligosaccharides de galactanes sulfates et composition cosmétique ou pharmaceutique à usage topique externe contenant lesdits oligosaccharides de galactanes sulfates.

⑤⑦ L'invention concerne des oligosaccharides de galactanes sulfatés caractérisés en ce qu'ils comportent de 2 à 20 unités saccharidiques et présentent un taux de sulfatation moyen d'au moins 0,5 sulfate par unité saccharidique.

Les oligosaccharides de galactanes sont choisis parmi les carraghénanes ou les agars et notamment le carraghénane-iota.

L'invention concerne également les compositions cosmétiques ou pharmaceutiques contenant lesdits oligosaccharides de galactanes sulfatés, à usage topique externe pour améliorer l'élasticité de la peau et favoriser le phénomène de cicatrisation des blessures.

FR 2 719 846 - A1



L'invention a pour objet des oligosaccharides de galactanes sulfatés à activité topique externe au niveau de la peau en tant que principe actif cosmétique et pharmaceutique.

5 Les galactanes sulfatés, dont font partie notamment les carraghénanes et les agars, sont bien connus pour leurs propriétés gélifiantes et/ou épaississantes.

La société déposante a mis en évidence que certains oligosaccharides de galactanes sulfatés permettaient d'activer la prolifération des kératinocytes et étaient aptes à stimuler le pouvoir
10 contractile des fibroblastes.

De ce fait, les oligosaccharides de galactanes sulfatés qui seront décrits ci-dessous, présentent un effet régénérant dermique et épidermique et permettent notamment d'améliorer l'élasticité de la peau et de favoriser le
phénomène de cicatrisation des blessures.

15 Les oligosaccharides de galactanes sulfatés trouvent donc une utilisation dans le domaine des applications médicales ainsi que cosmétiques en tant, notamment, que produit à usage topique externe.

D'autres applications en tant que médicament, peuvent également être envisagées, compte tenu des propriétés remarquables de ces fragments.

20 Les oligosaccharides de galactanes sulfatés trouvent également une application en tant qu'additifs pour culture cellulaire.

L'invention concerne en premier lieu les oligosaccharides de galactanes sulfatés comportant de 2 à 20 unités saccharidiques et présentant un taux de sulfatation moyen d'au moins 0,5 sulfate par unité saccharidique.

25 La famille des galactanes comprend notamment les agars et les carraghénanes.

Les carraghénanes sont des polysaccharides sulfatés extraits à partir des algues rouges, tels que ceux du type appartenant aux ordres des Gigartinales, Ahnfeltiales, et notamment les espèces *Eucheuma* sp., *Chondrus crispus* et *Gigartina* sp., *Hypnea* sp.
30

Bien qu'il existe différentes sortes de carraghénanes qui sont légèrement différentes les unes des autres, on y retrouve toujours un squelette commun qui est une chaîne de D-galactoses liés alternativement en α -(1 → 3) et β -(1 → 4). Les différences entre les carraghénanes sont dues à la
35 quantité et à la position des sulfates ainsi qu'à la présence ou non d'un pont 3,6 anhydro sur le galactose lié en 1 et 4.

On distingue principalement les carraghénanes suivants :

- 1/ **Kappa carraghénane** : formé par une succession de 1,3- β D galactopyranose 1,4 sulfate, conformation C1 "unité Kg4" et de 1,4- α D 3-6 anhydro galactopyranose, conformation 1C "unité Ka".
- 5 2/ **Lambda carraghénane** : Suite alternée de 1,3- β D galactopyranose 2 sulfate, conformation C1 "unité Lg2" et de 1,4- α D galactopyranose 2-6 disulfate conformation C1 "unité Lg 2,6".
- 3/ **Iota carraghénane** : Succession de β D galactopyranose 4 sulfate, conformation C1 "unité Ig4" et de 1,4- α D 3-6 anhydrogalactopyranose 2 sulfate conformation 1C "unité Ia2".

Il existe également deux précurseurs biologiques des carraghénanes sus-mentionnés :

- 4/ **Mu carraghénane** : Succession de 1,3- β D galactopyranose 4 sulfate, conformation C1 "unité Mg4" et de 1,4- α D galactopyranose 6 sulfate conformation C1 "unité Mg6".

Sous l'action d'une enzyme dans l'algue ou bien en milieu alcalin :

Mg6 \rightarrow Ka : le Mu carraghénane est le précurseur du Kappa carraghénane.

- 5/ **Nu carraghénane** : Succession de 1,3- β D galactopyranose 4 sulfate, conformation C1 "unité Ng4" et de 1,4- α D galactopyranose 2-6 sulfate conformation C1 "unité Ng2,6".

Sous l'action d'une enzyme présente dans l'algue ou bien en milieu alcalin :

Ng2,6 \rightarrow Ia2 : le Nu carraghénane est le précurseur du Iota carraghénane.

Les galactanes de type agar sont formés d'un groupe polymères dont le squelette de base est une chaîne 1,3- β D galactopyranose et 1,4- α L 3-6 anhydrogalactose. Ces unités se répétant régulièrement et alternativement. Les différences à l'intérieur de la famille des agars sont dues à la présence ou non de groupes sulfatés, méthylés ou carboxyéthylés. Ces structures hybrides sont en général présentes en pourcentage variables suivant les espèces d'algues, la saison de récolte. Les agars selon l'invention ont au moins 0,5 équivalent sulfate par mole de saccharide.

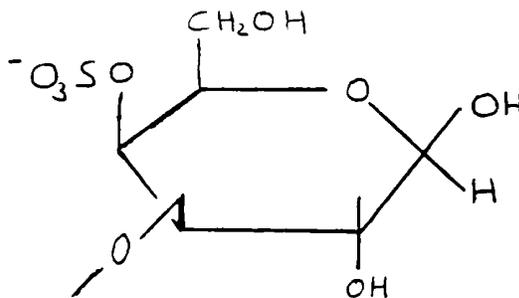
Dans le cas des carraghénanes de types Kappa, le taux de sulfatation est de 0,5 équivalent sulfate/mole de saccharide et dans le cas des carraghénanes Iota, le taux de sulfatation est de 1 équivalent sulfate/mole de saccharide.

Dans les cas des galactanes de type agar dont sont issus les oligosaccharides selon l'invention, le taux de sulfatation varie de 0,5 équivalent sulfate/mole de saccharide à 3 sulfate/mole.

Les terminaisons chimiques des oligosaccharides selon l'invention
5 sont différentes selon le procédé qui a permis de les obtenir par hydrolyse des polysaccharides correspondants.

On sait en effet qu'il existe deux types principaux de procédé de dépolymérisation des polysaccharides conduisant aux oligosaccharides selon l'invention :

10 Bellion et al., ont décrit la dépolymérisation enzymatique des carraghénanes issues de *Euchemma spinosum* et *Euchemma Cottonii* à l'aide de iota-carraghénases et kappa-carraghénases issues de bactéries marines (Can. J. Microbiol. 28(7), 874-80. Ces auteurs ont montré que l'hydrolyse enzymatique se passait au niveau de la liaison $\beta(1 \rightarrow 4)$ et les oligomères ont
15 donc la terminaison :



20
25

L'hydrolyse chimique a notamment été étudiée par Stortz et al., Carbohydr. Res., 166 (1987), 317-23, Stevenson et al., Carbohydr. Res. 210 (1991) 277-298 et USOV Hydrobiologia 260/261 (1993) 641-645. et il est probable que l'hydrolyse chimique agisse par la liaison $1 \rightarrow 3$.

30 Les études effectuées par la société déposante montrent que les oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention, qu'ils soient obtenus par dépolymérisation chimique ou enzymatique, présentent une activité remarquable, et en conséquence, l'invention n'est pas limitée à des oligosaccharides de galactanes sulfatés présentant une terminaison
35 particulière.

Les terminaisons peuvent être des anhydrogalactose-2-sulfate, et plus précisément anhydrogalactitol-2-sulfate (hydrolyse chimique) ou des galactose-4 sulfate (hydrolyse enzymatique).

5 Le poids d'une molécule de saccharide est d'environ 250, poids qui peut varier selon le degré de sulfatation du polysaccharide. Ainsi, dans le cas de oligosaccharides de galactanes sulfatés présentant 2 à 20 unités saccharidiques, le poids moyen d'une unité saccharidique étant d'environ 250, la masse molaire est comprise entre environ 500 et 5000.

10 On a trouvé qu'il était très avantageux, en raison de leurs propriétés biologiques remarquables vis-à-vis de la peau, de mettre en oeuvre des oligosaccharides de galactanes sulfatés présentant 2 à 10 unités saccharidiques.

15 De préférence, encore, les oligosaccharides de galactanes sulfatés présentent un taux de sulfatation moyen d'au moins 0,7 sulfate par unité saccharidique lorsqu'ils sont sous forme de mélange.

On donne ci-après une liste d'oligosaccharides selon la présente invention qui présente un intérêt remarquable dans le cadre de l'application par voie topique externe :

20 $(Ig4 - Ia2)_n$ $n = 1 \text{ à } 5$, de préférence ≥ 2
 $(Ig4 - Ia2)_2$
 $(Ig4 - Ia2)_3$
 $(Kg4 - Kg2)_n$ $n = 1 \text{ à } 5$, de préférence ≥ 2
 $(Kg4 - Ka2)_2$
 $(Kg4 - Ka2)_3$.

25 Selon un mode préféré de réalisation, les fragments de galactanes sulfatés selon l'invention proviennent de carraghénanes et de préférence encore de iota-carraghénane.

30 L'invention a encore pour objet selon une variante particulière prise ou non en combinaison avec une ou plusieurs des variantes mentionnées ci-dessus, des oligosaccharides de galactanes sulfatés tels qu'ils peuvent être obtenus par dépolymérisation chimique ou enzymatique de carraghénane ou d'agar, de préférence de carraghénane iota.

35 Comme cela a été mentionné ci-dessus, il existe deux procédés principaux pour hydrolyser les carraghénanes ou les agars, à savoir les procédés chimiques et les procédés enzymatiques.

De façon générale, le procédé enzymatique consiste à dépolymériser en présence d'une carraghénase ou d'une agarase appropriée comme décrit par exemple par Bellion et al. (1982). Dans le cas de la iota-carraghénase décrite par Bellion, l'enzyme ne supporte pas la lyophilisation ni la congélation (Greer et al., Can.J. Microbiol. 30 (12) 1500-6 (1984). On a par ailleurs déterminé sa masse molaire qui est de 57 000, son activité maximale est à pH 8 et à 40°C. Les produits majeurs de l'hydrolyse du iota-carraghénane sont constitués par les oligosaccharides de galactanes sulfatés présentant 4 à 6 unités saccharidiques. Ceci présente un avantage pour la dépolymérisation contrôlée de carraghénane dont un souci doit être d'éviter la formation d'oligosaccharides de très faible degré de polymérisation (1 à 2 unités saccharidiques).

On sait également purifier les kappa-carraghénases à partir d'un mélange de carraghénases extra-cellulaires produites par la bactérie *Cytophaga species*, Sarwar et al., Microbiol. Immunol., 31(9), 869-77 (1987) et Potin et al., Eur. J. Biochem., 201(1), 241-7 (1991). L'enzyme étudiée dans ce dernier cas est une kappa-carraghénase produite par une bactérie proche du genre *Cytophaga*, mais non identifiée jusqu'à présent. Cette enzyme n'est pas thermostable (dénaturation à 40°C). Sa masse molaire est de 40 000. Elle produit du kappa-néocarratétrase sulfate et du kappa-néocarrahexase sulfate contrairement à la kappa-carraghénase de *Pseudomonas carrageenovora* qui produit essentiellement du néocarrabiose sulfate.

Cette souche de *Cytophaga* a été isolée d'une algue en décomposition, sur un milieu solidifié avec du iota-carraghénane. Si la souche est cultivée en présence d'agar, une agarase est excrétée dans le milieu de fermentation.

La production d'oligosaccharides de carraghénane par voie enzymatique comprend de façon générale les étapes suivantes :

- Production de carraghénase par fermentation d'un microorganisme,
- Dépolymérisation du carraghénane par la carraghénase,
- Extraction et purification des oligosaccharides obtenus.

A titre d'exemple, les hydrolyses décrites par Potin et al.,(1991) ont été effectuées en présence de 0,2 U de carraghénase par mg de polysaccharide pendant 6 h. Dans ces conditions, il faut environ 200 000 U de carraghénase pour hydrolyser 1 kg de carraghénane.

L'extraction et la purification des oligosaccharides de galactanes sulfatés obtenus s'effectuent de manière connue par extraction hydroalcoolique ou par chromatographie.

5 Dans le cas des oligosaccharides de galactanes sulfatés obtenus à partir d'agars, on met en contact selon la procédure indiquée ci-dessus une agarase appropriée à dépolymériser le polysaccharide, comme ceci est décrit par Bhattacharjee et al. Marine Algae in Pharmaceutical Sciences ed. by Hoppe, Levring, Tanaka, Walter de Gruyter - Berlin et New York p. 645-655 (1979).

10 Selon une autre variante de l'invention, les fragments de galactanes sulfatés sont tels qu'ils stimulent in vitro la contraction des dermes équivalents, provoquée par les fibroblastes, aux doses appropriées lorsqu'ils sont utilisés dans le test suivant :

15 Les fibroblastes répartis uniformément dans une matrice à trois dimensions de collagène contractent le réseau matriciel. Une réduction progressive du diamètre des dermes artificiels est observée. Le pouvoir contractile des fibroblastes est évalué par la mesure quotidienne de la surface occupée par les dermes à l'aide d'un analyseur d'image.

20 Selon l'invention, les oligosaccharides de galactanes sulfatés sont tels qu'ils provoquent une augmentation du pouvoir contractile des fibroblastes d'au moins 10 %, de préférence au moins 20 % pour une quantité appropriée, notamment de 100 µg/ml par rapport au témoin qui ne contient pas d'oligosaccharide.

25 En outre, selon une variante particulièrement préférée de l'invention, les oligosaccharides sulfatés lèvent partiellement l'inhibition de la contraction des fibroblastes engendrée par la présence d'hydrocortisone, composé bien connu pour ralentir in vivo la cicatrisation des tissus. La levée d'inhibition est améliorée d'au moins 10 % après deux jours aux doses appropriées, de préférence au moins 20 %, par rapport au témoin traité à
30 l'hydrocortisone.

Les oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention sont également remarquables en ce qu'ils activent la prolifération in vitro des kératinocytes.

35 L'invention concerne également des mélanges d'oligosaccharides de galactanes sulfatés contenant au moins 30 % en poids, de préférence au moins 50 % en poids, des oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention.

Avantageusement, ces mélanges contiennent 60 % en poids des oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention.

L'invention a également pour objet des oligosaccharides de galactanes sulfatés ou mélanges d'oligosaccharides de galactanes sulfatés tels qu'ils ont été décrits précédemment en tant que principe actif pour leur application comme régénérant dermique et épidermique et comme agent cicatrisant.

Ces oligosaccharides de galactanes sulfatés sont appliqués sous la forme d'une composition à usage topique externe contenant ledit principe actif et un support approprié.

L'invention concerne en particulier l'application pharmaceutique des oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention et plus particulièrement une composition pharmaceutique à usage topique externe, notamment pour régénérer le derme et l'épiderme, contenant un oligosaccharide de galactane sulfaté selon l'invention et un support inerte.

L'invention concerne également l'application cosmétique des oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention et plus particulièrement une composition cosmétique à usage topique externe, notamment pour régénérer le derme et l'épiderme contenant un oligosaccharide de galactane selon l'invention et un support inerte.

Les oligosaccharides de galactanes sulfatés seront dans les compositions pharmaceutiques ou cosmétiques en quantité suffisante de façon à ce que les compositions appliquées sur la peau procurent un effet positif sur le derme et l'épiderme, en ce qui concerne la cicatrisation, l'élasticité, et en général la régénération de la peau.

Ces compositions sont par exemple des solutions de type lotion, des émulsions de consistance liquide ou semi-liquide de type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse ou inversement ou de suspension ou émulsion de consistance molle du type crème ou gel. Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

Parmi les véhicules utilisés de façon usuelle dans les formulations pour la peau mentionnées ci-dessus, on peut citer les tensio-actifs, les colorants, les parfums, les agents conservateurs, les émulsionnants, les véhicules liquides tels que l'eau, des corps gras tels que les huiles naturelles ou synthétiques destinées à constituer la phase grasse des laits ou des crèmes,

des résines du type carboxylvinyle ou anhydride maléique neutralisées par des formules tertiaires et notamment par des aminoalcools tels que l'acryéthanolamine.

L'invention concerne également l'utilisation des oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention ou un mélange d'oligosaccharides de galactanes à titre de principe actif pour la préparation de compositions destinées à favoriser la régénération du derme.

Cette utilisation concerne notamment la préparation de compositions destinées à accélérer le processus de cicatrisation.

Les utilisations des oligosaccharides de galactanes selon l'invention sont sous la forme de compositions notamment cosmétiques ou pharmaceutiques pour usage topique externe.

L'invention concerne enfin un additif pour culture cellulaire constitué d'oligosaccharides de galactanes sulfatés selon l'invention.

L'invention est maintenant illustrée par les exemples suivants donnés à titre indicatif, sans qu'ils limitent de quelque manière la portée de l'invention.

Exemple 1 - Préparation des oligosaccharides

1. Production de carraghénase

La bactérie marine ATCC 43554 a été cultivée en fermenteur de 15 litres dans le milieu salin ATCC n° 1576 contenant 25 g/l de chlorure de sodium, 2,5 g/l de peptone de caséine et 2,5 g/l de iota-carraghénane. Le milieu a été inoculé avec 0,3 l d'une culture effectuée en erlenmeyer (proportion d'innoculum : 2 %). La turbidité du milieu augmente au cours de la fermentation de 0,0 à 0,4 (absorbance à 600 nm du milieu dilué au 1/10). La température est maintenue à 22°C, le pH reste compris entre 7,2 et 6,8 pendant la fermentation, qui dure 8 heures.

Après la fermentation, le milieu a été centrifugé (7500 t/min, 20 min), puis concentré par ultrafiltration (seuil de coupure : 10 000) et diafiltré à l'aide de tampon phosphate de sodium pH 8, 25 mM contenant NaCl 0,1 M. Le volume final de la préparation de carraghénase était de 1 litre.

Cette préparation contient 15 000 U de iota carraghénase et 300 mg de protéines (activité déterminée par dosage des sucres réducteurs à l'aide de ferricyanure et mesure d'absorbance à 267 nm).

2. Hydrolyse de iota-carraghénase

La réaction d'hydrolyse de iota-carraghénase a été effectuée à pH 8, 40°C dans le milieu suivant :

| | | |
|---|----------------------------------|--------|
| | - Volume | 1,2 l |
| 5 | - Iota-carraghénase | 10 g |
| | - Solution de carraghénase | 0,6 l |
| | - NaCl | 0,1 M |
| | - Tampon phosphate de sodium pH8 | 50 mM. |

La réaction a été poursuivie pendant 100 heures. Le pouvoir réducteur (dosage DNS) varie de 0,1 à 0,4 g/l (équivalent glucose). Les polysaccharides ont alors été précipités à l'aide d'éthanol 66 % (v/v). Le précipité a été redissout dans l'eau et soumis à nouveau à l'hydrolyse (volume : 0,8 l) à l'aide de 0,3 l de solution de carraghénase.

Ensuite, cette solution a également été traitée par précipitation à l'éthanol. Les surnageants de centrifugation ont alors été concentrés sous pression réduite, ce qui a permis d'obtenir les oligosaccharides en solution aqueuse (volume 200 ml).

3. Purification des oligocarraghénanes

La solution a été diluée (1/2), puis acidifiée à pH 2,5 et mise au contact de charbon actif (2,5 g/l), puis filtrée sur papier et membrane de porosité 0,2 µm. Elle a été appliquée à une colonne de Sephadex G 10 (volume 1 l) par fractions de 100 ml. L'éluant est de l'acide chlorhydrique (pH 2,5). L'élution dure 4 heures. Les oligosaccharides sont élués avant les sels.

Les fractions contenant les oligosaccharides ont été mélangées et le pH a été ajusté à 6 avec de la soude. La solution ainsi obtenue a été ultrafiltrée sur une membrane de seuil de coupure de 10 000, puis concentrée sous pression réduite, filtrée sur membrane de porosité 0,2 µm et enfin lyophilisée.

4. Caractérisation de la préparation d'oligocarraghénanes

Le lyophilisat obtenu a une masse de 6,1 g et se présente sous la forme d'une poudre beige. La poudre a été caractérisée par HPLC, par des dosages colorimétriques, et par des mesures physicochimiques, dont les résultats sont indiqués ci-dessous :

| | | |
|---|--|-----------|
| | • Teneur en eau (Karl Fischer) | 10 % |
| | • Propriétés d'une solution aqueuse : | |
| | pH (50 g/l) | 5,7 |
| 5 | conductivité (5 g/l) | 2,3 mS/cm |
| | • solubilité dans l'eau (solution opalescente) | ≥ 10 g/l |
| | • Teneur en chlorures (dosage colorimétrique Sigma) | 3 % |

10

Composition chimique :

| | | |
|----|-------------------------------------|------|
| | - Oligocarraghénanes totaux : | 55 % |
| | dont : | |
| | - oligocarraghénane tetrasaccharide | 36 % |
| | - oligocarraghénane hexasaccharide | 18 % |
| 15 | - oligocarraghénane octasaccharide | 1 % |
| | - Chlorure de sodium : | 35 % |
| | - Eau : | 10 % |

Analyse microbiologique (germes totaux) : ≤ 200/g

20

Exemple 2 : Activité biologique sur kératinocyte

Cette étude a été effectuée avec des concentrations d'oligosaccharides obtenus selon l'exemple 1 de 10, 25 et 50 µg/ml.

La profifération cellulaire est appréciée par le nombre de cellules vivantes présentes en fin d'essai, évalué par un test colorimétrique au MTT (test de viabilité cellulaire basé sur l'activité de la succinyldeshydrogénase mitochondriale).

25

Protocole expérimental

Des kératinocytes humains, issus de peau de prépuce de nouveau-nés, sont cultivés dans du milieu de culture sans sérum (KGM + 0,4 % BPE, Clonetics) en atmosphère humide air - CO₂ (95 % - 5 %) à 37°C dans des flacons de 75 cm² (NUNC).

30

Avant d'atteindre la confluence, les cellules sont détachées de leur support par trypsinisation et mises en suspension dans du milieu KGM (Keratinocyte Growth Medium) supplémenté en BP (Bovine Pituitary Extract).

35

Après numération à la cellule de Malassez, la suspension cellulaire est diluée de manière àensemencer environ 10 000 cellules par puits dans chaque puits d'une microplaque (J-1).

24 heures après l'ensemencement, le milieu de culture est éliminé et remplacé soit par du milieu neuf (lot témoin) soit par du milieu contenant le produit à l'étude (lots traités). 4 concentrations ont été étudiées : 10, 25, 50 et 100 µg/ml.

Parallèlement au traitement des microplaques, la révélation d'une plaque ensemencée avec la même suspension cellulaire à J-1 est effectuée à l'aide d'un test au MTT afin de déterminer la concentration cellulaire à J0 (début des traitements), compte tenu de la relation linéaire qui existe entre la densité optique mesurée et le nombre de cellules ensemencées.

Les microplaques, une fois traitées, sont replacées à l'étuve à 37°C en présence de 5 % de CO₂.

La densité cellulaire est évaluée par un test au MTT à J1, J3 et J6.

Résultats

Détermination de la courbe D.O. = f (N)

Afin de vérifier la relation linéaire entre la densité optique (D.O.) obtenue par le test au MTT et le nombre de cellules, une microplaque à 96 puits a été ensemencée avec différentes densités cellulaires (1 colonne de 8 puits par densité cellulaire). La densité optique augmente proportionnellement au nombre de cellules ensemencées. Un test au MTT a été effectué 24 heures après l'ensemencement.

Il existe une relation linéaire entre la densité optique et le nombre de cellules par puits.

$$\text{Inv log D.O.} = 0,0766 (N/10^3) + 0,546$$

$$r = 0,988 \quad \text{ddl} = 3$$

Activité prolifératrice

A J1, les densités cellulaires au niveau des lots traités sont sensiblement identiques à celle du lot témoin.

A J3, un très léger effet stimulant est observé au niveau des lots traités avec 25 µg/ml.

A J6, les densités cellulaires au niveau des lots traités sont supérieures à celle du lot témoin. L'effet "stimulant" se manifeste essentiellement au niveau du lot traité avec 25 µg/ml : + 20 % d'augmentation.

Exemple 3 : Activité biologique "Régénérant dermique" sur cultures de fibroblastes

La culture des fibroblastes dans un réseau tridimensionnel de collagène permet d'étudier l'action d'un agent pharmacologique dans un environnement physiologique reproduisant in vitro les interactions cellules-matrices existant in vivo. Au sein de la matrice de collagène, les fibroblastes retrouvent une différenciation proche de celle qu'ils avaient in vivo.

Le derme équivalent est un modèle important pour la biologie de la peau et particulièrement pour la pharmacologie de la cicatrisation car c'est un tissu qui se réorganise progressivement dans lequel les fibroblastes mûrissent.

On compare les propriétés dynamiques des fibroblastes cultivés dans un derme équivalent (lattis de collagène) en absence et en présence de différentes concentrations de l'oligosaccharide de l'exemple 1.

Concrètement, l'appréciation du comportement des fibroblastes vis-à-vis de la matrice de collagène par évaluation de leur pouvoir contractile est effectuée selon le test suivant :

La souche de fibroblastes est issue d'explants de prépuces obtenus au cours d'interventions chirurgicales chez des jeunes enfants. Ils sont cultivés selon les techniques de routine en usage dans le laboratoire en milieu minimal essentiel d'Eagle (MEM) supplémenté en sérum de veau foetal (SVF à 10 % v/v).

Pour ensemer les lattis, des fibroblastes de derme humain cultivés en monocouche sont détachés des parois des flacons de culture (NUNC) par trypsinisation et centrifugés. Les cellules sont mises en suspension dans du milieu de culture, de façon à ensemer les lattis contenus dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre, avec environ 200 000 cellules.

Après numération à la cellule de Malassez, la suspension cellulaire est ajoutée dans des proportions définies à un mélange de milieu de culture et de collagène de type I, extrait à l'acide acétique à partir de tendons de queues de rat.

Le mélange est ensuite coulé dans les boîtes de Pétri à froid.

Les oligosaccharides de l'exemple 1 sont introduits à différentes concentrations non cytotoxiques dans le mélange de milieu de culture et de collagène.

Les dermes équivalents ainsi reconstitués (3 lattis par lot) sont placés à 37°C. Les fibroblastes qui sont répartis uniformément dans cette matrice à trois dimensions s'attachent sur le réseau de collagène polymérisé et le contractent. Une réduction progressive du diamètre des dermes artificiels est observée. Le pouvoir contractile des fibroblastes est évalué par la mesure quotidienne de la surface occupée par les dermes à l'aide d'un analyseur d'image (MICROM).

Les résultats indiqués dans le tableau ci-dessous résultent de la moyenne des résultats de trois lattis, pour une durée allant de 1 à 4 jours (J1 à J4).

Deux concentrations de produits ont été testés. Un essai témoin sans ajout d'oligosaccharide est présenté à titre de comparaison :

| | Témoin | Oligosaccharide 100 µg/ml | Oligosaccharide 50 µg/ml |
|----|--------|------------------------------|-----------------------------|
| J1 | 83 % | 66 % | 80 % |
| J2 | 65 % | 45 % | 48 % |
| J3 | 54 % | 37 % | 48 % |
| J4 | 42 % | 27 % | 33 % |

L'addition d'oligosaccharides de carraghénanes selon l'exemple 1 provoque une stimulation du pouvoir contractile des fibroblastes.

Exemple 4 : Activité biologique "Régénérant dermique" sur cultures de fibroblastes dont le pouvoir contractile est inhibé par l'hydrocortisone

Les oligosaccharides sont introduits dans une culture de fibroblastes contenant une quantité suffisante d'hydrocortisone.

Comme pour l'exemple précédent, les résultats sont indiqués sous la forme d'un tableau pour deux concentrations et pour une durée variant de J1 à J4.

| | Témoin | Témoin traité avec l'hydrocortisone | Oligosaccharide à 200 µg/ml | Oligosaccharide à 100 µg/ml | |
|---|--------|---|--------------------------------|--------------------------------|------|
| 5 | | | | | |
| | J1 | 68 % | 70 % | 57 % | 62 % |
| | J2 | 51 % | 68 % | 50 % | 56 % |
| | J3 | 37 % | 58 % | 45 % | 47 % |
| | J4 | 32 % | 62 % | 47 % | 50 % |

10 L'hydrocortisone ralentit nettement la contraction des dermes équivalents entre J0 et J4. L'addition des différentes concentrations du produit permet de lever l'inhibition de la contraction des lattis engendrés par l'hydrocortisone.

REVENDEICATIONS

- 1) Oligosaccharide de galactane sulfaté, caractérisé en ce qu'il comporte de 2 à 20 unités saccharidiques et présente un taux de sulfatation moyen d'au moins 0,5 sulfate par unité saccharidique.
- 5 2) Oligosaccharide de galactane sulfaté selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient de 2 à 10 unités saccharidiques.
- 3) Oligosaccharide de galactane sulfaté selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le taux de sulfatation moyen est d'au moins 0,7 sulfate par unité saccharidique.
- 10 4) Oligosaccharide de galactane sulfaté selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il peut être obtenu par dépolymérisation de carraghénane ou d'agar.
- 5) Oligosaccharide de galactane sulfaté selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il peut être obtenu par dépolymérisation de carraghénane iota.
- 15 6) Oligosaccharide de galactane sulfaté selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est tel qu'il provoque une augmentation du pouvoir contractile des fibroblastes d'au moins 10 %, de préférence d'au moins 20 % par rapport au témoin qui ne contient pas d'oligosaccharide.
- 20 7) Oligosaccharide de galactane sulfaté selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est tel qu'il lève partiellement l'inhibition de la contraction des fibroblastes engendrée par la présence d'hydrocortisone d'au moins 10 %, de préférence 20 % par rapport au témoin traité à l'hydrocortisone.
- 25 8) Mélange d'oligosaccharides de galactane sulfaté, caractérisé en ce qu'il comporte au moins 50 % en poids d'oligosaccharide de galactane sulfaté selon l'une des revendications 1 à 7.
- 9) Mélange d'oligosaccharides de galactane sulfaté selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte au moins 60 % en poids d'oligosaccharide de galactane sulfaté selon l'une des revendications 1 à 7.
- 30 10) Composition destinée à l'application topique externe, caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif un oligosaccharide de galactane ou mélange d'oligosaccharides de galactane selon l'une des revendications 1 à 9 et un support approprié.
- 35

11) Composition cosmétique pour application topique externe, caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif un oligosaccharide de galactane ou mélange d'oligosaccharide de galactane selon l'une des revendications 1 à 9 et un support approprié.

5 12) Composition pharmaceutique pour application topique externe selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif un oligosaccharide de galactane ou mélange d'oligosaccharide de galactane selon l'une des revendications 1 à 7 et un support approprié.

10 13) Utilisation des oligosaccharides de galactane ou mélange de d'oligosaccharides de galactane selon l'une des revendications 1 à 9 à titre de principe actif pour la préparation de compositions destinées à favoriser la régénération du derme.

14) Utilisation selon la revendication 13 pour la préparation de compositions destinées à accélérer le processus de cicatrisation.

15 15) Utilisation selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce que les compositions sont des compositions pour usage topique externe.

16) Additif pour culture cellulaire constitué d'oligosaccharides de galactane sulfaté selon l'une des revendications 1 à 9.

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|---|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | WO-A-84 04039 (FMC CORPORATION) * page 5, ligne 22 - ligne 27 * * page 9, ligne 3 - ligne 22 * * page 10, ligne 22 - ligne 30 * * page 15; revendications * --- | 1-15 |
| X | US-A-4 748 032 (KONO ET AL.) * colonne 2, ligne 5 - colonne 3, ligne 29 * | 1-5,8,9 |
| A | GB-A-840 623 (EVANS MEDICAL LIMITED) * revendications * --- | 1-5,8,9, 12 |
| A | US-A-3 378 541 (J. A. COLQUHOUN ET AL.) * colonne 1, ligne 10 - ligne 17; revendications * --- | 1-5,8,9, 12 |
| A | SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, vol.II, 1978, USA pages 779 - 784 E.T. GALLAGHER ET AL. 'Effects of carrageenan on chick embryo fibroblasts in vitro-a preliminary study' * abrégé * --- | 1,16 |
| A | MARINE ALGAE IN PHARMACEUTICAL SCIENCE, vol.2, 1982, DE pages 51 - 64 E. TVETER-GALLAGHER ET AL. 'Effects of various types of carrageenans on human fibroblasts in vitro' ----- | 1,16 |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur |
| 6 Janvier 1995 | | Mazet, J-F |
| <p style="text-align: center;">CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>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</p> <p style="text-align: right;">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</p> | | |

1
EPO FORM 1500 01.82 (P04C13)

DOMAINES TECHNIQUES
RECHERCHES 6)

C08B
A61K