

(19)



LE GOUVERNEMENT
DU GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
Ministère de l'Économie

(11)

N° de publication :

LU505892

<https://patent.public.lu/fo-eregister/view/>

(12)

BREVET D'INVENTION**B1**

(21)

N° de dépôt: LU505892

(51)

Int. Cl.:

A61K 31/195, A61K 31/196, A61K 31/726, A61P 17/02,
A61K 31/197, A61P 19/02, A61P 19/04, A61P 37/06

(22)

Date de dépôt: 21/12/2023

(30)

Priorité:

(73)

Titulaire(s):

LUMATRIX – 2449 Luxembourg (Luxembourg)

(43)

Date de mise à disposition du public: 24/06/2025

(72)

Inventeur(s):

BUZON Martine – France

(47)

Date de délivrance: 24/06/2025

(74)

Mandataire(s):

IPSILON BENELUX SA – L-2146 Luxembourg
(Luxembourg)

(DX)

Date d'expiration: 21/12/2043

(85)

Date d'entrée en phase nationale:

(86)

N° de dépôt de la demande internationale:

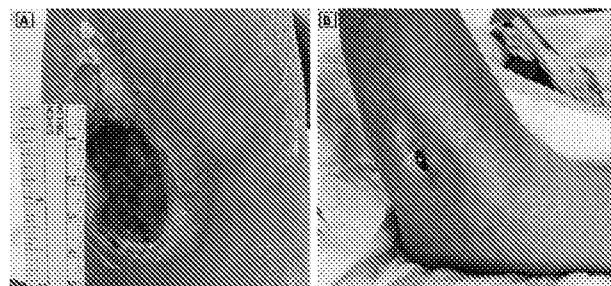
(54)

Formule pharmaceutique de cicatrisation et de régénération de la peau et son utilisation.

(57)

La présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant de l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels dont le poids moléculaire est supérieur à 2MDa ; et au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain sélectionnés dans le groupe consistant en la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, la thréonine et l'histidine, ainsi que ses utilisations pour améliorer la cicatrisation d'une plaie, hydrater un tissu sain et/ou une plaie, pour améliorer la viabilité cellulaire, pour améliorer la régénération cartilagineuse et/ ou articulaire ou encore pour améliorer la greffe et/ou transplantation d'un tissu ou d'une cellule.

{Fig. 8}



DESCRIPTION

LU505892

TITRE DE L'INVENTION :Formule pharmaceutique de cicatrisation et de régénération de la peau et son utilisation

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne le domaine médical humain et/ou vétérinaire, en particulier une formule pharmaceutique pour administration topique, transdermique, sous-cutané et/ou intralésionnelle et la mise en œuvre de la formule de pharmaceutique dans le traitement de plaies et/ou pour améliorer la cicatrisation de plaies et/ou pour la régénération cartilagineuse articulaire et/ou pour hydratation cutanée et des muqueuses et/ou dans l'amélioration de la viabilité cellulaire.

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEUR

Les plaies de tous types restent l'un des problèmes médicaux les plus importants, les plus coûteux et les plus courants à ce jour et dans le Monde. Une plaie est définie comme une rupture dans la fonction protectrice de la peau et une perte de la continuité de l'épithélium, avec ou sans perte des tissus sous-jacents (*i.e.*, muscle, os, nerfs). On parle donc de plaie dès que la peau est blessée ou endommagée, et ce qu'il y ait ou non une atteinte des tissus plus profonds. Cette atteinte cutanée peut avoir différentes origines, par exemple, accidentelle/traumatique, infectieuse, consécutive à un processus pathologique, notamment inflammatoire, volontaire dans le cadre d'une intervention chirurgicale.

Les plaies sont généralement catégorisées en fonction de leur durée de cicatrisation. On distingue ainsi deux grandes catégories de plaies :

- la plaie aiguë qui est une plaie d'apparition soudaine guérissant dans un laps de temps considéré comme normal, soit moins de 4 semaines, en suivant le processus habituel de cicatrisation. Cette catégorie de plaie regroupe notamment les plaies traumatiques (écorchures, abrasions, lacerations, morsures, plaies avec pénétration, ...), les brûlures de tous degrés et les plaies chirurgicales, y compris les greffes ; et
- la plaie chronique qui est une plaie dont le délai de cicatrisation est allongé malgré une prise en charge et un traitement appropriés. Certaines plaies pour lesquelles une cicatrisation n'est pas attendue sous un délai de 4 à 6 semaines d'évolution sont automatiquement considérées comme chroniques. Cette catégorie de plaie regroupe notamment les escarres, les plaies du pied diabétique, les ulcères de jambes ou encore les moignons d'amputation, etc..

Dans des circonstances standard, le processus de cicatrisation d'une plaie se décompose en 4 LU505892 étapes/phases, à savoir :

- Phase 1 : phase inflammatoire (ou détersivo-inflammatoire) : une étape de vasodilatation avec saignement est suivie d'une constriction des extrémités vasculaires sectionnées, avec coagulation et production d'un exsudat riche en cellules (granulocytes, macrophages, monocytes) qui vont éliminer (phase de détersion), par voie lymphatique et/ou par formation de pus, les bactéries, les tissus morts et les microparticules étrangères. A ce stade la plaie comporte tous les signes caractéristiques de l'inflammation : rougeur, tuméfaction, chaleur, douleur. La dilatation des capillaires sanguins est responsable de la rougeur et de la chaleur. L'augmentation de la perméabilité de ces capillaires favorise l'exsudation plasmatique, qui est responsable de la tuméfaction et de la chaleur, alors que la douleur est due à la pression sur les terminaisons nerveuses sensibles. Cette phase réactive dure généralement entre 3 et 6 jours.

- Phase 2 : phase de granulation ou proliférative : cette phase correspond à la prolifération des fibroblastes, à l'angiogenèse et à la synthèse de la matrice extracellulaire. Immédiatement après la phase inflammatoire, un tissu de granulation avec néoformation de capillaires (néovascularisation ou angiogenèse), qui vont apporter in situ l'oxygène, les nutriments et les cellules nécessaires à la réparation tissulaire, commence à s'organiser au sein d'un réseau de collagène et d'élastine (produit par les fibroblastes). Les macrophages à ce stade jouent encore un rôle essentiel en fabricant des facteurs de croissance ou des cytokines capables de promouvoir la prolifération fibroblastique et de la synthèse collagénique. A ce stade, la cicatrice est une fibrose jeune contenant de nombreux fibroblastes et une trame fibrillaire lâche en périphérie de la perte de substance. Le bourgeon charnu est composé de fibroblastes, d'un infiltrat inflammatoire (monocytes, lymphocytes, polynucléaires), de fibrine en surface et de néo-vaisseaux dans une trame fibrillaire œdémateuse. La contraction de la plaie pour en rapprocher les berges est étroitement liée à la formation du tissu de granulation et à la transformation de certains fibroblastes en myofibroblastes capables de se contracter et de transmettre leur activité contractile au tissu environnant par interaction entre les protéines du cytosquelette et de la matrice extracellulaire. Cette phase, très active dès le 7ème jour, peut durer jusqu'à 3 semaines.

- Phase 3 : phase d'épithélialisation : après la réparation tissulaire, la plaie se rétracte et se recouvre progressivement d'un nouvel épithélium, c'est le processus d'épithélialisation. Les cellules épidermiques capables de se diviser (*i.e.*, les kératinocytes) se multiplient et commencent à recouvrir le tissu de granulation en partant des berges de la plaie. Afin de pouvoir proprement migrer, ces kératinocytes ont besoin d'un tissu de granulation sain, humide et à

niveau. A la suite de la formation de cette première couche cellulaire, l'épithélium est épaissi LU505892 par division cellulaire et devient bientôt plus résistant. La plaie est fermée. Cette étape dure 1 à 3 semaine.

- Phase 4 : phase de remodelage ou de maturation : cette phase commence dès les premiers jours dans le cas d'une plaie suturée, mais peut aussi durer des mois dans le cas de plaies étendues et largement ouvertes. Elle est caractérisée par un remodelage du tissu conjonctif et la formation d'une cicatrice. Le tissu de granulation disparaît pour faire place à un tissu conjonctif fibreux. Les fibres de collagènes épaississent ce qui augmente la résistance aux forces de traction. Le nombre de capillaires diminue ainsi que le flux sanguin. L'eau et les vaisseaux excédentaires disparaissent alors, et la cicatrice se raffermie. Les cicatrices sont néanmoins, dans tous les cas, moins résistantes et moins élastiques que la peau normale, en partie à cause d'un certain déficit en élastine. Cette phase peut durer de plusieurs mois à 2 ans.

L'échelle colorielle visuelle internationale de la plaie décrit les différentes phases de cicatrisation de la plaie (voir le tableau 1 ci-dessous) et permet d'utiliser un langage commun.

[Table 1]

Noir	Tissu nécrotique : plaie recouverte d'une plaque noirâtre, sèche ou humide
Jaune	Tissu fibrineux : plaie recouverte de tissu jaunâtre ou blanchâtre, plus ou moins adhérent
Rouge	Tissu de granulation : plaie rouge, vascularisée, avec des îlots de bourgeonnements
Rose	Tissu d'épithélialisation : plaie recouverte d'un épithélium fin. Elle est rose, nacrée ou brillante
Vert	Plaie infectée

Au niveau cellulaire et moléculaire, les kératinocytes et les fibroblastes ont la propriété de produire et sécréter différents partenaires qui participent au processus de cicatrisation d'une plaie tels que le perlécan, la laminine ou encore du collagène (collagènes I et VII). Le perlécan agit sur la prolifération et la différenciation cellulaires des kératinocytes, il est nécessaire à la formation de l'épiderme et participe à la présentation des facteurs de croissance à leurs récepteurs. La littérature enseigne que l'administration de perlécan exogène restaure la formation de l'épiderme (Int J Cosmet Sci. 2020 Dec ; 42(6) : 529-535). La laminine joue un rôle principal dans les tissus normaux qui est celui du maintien de la cohésion épithélio-mésenchymateuse dans les tissus exposés à des forces extérieures telle que la peau.

Il apparait donc que la laminine et le perlécan sont des marqueurs d'intérêt qui permettent d'assurer un suivi, voire une optimisation, de l'adhésion dermo-épidermique pendant le processus de cicatrisation. LU505892

En parallèle, il est connu que les fonctions primaires de l'épiderme comprennent la rétention d'eau, l'homéostasie thermique et du pH, et la protection contre l'entrée de micro-organismes pathogènes ou de substances toxiques dans l'organisme. La formation d'une barrière épidermique appropriée repose sur la différenciation progressive des kératinocytes, depuis les cellules en prolifération de la couche basale jusqu'à la couche cornée ou stratum corneum, *i.e.*, différenciation terminale. Les propriétés physiques du stratum corneum sont attribuées à la formation d'une structure spécialisée, l'enveloppe cellulaire (EC) qui est très résistante aux produits chimiques forts tels que les détergents ou ceux ayant une forte alcalinité. Le processus de renforcement de l'EC incorpore notamment la loricrine, la filaggrine ou encore les filaments intermédiaires de kératine.

Il apparait donc que la loricrine est un marqueur d'intérêt qui permet d'assurer un suivi de la différenciation terminale des kératinocytes et, in fine, du renforcement de l'épiderme.

En outre, la bêta-défensine (ou β -défensine) est une molécule naturelle qui agit comme un stimulateur physiologique de l'activité antibactérienne cutanée (J Immunol August 1, 2008, 181 (3) 2103-2110). Cette molécule est donc un bon marqueur du suivi de l'évolution d'une plaie vers la cicatrisation ou, à l'inverse, vers une chronicité de la plaie.

Il s'avère qu'une plaie initialement classée comme plaie aiguë peut évoluer en une plaie chronique si sa prise en charge n'est pas adaptée ou si une complication pathologique inattendue intervient au cours du processus de cicatrisation. Toute plaie initialement aiguë n'étant pas cicatrisée dans un délai de 4 semaines devra de ce fait être considérée comme une plaie chronique. Les plaies chroniques restent dans un état inflammatoire pendant une période plus longue ce qui est à l'origine d'un profil de traitement différent de celui des plaies aiguës standards.

Aujourd'hui, les plaies chroniques sont un problème majeur de santé publique. Leur incidence ne cesse d'augmenter, notamment en raison d'une population vieillissante et d'une augmentation de la survenue de maladies sous-jacentes comme le diabète.

En outre, les plaies chroniques peuvent ne jamais guérir ou leur guérison peut prendre des années. Ces plaies entraînent une douleur et un stress importants chez les patients, tant sur le

plan physique qu'émotionnel. Par conséquent, un traitement approprié est extrêmement important. LU505892

Des solutions sont proposées par l'art antérieur pour améliorer le processus de cicatrisation, notamment des plaies chroniques via l'utilisation de pansements dont la microarchitecture et la composition sont adaptés et/ou améliorés pour assurer une meilleure cicatrisation de la plaie à traiter.

Alternativement, l'art antérieur propose des compositions pharmaceutiques cicatrisantes ou pour favoriser la régénération des cellules de la peau tel qu'un hydrogel biosimilaire à base d'acide hyaluronique réticulé avec de la L-lysine, décrit par le document EP 3 666 278 ; une composition comprenant le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF recombinant génétiquement modifié et de la dexaméthasone comme agent anti-inflammatoire, décrit par le document EP 0 575 484 ou encore une composition comprenant le facteur de croissance transformant β ou TGF- β , tel que décrit par le document US 5 981 606. Toutefois, ces produits pharmaceutiques correspondent à des facteurs de croissance, des cytokines ou chimiokines ou de l'acide hyaluronique, connus pour leurs effets indésirables, notamment en raison du fait qu'ils ne sont pas spécifiques d'un type cellulaire.

Concernant particulièrement la mise en œuvre de facteurs de croissance, leur interaction avec la membrane cellulaire est à l'origine d'une réponse hypertrophique (augmentation de la taille des cellules) et d'une réponse hyperplasique (augmentation de la population cellulaire), c'est-à-dire d'une prolifération clonale des cellules. Les facteurs de croissance cellulaire conventionnels utilisés sont d'origine animale, cellulaire et/ou végétale, c'est-à-dire obtenus à partir d'une matière première biologique. A titre d'exemple, des facteurs largement utilisés sont la toxine du choléra, le sérum de veau fœtal (SVF), tout extrait de glande pituitaire de bœuf ou encore les complexes ou fractions indéfinis du lait ou du soja. Cependant, l'utilisation de ces facteurs de croissance cellulaire de formulation variable, indéfinie et d'origine animale ou végétale est de plus en plus décriée, notamment en raison du manque de traçabilité de ces composants, de la variabilité de leur qualité, d'un risque de contamination et du manque de reproductibilité des effets observés. De plus, la présence d'allergènes ne peut pas être vérifiée puisque les formulations de ces facteurs de croissance sont indéterminées. Il existe donc un risque d'allergies développées en réponse à leur utilisation.

Dans le domaine de la cosmétique, de nombreuses compositions ont été développées pour lutter contre le vieillissement cutané, de même que pour favoriser la régénération des cellules de la

peau, en particulier chez les personnes âgées. Ces différentes applications sont en général regroupées sous l'indication «anti-âge». Dans ces produits « anti-âge », des ingrédients actifs sont intégrés pour stimuler directement ou indirectement la croissance des fibroblastes et/ou kératinocytes, renforcer la jonction dermo-épidermique, ou encore favoriser la production de collagène et d'élastine. A titre d'exemple, les rétinoïdes sont décrits pour leur capacité à stimuler la croissance des fibroblastes. Cependant, leur utilisation n'est pas recommandée en cosmétique en raison de leur action phototoxique et potentiellement mutagène (« Photomutagenicity of retinyl palmitate by ultraviolet A irradiation in mouse lymphoma cells » Nan Mei et al. Toxicological sciences 88(1), 142-149 (2005)).

Les traitements actuellement utilisés ne sont pas dépourvus d'effets secondaires délétères et ne permettent pas d'atteindre des résultats thérapeutiques efficaces, de réduire l'incidence des plaies chroniques ou encore de soulager efficacement et durablement les douleurs, l'inconfort voire les désagréments esthétiques liés aux plaies aiguës ou chroniques dont souffrent les patients. En outre et à la connaissance de la Demanderesse, aucun traitement ne permet de traiter indifféremment une plaie aiguë et une plaie chronique.

Il ressort de ce qui précède qu'il subsiste un besoin de fournir une composition apte à faciliter et/ou améliorer et/ou accélérer spécifiquement le mécanisme de cicatrisation/guérison des plaies aiguës et chroniques, et ce, de manière sûre, efficace et durable (*i.e.*, à court, moyen et long terme), tout en garantissant une composition entièrement tracée et traçable.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Après de nombreuses recherches, il est du mérite de la Demanderesse d'avoir identifié, de manière inattendue et surprenante, une composition comprenant une association de composés (ou principes actifs) sûrs, traçables, adaptés à l'utilisation humaine, notamment une utilisation thérapeutique, et qui agissent, notamment selon une synergie, pour répondre aux besoins précités.

Ainsi, un premier objet de la présente invention concerne une composition, avantageusement pharmaceutique, comprenant, en tant que principes actifs :

- de l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels dont le poids moléculaire est supérieur, avantageusement strictement supérieur, à 2MDa (pour mégadalton) ; et
- au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain « sélectionné dans le groupe consistant en la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, la thréonine et l'histidine.

Selon un mode de réalisation particulier, lesdits au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain compris dans la composition selon l'invention sont la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane et la thréonine. LU505892

La présente invention offre divers avantages, notamment :

- (i) elle permet l'utilisation simple et intégrable en routine par un médecin/personnel médical d'une formule efficace dont les composés agissent en synergie, pour améliorer la cicatrisation d'une plaie, notamment d'une plaie aigue ou chronique ;
- (ii) elle est dépourvue d'effets secondaires délétères ;
- (iii) la formule de l'invention est entièrement chimiquement identifiable et dosable ; et
- (iv) la formule de l'invention et ses éventuels produits de dégradation sont non toxiques, non mutagènes, non cancérigènes et non allergènes ; et
- (v) prête à l'emploi, notamment sans étape de mélange extemporané ou autre à accomplir au préalable.

Dans le cadre de l'invention, les articles « un » et « une » sont utilisés pour se référer à une ou à plusieurs (par exemple à au moins une) unités de l'objet grammatical de l'article. A titre d'exemple, « un élément » désigne au moins un élément, c'est-à-dire un élément ou plus.

Dans le cadre de l'invention, les termes « environ » et « approximativement » s'utilisent de manière interchangeable et en référence à une valeur mesurable telle qu'une quantité, une durée, et autres valeurs analogues. Ces termes doivent être compris comme englobant des incertitudes de mesure de $\pm 20\%$ ou de $\pm 10\%$, préférentiellement de $\pm 5\%$, encore plus préférentiellement de $\pm 1\%$, et de manière particulièrement préférée de $\pm 0,1\%$ de la valeur spécifiée.

Dans le cadre de l'invention, les différentes caractéristiques de l'invention peuvent être présentées sous forme d'intervalle de valeurs. Il doit être compris que la description de valeurs sous forme d'intervalle a uniquement pour finalité de rendre la lecture plus simple et ne doit pas être interprétée comme une limitation rigide de la portée de l'invention. En conséquence, la description d'un intervalle de valeurs devrait être considérée comme divulguant spécifiquement tous les intervalles intermédiaires possibles ainsi que chacune des valeurs au sein de cet intervalle. Par exemple, la description d'un intervalle allant de 1 à 6 devrait être considérée comme décrivant spécifiquement chacun des intervalles qu'il comprend, tels que les intervalles allant de 1 à 3, de 1 à 4, de 1 à 5, de 2 à 4, de 2 à 6, de 3 à 6, etc., ainsi que chacune des valeurs dans cet intervalle, par exemple, 1 ; 2 ; 2,7 ; 3 ; 4 ; 5 ; 5,3 et 6. Cette définition vaut indépendamment de la portée de l'intervalle.

Dans le cadre de l'invention, les termes « formule », « composition » et « formulation » LU505892 s'utilisent de manière interchangeable.

Dans le cadre de l'invention, par l'expression « acide aminé essentiel pour l'humain », on désigne un acide aminé (*i.e.*, un acide organique, dont la molécule porte aussi une fonction amine) indispensable pour l'Homme qui ne peut être synthétisé par l'organisme et doit donc être apporté par l'alimentation. Les acides aminés essentiels pour l'humain sont le tryptophane, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine et l'isoleucine, auxquels il faut ajouter pour l'enfant l'arginine et l'histidine.

Dans le cadre de l'invention, les expressions « composé actif », « ingrédient actif » et « principe actif » s'utilisent de manière interchangeable et désignent une substance ou un composé qui possède des propriétés thérapeutiques qui sous-tendent un effet physiologique. Le composé actif, ingrédient actif ou principe actif est à différencier du au moins un excipient, préférentiellement présent dans la composition selon l'invention.

Dans le cadre de l'invention, par le terme « excipient » on désigne une substance ou un composé qui ne possède aucune propriété thérapeutique. L'excipient garantit notamment la création de texture, parfum et/ou couleur particulières pour une formulation thérapeutique, mais aussi sa conservation, stabilité au stockage, sécurité et durée de vie, en conformité avec la réglementation. L'excipient est à différencier du au moins un composé actif, de l'ingrédient actif ou du principe actif présent dans la composition selon l'invention.

Dans le cadre de l'invention, par l'expression « support pharmaceutiquement acceptable », on désigne un matériau, une composition ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable, tel qu'une charge liquide ou solide, un diluant, un excipient, un solvant ou un matériau d'encapsulation, impliqué dans le transport ou le transport des agents en question à partir d'un organe, ou partie du corps, à un autre organe ou partie du corps. Chaque véhicule doit être « acceptable » dans le sens d'être compatible avec les autres ingrédients actifs et/ou excipients de la composition, par exemple le véhicule ne diminue pas l'impact de l'agent sur le traitement. En d'autres termes, un support selon l'invention est pharmaceutiquement inerte.

Dans le cadre de l'invention, les expressions « plaie », « excoriation » et « lésion » s'utilisent de manière interchangeable et désignent un traumatisme dit ouvert, c'est-à-dire une rupture de la barrière cutanée, par opposition à un traumatisme dit fermé et sans plaie, c'est-à-dire une contusion. En particulier, une plaie est une lésion de la peau représentée par une rupture de la continuité des tissus et une effraction de la barrière cutanée nécessitant un processus dynamique

complexe pour être réparée ou cicatrisée. Elle peut être superficielle, n'intéressant que l'épiderme (érosion), une partie du derme ou être profonde avec exposition du tissu sous-cutané. Son évolution dépend de son étendue et de sa profondeur mais également de facteurs locaux ou généraux qui peuvent freiner ou empêcher sa guérison. LU505892

Dans le cadre de l'invention, par l'expression « plaie aiguë », on désigne une blessure d'apparition soudaine et de courte durée. Elle guérit dans le laps de temps prévisible, attendu et en respectant le processus de cicatrisation normal. Pour les plaies aiguës, le processus physiologique de cicatrisation dure entre 2 et 4 semaines. Des plaies aiguës peuvent toucher n'importe quelle partie du corps. Il peut s'agir d'égratignures superficielles (ou plaie épithéliales) ou de plaies profondes endommageant les vaisseaux sanguins, les nerfs et/ou les muscles (plaies vasculaires, nerveuses et/ou musculaires). A titre d'exemple, il peut s'agir d'une plaie chirurgicale, i.e., une incision réalisée volontairement par un professionnel des soins de santé ; d'une plaie traumatique, i.e., une blessure soudaine et imprévue telle qu'une abrasion ou une morsure ; ou une brûlure, i.e., un type de blessure infligée à la peau ou à d'autres tissus et causée par la chaleur, le froid, l'électricité, des substances chimiques, des rayonnements ou encore des frottements. Une plaie aiguë est à distinguer d'une plaie chronique.

Dans le cadre de l'invention, par l'expression « plaie chronique », on désigne une plaie qui ne guérit pas en respectant l'ordre des étapes du processus de cicatrisation et/ou dans un laps de temps supérieur au laps de temps prévisible comme la plupart des autres plaies dites plaies aiguës. Il arrive que l'une ou l'autre phase du processus de cicatrisation bloque. Par exemple, l'étape inflammatoire dure souvent trop longtemps. Pour les plaies chroniques, le processus physiologique de cicatrisation dure depuis plus de 4 à 6 semaines. A titre d'exemple, on peut citer les ulcères veineux et artériels, les ulcères diabétiques ou encore les escarres. Une plaie chronique est à distinguer d'une plaie aiguë. Toute plaie initialement aiguë n'étant pas cicatrisée dans un délai de 4 semaines devra de ce fait être considérée comme une plaie chronique.

Dans le cadre de l'invention, les expressions « améliorer la cicatrisation », « augmenter la cicatrisation », « favoriser la cicatrisation », « encourager la cicatrisation », « promouvoir la cicatrisation » et « faciliter la cicatrisation » s'utilisent de manière interchangeable et désignent le mécanisme par lequel les phases de la cicatrisation sont plus efficaces (i.e., meilleure survie cellulaire, augmentation de la fréquence et/ou de la quantité du clonage cellulaire...) et/ou se succèdent plus rapidement que le laps de temps prévisible.

Dans le cadre de l'invention, les expressions « améliorer la viabilité de cellules », « augmenter la viabilité de cellules », « favoriser la viabilité de cellules », « encourager la viabilité de cellules », « promouvoir la viabilité de cellules » et « faciliter la viabilité de cellules » s'utilisent de manière interchangeable et désignent une augmentation de l'adhésion et/ou de la prolifération et/ou de l'activité métabolique cellulaire et/ou de l'intégrité de la membrane cellulaire par rapport à une valeur de référence mesurée avec les mêmes appareils/tests de mesure (*ie.g.*, test au MTT ; sel de tétrazolium) et avant application sur les cellules de la composition candidate/à tester. LU505892

Dans le cadre de l'invention, par l'expression « adhésion cellulaire », on désigne l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre pour faire adhérer les cellules entre elles ou avec le milieu qui les entoure. L'adhésion cellulaire est indispensable à la formation, au maintien et au fonctionnement des tissus.

Dans le cadre de l'invention, par l'expression « prolifération cellulaire », on désigne le fait que les cellules se multiplient rapidement et en abondance. Elle est mesurée comme la valeur quantifiée de la population de cellules filles. Ce mécanisme est à dissocier de la croissance cellulaire qui est l'augmentation du nombre et de la taille des cellules individuelles. Elle est utilisée à la fois dans le contexte du développement cellulaire (*i.e.*, prolifération avec cycle cellulaire) et de la division cellulaire (*i.e.*, reproduction).

Dans le cadre de l'invention, par l'expression « activité métabolique cellulaire », on désigne la somme du catabolisme, ou activité de dégradation, et de l'anabolisme, ou activité de synthèse. Le catabolisme dégrade des molécules complexes en molécules de base, soit pour produire de l'énergie soit pour produire des molécules directement utilisables par les voies de l'anabolisme. L'anabolisme concerne toutes les synthèses.

Dans le cadre de la présente invention, tous les modes de réalisation décrits ci-avant et ci-après peuvent être combinés.

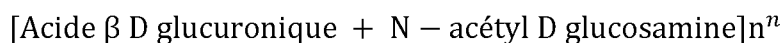
Selon un mode de réalisation particulier, les principes actifs compris dans la formule selon l'invention consistent en :

- de l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels dont le poids moléculaire est supérieur à 2MDa ;
- et
- au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain sélectionnés dans le groupe consistant en la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, la thréonine et l'histidine.

Selon un mode de réalisation particulier, la formule selon l'invention consiste en :

- de l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels dont le poids moléculaire est supérieur à 2MDa ;
- et
- au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain sélectionnés dans le groupe consistant en la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, la thréonine et l'histidine, avantageusement la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane et la thréonine.

L'acide hyaluronique est un polysaccharides, en particulier une glucosaminoglycane (GAG), dont la chaîne est constituée d'un polymère de disaccharides, liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées β -1,4 et β -1,3, représenté par la formule :



L'acide hyaluronique ou l'un de ses sels selon l'invention présente un poids moléculaire supérieur à 2MDa, avantageusement strictement supérieur à 2 Mda et/ou inférieur à 3 MDa, de préférence compris entre 2 MDa et 3 MDa.

Selon un mode de réalisation particulier, l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels se présente sous une forme non réticulée ou réticulée, avantageusement non réticulée.

Selon un mode de réalisation particulier, l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels se présente sous une forme non hydrolysée.

Selon l'invention, l'acide hyaluronique est issu de la biotechnologie, notamment par fermentation bactérienne. En d'autres termes, il s'agit d'un produit d'origine non animale.

Le sel d'acide hyaluronique selon l'invention est pharmaceutiquement acceptable et est sélectionné dans le groupe constitué du hyaluronate de sodium, hyaluronate de potassium et leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels compris dans la composition selon l'invention est le hyaluronate de sodium.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition de l'invention comprend lesdits au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain sélectionnés dans le groupe consistant en la L-lysine, la L-valine, la L-isoleucine, la L-leucine, la L-méthionine, la L-phénylalanine, le L-tryptophane, la L-thréonine et la L-histidine.

Selon un mode de réalisation avantageux, la composition de l'invention comprend lesdits 8 LU505892 acides aminés essentiels pour l'humain sélectionnés dans le groupe consistant en la L-lysine, la L-valine, la L-isoleucine, la L-leucine, la L-méthionine, la L-phénylalanine, le L-tryptophane et la L-thréonine.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition de l'invention comprend en outre un ou plusieurs composés d'ajustement du pH et/ou composés tampon pharmaceutiquement acceptables, comprenant des acides tels que les acides acétique, borique, citrique, lactique, phosphorique et chlorhydrique ; des bases telles que l'hydroxyde de sodium, le phosphate de sodium, le borate de sodium, le citrate de sodium, l'acétate de sodium et le lactate de sodium ; et des tampons tels que le citrate/dextrose, le bicarbonate de sodium et le chlorure d'ammonium. De tels acides, bases et tampons peuvent être inclus en une quantité requise pour maintenir le pH de la composition dans une plage pharmaceutiquement acceptable. Un ou plusieurs sels pharmaceutiquement acceptables peuvent être inclus dans la composition en quantité suffisante pour amener l'osmolalité de la composition dans une plage pharmaceutiquement acceptable. De tels sels comprennent ceux contenant des cations sodium, potassium ou ammonium et des anions chlorure, citrate, ascorbate, borate, phosphate, bicarbonate, sulfate, thiosulfate ou bisulfite.

En particulier, la composition selon l'invention comprend en outre au moins un composé (à effet tampon pH), avantageusement tous les composés, choisi parmi l'hydrogénophosphate de sodium, le dihydrogénophosphate de potassium, le chlorure de sodium et l'eau, avantageusement de l'eau pour préparations injectables (ou ppi).

Selon un mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention consiste en :

- du hyaluronate de sodium ;
- les acides aminés essentiels suivants : la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane et la thréonine ;
- du Na_2HPO_4 ;
- du KH_2PO_4 ;
- du NaCl ; et
- de l'eau ppi.

Avantageusement,

- l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels, avantageusement le hyaluronate de sodium, représente entre 6 g/L et 8 g/L ;

- la lysine représente entre 33 mg/L et 39 mg/L ;
- la valine représente entre 21 mg/L et 25 mg/L ;
- l'isoleucine représente entre 5,7 mg/L et 6,6 mg/L ;
- la leucine représente entre 24,3 mg/L et 28,3 mg/L ;
- la méthionine représente entre 6,8 mg/L et 8,2 mg/L ;
- la phénylalanine représente entre 15 mg/L et 18 mg/L ;
- le tryptophane représente entre 4,6 mg/L et 5,6 mg/L ;
- la thréonine représente entre 21,1 mg/L et 25,2 mg/L ;
- le Na_2HPO_4 représente entre 1,35 g/L et 1,45 g/L ;
- le KH_2PO_4 représente entre 0,65 g/L et 0,75 g/L ;
- le NaCl représente entre 4,5 g/L et 5,5 g/L ; et
- l'eau ppi représente une quantité suffisante pour 1L.

Selon un mode préféré de réalisation, le pH de la composition est compris entre 5,0 et 8,0, avantageusement entre 5,5 et 7,9, de préférence entre 7,4 et 7,5, par exemple à une valeur de 7,45 et/ou l'osmolarité est comprise entre 280 et 360 mOsmole, avantageusement entre 300 et 350 mOsmole.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est stérile/rendue stérile.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est sous une forme galénique adaptée pour un usage topique et/ou par injection, en particulier pharmaceutique, acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau, les muqueuses, les vaisseaux sanguins, la cornée et/ou les muscles du corps humain.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est sous une forme galénique adaptée pour une administration topique cutanée ou cornéenne.

Selon un autre mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est sous une forme galénique adaptée pour une injection intradermique, intra-articulaire, intra-cartilagineuse, sous-cutanée, intralésionnelle, intraveineuse, intramusculaire et/ou sous-cutanée, avantageusement pour une injection intradermique, de préférence pour injection intradermique dans les tissus sains situés en périphérie d'une plaie et/ou les tissus lésés (*i.e.*, plaie) et/ou une injection intra-articulaire et/ou une injection intra-cartilagineuse.

Selon un autre mode de réalisation spécifique, l'injection intradermique de la composition de LU505892 l'invention s'effectue dans la plaie et/ou dans le tissu sain à proximité de la plaie, c'est-à-dire dans le tissu sain à distance de 0,1 cm à 5 cm du bord de la plaie, avantageusement de 0,1 à 4 cm, de 0,1 à 3 cm, de 0,1 à 2 cm, de 0,1 à 1 cm, voire même de 0,1 à 0,5 cm.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est sous une forme galénique adaptée pour une utilisation au contact de cellules et/ou de tissus *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*, notamment en culture ou en suspension, dans une méthode d'amélioration de la viabilité de cellules et/ou de greffe et/ou transplantation.

Ainsi, la composition selon l'invention se présente sous la forme d'une crème, d'une lotion, d'un sérum, d'un lait, d'une pommade, d'un gel, d'une mousse, d'un spray/composition pulvérisable, d'un collyre, d'un pansement imbibé ou encore d'une solution aqueuse, hydroalcoolique, organique ou huileuse, voire d'une suspension ou d'une dispersion dans des solvants ou des corps gras.

De préférence, la composition pharmaceutique selon l'invention contient un véhicule/support, considéré comme un excipient au sens de l'invention, qui est pharmaceutiquement acceptable pour une formulation adaptée à l'usage selon l'invention, en particulier une formulation susceptible d'être injectée.

Il peut s'agir notamment de solutions isotoniques, stériles, salines (phosphate monosodique ou disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc. ou mélanges de tels sels), ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui lors de leur addition, en fonction du cas, d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de compositions injectables.

Les doses utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, ou encore de la durée de traitement souhaitée et de la surface à traiter.

Par exemple, il est connu de l'art antérieur de commencer le traitement avec des doses de la composition à des niveaux inférieurs à ceux requis pour obtenir l'effet thérapeutique souhaité et d'augmenter progressivement la dose jusqu'à ce que l'effet souhaité soit obtenu.

La posologie quotidienne de la formulation selon l'invention, en particulier d'une formulation adaptée pour une utilisation topique, est de 0,1 à 1 mL/cm², avantageusement de 0,1 à 0,5

mL/cm². En particulier, ladite application topique correspond à au moins une application par jour, par exemple 2 applications par jour, voire 3 ou 4 applications par jour. LU505892

La posologie hebdomadaire de la formulation selon l'invention, en particulier d'une formulation adaptée pour une utilisation par injection, notamment par injection voie intradermique, dépend de la surface à traiter. Ainsi,

- pour 1 cm² : 0,25mL à 1mL ;
- pour 2 cm² : 0,4mL à 1,6mL ;
- pour 4 cm² : 0,65mL à 2,6mL ;

avantageusement, les injections sont réalisées tous les cm ou 0,5cm une fois par semaine.

La posologie, avantageusement quotidienne, de la formulation selon l'invention, en particulier d'une formulation adaptée pour une utilisation cartilagineuse et/ou articulaire, en particulier pour une utilisation par injection intra-articulaire, est de 0,1 à 5 mL/articulation, avantageusement de 0,5 à 5 mL/cm², de préférence de 1 à 5 mL/cm².

La posologie de la formulation selon l'invention, en particulier d'une formulation adaptée pour une utilisation pour améliorer la greffe et/ou transplantation d'un tissu, en particulier pour dans un mélange avec le tissu adipeux pour la greffe tissulaire, est de 1% à 50% du volume de graisse qui sera greffé, avantageusement de 5% à 40%, de préférence de 10% à 30%.

Quel que soit le mode d'administration, en cas de lésion cancéreuse l'administration est formellement contre-indiquée. En cas de suspicion de lésion cancéreuse, il conviendra de faire pratiquer une biopsie et d'en obtenir le résultat avant d'administrer la formulation selon l'invention.

Selon un mode de réalisation, la composition mise en œuvre dans le cadre de l'invention est destinée à un usage humain et/ou vétérinaire.

Selon un mode de réalisation privilégié, la composition mise en œuvre dans le cadre de l'invention est destinée à un sujet humain. Dans le cadre de l'invention, on entend par « sujet humain », un homme ou une femme, notamment un enfant, un adulte ou une personne âgée.

Selon un autre mode de réalisation, l'animal visé par la présente invention est avantageusement un animal domestique notamment félins, canins, aviaires ou encore rongeurs et/ou un animal d'élevage, notamment avicoles, bovins, caprins, ovins, porcins, équidés, voire camélidés ou cervidés.

Selon un mode de réalisation, la composition mise en œuvre dans le cadre de l'invention est destinée à un usage dans le domaine de la médecine vasculaire, gynécologie, ophtalmologie, endocrinologie/médecine métabolique et/ou dermatologie. LU505892

Selon l'invention, la composition est destinée à être mise en œuvre :

1- pour la cicatrisation de plaies aiguës telles que les plaies aiguës contuses ; les plaies aiguës chez des patients avec un terrain de cicatrisation difficile (*e.g.*, diabète, ischémie artérielle, ischémie veineuse, maladies du tissu conjonctif); des ischémies cutanées aiguës (artérielle ou veineuse) post-opératoires : ischémie des lambeaux cutanés, ischémie des aréoles et mamelons après chirurgie mammaires, ischémie cutanée aiguës après tout type de chirurgie plastique et esthétique, ischémie cutanée aiguës après tout type de chirurgie orthopédique pour les abords cutanés, ischémie cutanée aiguës après tout type de chirurgie vasculaire pour les abords cutanés ; des désunions cutanées post-opératoires quel que soit la chirurgie, sans exposition d'articulation, d'os et de vaisseaux ; ou encore des brûlures (en particulier 1er et 2e degré) ; et/ou

2 pour la cicatrisation de plaies chroniques telles que : des plaies chroniques artérielles ; des plaies chroniques veineuses ; des escarres non infectées de grade I et de grade II ; des désunions cutanées chroniques ; des plaies post-radiothérapie ; des plaies du pied diabétique ou encore des plaies fibrineuses ; et/ou

3- en compléments d'autres techniques de réparation cutanées telles que la réparation par suture directe ; la greffe de peau dermo-épidermique ou greffe de peau totale ou encore en complément de lambeaux cutanés ; et/ou

4- pour la cicatrisation et/ou l'hydratation de la cornée, notamment dans un contexte de syndrome de l'œil sec ; pour le traitement des ulcération de la cornée ; en complément de la greffe cornéenne ou encore en traitement symptomatique des sécheresses de la cornée ; et/ou

5- pour l'hydratation et/ou la régénération cartilagineuse et/ ou articulaire, en particulier une injection intra-articulaire dans la prévention et le traitement symptomatique des arthroses/arthrite ; une injection dans le disque intervertébral pour le traitement symptomatique des arthroses de la colonne vertébrale ou encore une injection dans les muscles, ligaments, tendons et capsules ; et/ou

6- pour l'hydratation d'une muqueuse, en particulier pour traiter la symptomatique des sécheresses vaginales, de l'atrophie vaginale postménopause, de la muqueuse nasale, buccale et anale sèche, des muqueuses lésées (gorge, cordes vocales, œsophage, estomac, intestin, cystite interstitielle) ; et/ou

- 7- pour la greffe et/ou transplantation tissulaire, en particulier en complément de greffes LU505892 cutanées, tendineuses, graisseuses ou capillaires ; et/ou
- 8- pour la greffe et/ou transplantation cellulaire.

Selon un autre aspect, l'invention concerne la composition selon l'invention telle que décrite précédemment pour utilisation dans une méthode de cicatrisation d'une plaie, avantageusement d'une plaie aigue ou chronique.

En d'autres termes, l'invention vise également :

- la composition selon l'invention pour utilisation pour cicatrifier une plaie, avantageusement une plaie aigue ou chronique ; et/ou
- l'utilisation de la composition selon l'invention pour préparer un médicament pour cicatrifier une plaie, avantageusement une plaie aigue ou chronique ; et/ou
- une méthode de cicatrisation d'une plaie, avantageusement d'une plaie aigue ou chronique, comprenant l'administration, avantageusement l'administration par injection, de la composition selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention pour son utilisation telle que décrite précédemment est pour améliorer, accélérer ou favoriser la cicatrisation.

Avantageusement, il s'agit d'accélérer au moins une des 4 phases de la cicatrisation et/ou l'enchainement des phases de la cicatrisation.

En particulier, la composition selon l'invention a pour effet :

- d'améliorer/accélérer la migration des fibroblastes et/ou kératinocytes au niveau de la plaie pour reconstruire le derme et/ou épiderme ; et/ou
- d'augmenter/de stimuler la production et/ou sécrétion d'au moins une protéine/ un peptide choisi parmi le perlécan, la laminine, la loricrine et de la bêta-défensine ; et/ou
- d'augmenter/de stimuler l'activité d'au moins une protéine/ un peptide choisi parmi le perlécan, la laminine, la loricrine et de la bêta-defensine.

Selon un autre aspect, l'invention concerne la composition selon l'invention telle que décrite précédemment pour utilisation dans une méthode d'hydratation de la peau et/ou d'une plaie, avantageusement d'une plaie aigue ou chronique et/ou sèche ou exsudative.

En d'autres termes, l'invention vise également :

- la composition selon l'invention pour utilisation pour hydrater la peau et/ou une plaie, avantageusement d'une plaie aigue ou chronique et/ou sèche ou exsudative ; et/ou

- l'utilisation de la composition selon l'invention pour préparer un médicament pour hydrater la peau et/ou une plaie, avantageusement d'une plaie aigue ou chronique et/ou sèche ou exsudative ; et/ou
- une méthode d'hydratation de la peau et/ou d'une plaie, avantageusement d'une plaie aigue ou chronique et/ou sèche ou exsudative, comprenant l'administration, avantageusement l'administration par injection, de la composition selon l'invention.

Selon un autre aspect, l'invention concerne la composition selon l'invention telle que décrite précédemment pour utilisation dans une méthode d'amélioration de la viabilité des fibroblastes, des kératinocytes et/ou des cellules souches épithéliales, avantageusement les cellules souches adipocytes, dans une thérapie ayant recours aux cellules souches, en particulier aux injections de cellules souches.

En d'autres termes, l'invention vise également :

- la composition selon l'invention pour utilisation pour améliorer la viabilité des fibroblastes, des kératinocytes et/ou des cellules souches épithéliales, avantageusement les cellules souches adipocytes, dans une thérapie ayant recours aux cellules souches, en particulier aux injections de cellules souches ; et/ou
- l'utilisation de la composition selon l'invention pour préparer un médicament pour améliorer la viabilité des fibroblastes, des kératinocytes et/ou des cellules souches épithéliales, avantageusement les cellules souches adipocytes, dans une thérapie ayant recours aux cellules souches, en particulier aux injections de cellules souches ; et/ou
- une méthode d'amélioration de la viabilité des fibroblastes, des kératinocytes et/ou des cellules souches épithéliales, avantageusement les cellules souches adipocytes, dans une thérapie ayant recours aux cellules souches, en particulier aux injections de cellules souches, comprenant l'administration, avantageusement l'administration par injection, de la composition selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition pour son utilisation telle que décrite précédemment est *in vitro*, *ex vivo* et/ou *in vivo*.

Selon un mode de réalisation particulier, l'amélioration de la viabilité selon l'invention est l'amélioration de l'adhésion et/ou de la prolifération et/ou de l'activité métabolique des cellules.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition pour son utilisation pour améliorer la viabilité des cellules est à distinguer d'un milieu de culture cellulaire en ce qu'il ne s'agit pas

d'un milieu dans lequel on trouve tous les éléments nécessaires à la viabilité et à la croissance LU505892 de cellules mises en culture (*e.g.*, du glucose, des oligoéléments, des vitamines, etc.).

Selon un autre aspect, l'invention concerne une méthode d'administration de la composition de l'invention par injection intradermique ou sous-cutanée dans le tissu sain/intact situé en périphérie de la plaie et/ou le tissu lésé au centre de la plaie.

En particulier, le bord de la plaie détermine la frontière entre le tissu intact et le tissu non intégré. Il est important de traiter le tissu intact dont la fonction biologique est ou pourrait être compromise afin que ce compromis soit minimisé et permette une meilleure vascularisation et une stimulation de la cicatrisation des tissus avec rupture de l'intégrité (plaie).

Au niveau de la plaie, l'objectif de la méthode d'administration selon l'invention est d'accélérer la cicatrisation grâce à l'optimisation de tous les mécanismes biologiques de cicatrisation.

Selon un mode de réalisation, le bord de la plaie est délimité comme point de départ du traitement/de l'injection intradermique ou sous-cutanée qui est poursuivie vers l'extérieur de la plaie/les tissus sains.

Selon un autre mode de réalisation, le bord de la plaie est délimité comme point de départ du traitement/de l'injection intradermique qui est poursuivie vers l'intérieur de la plaie/les tissus lésés.

Selon un mode de réalisation alternatif, le bord de la plaie est délimité comme point de départ du traitement/de l'injection intradermique qui est poursuivie vers l'extérieur de la plaie/les tissus sains puis vers l'intérieur de la plaie/les tissus lésés, ou inversement dans la séquence de traitement (*i.e.*, vers l'intérieur puis l'extérieur de la plaie).

Selon un mode de réalisation, la profondeur de l'injection est comprise entre 1 mm et 3 mm selon le tissu (intra ou sous-cutané dans la peau intégrale et immédiatement sous le tissu de granulation ou d'épithélialisation dans les plaies).

Selon un mode de réalisation, l'injection selon l'invention est réalisée par la technique d'injection rétrograde en éventail ou la technique point par point.

L'invention concerne également un kit à des fins thérapeutiques telles que décrites précédemment.

Un kit selon l'invention comprend la composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment, par exemple à des doses pré-mesurées. Le kit selon l'invention peut

comprendre en outre des dispositifs pour administrer ladite composition et des instructions d'utilisation. LU505892

Les dispositifs comprennent des seringues, des pompes implantables, telles que des mini- et micro-pompes, et d'autres dispositifs à usage pharmaceutiques.

En particulier, le dispositif compris dans le kit selon l'invention est une seringue préremplie avec la composition de l'invention.

Les exemples ci-après, sans être limitatifs, font partie intégrante de l'invention et toute caractéristique qui apparaît être nouvelle par rapport à l'état de la technique antérieure est revendiquée en tant que telle et en tant que moyen général.

FIGURES

Figure 1 : Evaluation de l'effet de la composition de l'invention, (LUM 7 quater), de la composition de l'invention dépourvue d'acide hyaluronique ou de l'un de ses sels (LUM 7 AA) et de la composition de l'invention dépourvue d'acides aminés (LUM 7 HA3), à 3h, 24h, 72h et 6 jours, sur la viabilité de cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux (ASC). Les résultats sont issus d'ASC issues de 3 donneurs spécifiques et d'une expérience avec 10 puits par condition. Les tests statistiques sont réalisés versus la condition «DMEM » (significativité : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Figure 2 : Evaluation de l'effet de la composition de l'invention, (LUM 7 quater), de la composition de l'invention dépourvue d'acide hyaluronique ou de l'un de ses sels (LUM 7 AA) et de la composition de l'invention dépourvue d'acides aminés (LUM 7 HA3), à 3h, 24h, 72h et 6 jours, sur l'adhésion, la prolifération et l'activité métabolique de cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux (ASC). Les résultats sont issus d'ASC issues de 3 donneurs spécifiques et d'une expérience avec 12 puits par condition. Les tests statistiques sont réalisés versus la condition «MC » (significativité : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Figure 3 : Evaluation *in vitro* de l'effet de la composition de l'invention, à des concentrations différentes (*i.e.*, solution mère et dilutions à 20%, 30%, 40% et 50% de la solution mère) en comparaison d'un contrôle (DMEM), sur la production/sécrétion de perlécan par des fibroblastes primaires humains en culture .

Figure 4 : Evaluation *in vitro* de l'effet de la composition de l'invention, à des concentrations différentes (*i.e.*, solution mère et dilutions à 20%, 30%, 40% et 50% de la solution mère) en

comparaison d'un contrôle (DMEM), sur la production/sécrétion de laminine par des fibroblastes primaires humains en culture. LU505892

Figure 5 : Evaluation *in vitro* de l'effet de la composition de l'invention, à des concentrations différentes (*i.e.*, solution mère et dilutions à 20%, 30%, 40% et 50% de la solution mère) en comparaison d'un contrôle (Celloneer KC/CC), sur la production/sécrétion de loricrine par des kératinocytes épidermiques humains en culture.

Figure 6 : Evaluation *in vitro* de l'effet de la composition de l'invention, à des concentrations différentes (*i.e.*, solution mère et dilutions à 20%, 30%, 40% et 50% de la solution mère), en comparaison d'un contrôle (Celloneer KC/CC), sur la production/sécrétion de bêta-défensine par des kératinocytes épidermiques humains en culture.

Figure 7 : Suivi de l'effet de la composition de l'invention, à des concentrations différentes (*i.e.*, solution mère et dilutions à 20%, 30%, 40% et 50% de la solution mère), en comparaison d'un contrôle (DMEM), sur la vitesse de migration de fibroblastes suite à une blessure expérimentale.

Figure 8 : Photographies d'une plaie chronique sur la face latérale du pied évoluant depuis plusieurs années chez un patient paraplégique de 58 ans avant traitement (A) et après 2 mois de traitement (B) par injections hebdomadaire dans la plaie (injections intra-lésionnelles) et dans le tissu sain à proximité de la plaie (injections péri-lésionnelles).

EXEMPLES DE REALISATION

Exemple 1. Evaluation de la toxicité de la composition de l'invention

1. Objectif de l'étude

Cette étude a pour but de démontrer la non « cytotoxicité » de la composition de l'invention à 4 temps différents (*i.e.*, 3h, 24h, 72h et 6 jours) sur les cellules souches du tissu adipeux (ou cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux ou « Adipose derived Stem Cells » ou ASC) de 3 donneurs par un test au MTT (ou 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

2. Matériels et méthodes

2.1. Cellules

Les ASC des 3 donneurs à la densité de 10 000 cellules /puits (plaque 96 puits).

Donneur 1 : 11171 28 ans (ampoule P2 - ensemencée en P4) ;
 Donneur 2 : 12025 28 ans (ampoule P0 - ensemencée en P2) ; et
 Donneur 3 : 12106 40 ans (ampoule P1 - ensemencée en P3)

2.2. Préparation des compositions testées

Les principes actifs mis en œuvre dans la composition de l'invention (LUM 7 QUATER) sont illustrés dans le tableau 2 ci-dessous.

[Table 2]

Composants	Pour 10L
NaHA Haut poids Moléculaire >2 Mda	65g
NaCL	50g
KH ₂ PO ₄	7g
Na ₂ HPO ₄	14g
isoleucine	63mg
leucine	263mg
lysine	362,5mg
methionine	75,5mg
phenylalanine	165,1mg
Valine	234,3m g
thréonine	238,2mg
tryptophane	51mg
Eau QSP	10L

Les principes actifs mis en œuvre dans la composition de l'invention (LUM 7 HA3) sont illustrés dans le tableau 3 ci-dessous.

[Table 3]

Composants	Pour 10L
NaHA Haut poids Moléculaire >2 Mda	65g
NaCL	50g
KH ₂ PO ₄	7g
Na ₂ HPO ₄	14g
Eau QSP	10L

Les principes actifs mis en œuvre dans la composition de l'invention (LUM 7 AA) sont illustrés dans le tableau 4 ci-dessous.

[Table 4]

Composants	Pour 10L
NaCL	50g
KH ₂ PO ₄	7g
Na ₂ HPO ₄	14g
isoleucine	63mg
leucine	263mg
lysine	362,5mg
methionine	75,5mg
phenylalanine	165,1mg
Valine	234,3m g
thréonine	238,2mg
tryptophane	51mg
Eau QSP	10L

La préparation de la formule comporte 3phases, à savoir :

- réalisation de la solution tampon pH : ajouter la quantité totale d'eau puis mettre sous agitation, ajouter les sels tampons et après dissolution complète, vérifier la conformité du pH ;
- ajout du NaCL et des acides aminés : toujours sous agitation constante, ajouter le NaCL, attendre sa dissolution puis ajouter les acides aminés en vérifiant avant chaque ajout leur dissolution ; et
- ajout de l'acide hyaluronique : toujours sous agitation constante, ajouter par petites fractions l'acide hyaluronique et attendre la dissolution complète avant d'arrêter l'agitation.

Une fois la préparation de la formule terminée , vérifier le pH puis répartir en flacons ou seringues et enfin autoclaver les flacons ou seringues obtenus.

2.3. Conditions

1. LUM 7 Quater (composition de l'invention) : 6 vials of 5ml
2. LUM 7HA3 (composition de l'invention dépourvue d'acides aminés) : 8 vials de 5mL
3. LUM 7 AA (composition de l'invention dépourvue d'acide hyaluronique): 8 vials of 5ml

Il est à noter qu'une seule dilution sera testée pour chaque formule de l'exemple (pur).

Le sodium dodécyl sulfate (SDS) est utilisé comme témoin négatif de viabilité (à 0,05 % dissout dans le milieu de prolifération).

Un témoin non traité n'étant au contact que du DMEM servira à déterminer les 100 % de viabilité (témoin positif).

Un témoin dans du milieu de culture sera également réalisé.

Le milieu de culture contient : « DMEM/F12 with GlutaMAX », 10% SVF, 100U/mL pénicilline, streptomycine , 5 µg/mL fungizone, 10 ng/mL « FGF2 premium grade » (MiltenyiBiotec, Paris, France).

2.4. Protocole expérimental

Les ASC sont décongelées etensemencées dans des flasques et cultivées jusqu'à confluence. Les ASC seront trypsinées,ensemencées dans une plaque 96 puits à la densité de 10.000cellules/puits et cultivées dans du milieu de prolifération (DMEM) pendant 24h. Le lendemain, les produits sont appliqués et laissés en contact pendant 3, 24, 72 heures et 6 jours avant d'effectuer un test au MTT. Pour chaque condition et chaque temps, 12 puits seront traités. Lors du test au MTT, le pourcentage de viabilité de chaque condition sera calculé par rapport au témoin positif qui représentera le 100% de viabilité. Le témoin négatif SDS à 0,05% devrait être égal à 0 % de viabilité.

Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium, le MTT ((3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) qui est réduit en formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase des cellules vivantes. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Ce composé insoluble de couleur violette devra être solubilisé par du DMSO pour permettre son dosage spectrophotométrique à 540 nm.

2.5. Analyse des données

Les données brutes ont été analysées à l'aide du logiciel Microsoft Excel.

Les comparaisons intergroupes ont été réalisées par un test t de Student non apparié. Les différences sont considérées comme statistiquement significative à partir de $p < 0,05$. (NS : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

3. Résultats

Les résultats sont présentés à la figure 1.

Il apparaît que :

Le DMEM est une solution isotonique de base ne contenant ni facteur de croissance ni sérum de veau. Elle permet de maintenir les ASC viables pendant 72H. Elle est utilisée comme contrôle positif.

Le milieu de culture (MC) est un milieu très riche : il contient du sérum de veau et un facteur de croissance (FGF2) il ne peut pas être administré chez l'Homme. LU505892

La composition de l'invention (LUM 7 QUATER) et la composition de l'invention dépourvue d'acides aminés (LUM 7 HA3) ont une viabilité dans le temps similaire.

La viabilité des cellules en contact avec la composition de l'invention dépourvue d'acide hyaluronique (LUM 7 AA) décroît rapidement.

Ces données témoignent de l'effet de synergie entre le hyaluronate de sodium et les acides aminés de la composition de l'invention sur la viabilité cellulaire. En d'autres termes, la combinaison de l'acide hyaluronique ou de l'un de ses sels avec les 8 acides aminés de l'invention a un effet synergique significatif d'augmentation de la viabilité cellulaire.

Exemple 2. Evaluation de l'effet de la composition de l'invention sur l'adhésion, la prolifération et activité métabolique de cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux

1. Objectif de l'étude

Cette étude a pour but de démontrer l'effet de la composition de l'invention sur l'adhésion, la prolifération et l'activité métabolique à 4 temps différents (*i.e.*, 3h, 24h, 72h et 6 jours) sur les cellules souches du tissu adipeux (ou cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux ou « Adipose derived Stem Cells » ou ASC) de 3 donneurs par un test au MTT (ou 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

2. Matériels et méthodes

Voir les points 2.1. à 2.3. et 2.5. de l'exemple 1.

2.4. Protocole expérimental

Les ASC sont décongelées en P0, P1 ou P2 selon les donneurs etensemencées dans des flasques en P1, P2 ou P3 et cultivées jusqu'à confluence.

A confluence, les ASC sont trypsinées puisensemencées dans une plaque 96 puits. Les produits sont appliqués dès l'ensemencement dans la plaque 96 puits et laissés en contact pendant 24, 72, 96 heures et 7 jours avant d'effectuer un test au MTT. Pour chaque condition et chaque temps, 8 puits ont été traités soit un total de 1 plaque 96 puits par temps et par donneur, 12 plaques au total.

Lors du test au MTT, le pourcentage de viabilité de chaque condition sera calculé par rapport LU505892 au témoin positif qui représentera le 100% de viabilité. Le témoin négatif SDS à 0.05% devait être égal à 0 % de viabilité.

Il convient de noter que me milieu MC est utilisé ici puisqu'il est largement connu pour être un milieu très riche, en ce qu'il contient du sérum de veau et un facteur de croissance (FGF2. Il a utilisé ici pour ses fonction d'amélioration de l'adhésion, de la viabilité et de la prolifération des ASC en culture cellulaire afin de pouvoir observer et quantifier un effet de la composition selon l'invention.

3. Résultats

Les résultats sont présentés à la figure 2.

Il apparaît que les cellules mésenchymateuses du tissu adipeux ont un comportement similaire dans les 3 formulations LUM 7 quater, LUM 7HA3 et LUM 7 AA.

Exemple 3. Evaluation *in vitro* de l'effet de la composition de l'invention sur la production/sécrétion de perlécan et laminine par des fibroblastes primaires humains (FPH) ainsi que de loricrine et bêta-défensine par des kératinocytes épidermiques humains en culture (HEK)

1. Culture et entretien de la lignée HEK

Les HEK sont des cellules de kératinocytes humaines issues de peau de différents donneurs, mises en culture dans du Celloneer KC/CC qui est un milieu de base pour les kératinocytes. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide (85 à 90% d'humidité) contenant 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé 4 jours après la mise en culture, puis deux fois par semaine.

2. Culture et entretien de la lignée FPH

Les fibroblastes d'une femme de 40 ans (FPH) sont mises en culture dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémenté par 10% de sérum bovin fœtal, 1% de L-Glutamine contenant les acides aminés essentiels, des sels, du glucose et des vitamines nécessaires pour la stimulation des cellules et de 1% de pénicilline-streptomycine. L'addition d'un volume correspondant à une concentration de 1% de pénicilline-streptomycine permet de prévenir une éventuelle croissance bactérienne. Le tout est filtré sur « stericup » (milliport). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide (85 à 90%

d'humidité) contenant 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé 4 jours après la mise en culture, puis LU505892 deux fois par semaine.

3. Protocole expérimental

Les HEK et FPH sont traités quotidiennement avec la composition de l'invention correspondant à la formule LUM 7 quater de l'exemple 1 à des concentrations différentes. En particulier, une solution mère de LUM 7 quater est préparée comme décrit à l'exemple 1 puis des dilutions de 20%, 30%, 40% et 50% sont appliquées à cette solution mère. La solution mère ainsi que les formules diluées à 20%, 30%, 40% et 50% sont appliquées aux cellules en culture.

4. Résultats

Les résultats sont présentés aux figures 3 à 6.

Il apparaît que :

- les fibroblastes cultivés en présence de la formule de l'invention, à différentes concentrations, produisent plus de Laminine et du Perlecan que des fibroblastes cultivés en milieu standard (DMEM) ; et
- les kératinocytes cultivés en présence de la formule de l'invention, à différentes concentrations, produisent plus de loricrine que des kératinocytes cultivés en milieu standard (Celloneer KC/CC). En outre, la production de bêta-défensine, liée à la protection antimicrobienne, est accrue dans les kératinocytes en présence de la composition de l'invention.

Exemple 4. Evaluation *in vitro* de l'effet de la composition de l'invention sur la vitesse de migration de fibroblastes suite à une blessure expérimentale

Le test de cicatrisation liée à la blessure de tapis cellulaire consiste à arracher les cellules de manière contrôlée sur une trajectoire précise dans une boîte de Pétri et d'observer à intervalles réguliers/filmer la manière dont les cellules avoisinantes de la « blessure » vont coloniser l'espace vide. La principale composante de la cicatrisation de la blessure sera la migration cellulaire mais il peut y avoir aussi une composante liée à la prolifération.

1. Protocole expérimental

1.1. Préparation des cultures

La première étape du test consiste à cultiver une monocouche de FPH confluentes. Cette monocouche représente les conditions *in vivo* du tissu avant la blessure, par exemple un épithélium intact.

1.2. Création de la blessure

Une fois que les cellules sont devenues confluentes, l'étape suivante consiste à créer un espace libre de cellules dans la monocouche. La méthode consiste à blesser la monocouche par grattage mécanique (ou « scratch wound »).

1.3. Acquisition de données

Après application de la blessure et traitement ou non avec la solution mère ou les dilutions à 20%, 30%, 40% et 50% de la solution mère, la microscopie optique est utilisée pour observer les cellules migrant vers la zone de la plaie. Une fois le microscope configuré, une série d'images accélérées (méthode d'instantané) est acquise à mesure que les cellules migrent dans l'espace libre de cellules. Ces points temporels sont collectés toutes les heures, pendant 72 heures. Des mesures précises sont également acquises manuellement à l'aide d'un appareil photo numérique installé sur le microscope.

1.4. Analyse des données

La migration a été analysée à l'aide d'un microscope inversé Nikon à un grossissement de 20X (Melville, NY). L'enregistrement en time-lapse a commencé après traitement avec la composition de l'invention aux différentes concentrations testées, de la culture de FPH ayant subi une blessure par grattage. Trois champs par puits ont été imagés et suivis à des intervalles de 1 heure pendant 72 heures avec une caméra Coolsnap HQ (Photo-metrics, Tucson, AZ) opérée par le logiciel NIS-elements AR 2.30 (Nikon). Le suivi manuel des cellules individuelles a été réalisé à l'aide du logiciel Metamorph (Roper Scientific, Evry, France). Les paramètres de migration calculés pour chaque cellule individuelle ont été déterminés à partir des films time-lapse. Ils comprennent la distance totale de migration, la distance à l'origine, la vitesse et la persistance directionnelle de la migration cellulaire. La distance totale de migration représente la somme des distances entre chaque mesure sur une période de 72 h. Pour chaque condition, les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ SD d'au moins 60 cellules individuelles.

A noter qu'un inhibiteur de prolifération, la mitomycine C, a été ajoutée au milieu afin d'obtenir des données visant uniquement la migration cellulaire et non la migration et/ou la prolifération cellulaire.

2. Résultats

Les résultats sont présentés à la figure 7.

Il apparait que les fibroblastes en culture, stimulés par la composition de l'invention à LU505892 différentes concentrations, présentent une vitesse de migration supérieure aux fibroblastes en condition contrôle. Cela signifie que le recouvrement de la blessure et donc la cicatrisation est accélérée par l'administration de la composition de l'invention.

Ces données sont confirmées par la figure 8 qui montre que l'administration *in vivo* de la composition de l'invention (solution mère et les dilutions à 20%, 30%, 40% et 50% de la solution mère) conduit à une cicatrisation améliorée et accélérée par rapport à un protocole de soin classique.

Exemple 5. Evaluation *in vivo* de l'effet de la composition de l'invention sur la cicatrisation d'une plaie chronique

Un patient paraplégique de 58 ans souffrant d'une plaie chronique sur la face latérale du pied évoluant depuis plusieurs années a été traité par injections hebdomadaire dans la plaie (injections intra-lésionnelles) et dans le tissu sain à proximité de la plaie (injections péri-lésionnelles) pendant 2 mois.

La figure 8 présente une photographie avant traitement (A) et après 2 mois de traitement (B).

Il ressort clairement de ces photographies que le traitement avec la composition de l'invention, par injection intradermique, améliore de façon surprenante la cicatrisation d'une plaie chronique évoluant depuis plusieurs années.

CONCLUSION GENERALE

Ces données témoignent de l'effet de synergie entre le hyaluronate de sodium et les acides aminés de la composition de l'invention sur la viabilité, l'adhésion, la prolifération cellulaire et l'activité métabolique cellulaire. En d'autres termes, la combinaison de l'acide hyaluronique ou de l'un de ses sels avec les 8 acides aminés de l'invention a un effet synergique significatif d'augmentation de ces phénomènes.

En outre il apparait que la composition de l'invention (LUM 7 QUATER) permet une survie des cellules pendant une durée de 6 jours supérieure à la composition de l'invention dépourvue d'acide hyaluronique ou de l'un de ses sels (LUM 7 AA).

En outre, ces données montrent clairement que les différents composants de la lame basale sont stimulés par la formule de l'invention, testées à différentes concentrations. Ce qui se traduit par un effet positif au niveau de :

- la jonction dermo-épidermique : la composition de l'invention renforce cette jonction et agit LU505892 sur la fermeté mécanique de l'épiderme ;
- des tissus dermique et épidermique : la composition de l'invention accroît les interactions entre les cellules et leur environnement ;
- la différenciation terminale des kératinocytes : la composition de l'invention stimule différents effecteurs liés à la protection mécanique, immunologique et bactérienne de l'épiderme ; et
- la fonctionnalité des fibroblastes : accroît la vitesse de migration des fibroblastes, induit un plus grand nombre de myofibroblastes ainsi que la synthèse de collagène I et III, facilitant ainsi la cicatrisation/réparation du derme.

Par conséquent, il ressort de ce qui précède que la composition de l'invention agit sur la synthèse des constituants de la lame basale/ jonction dermo-épidermique par modification de l'expression de synthèse des kératinocytes et des fibroblastes.

La composition de l'invention participe fortement à la stimulation des kératinocytes, pour la synthèse des récepteurs et molécules liées à la protection de l'épiderme et accélère la migration des fibroblastes tout en accroissant le phénotype myofibroblastes dans un modèle de blessure expérimentale.

Ces conclusions permettent de confirmer les effets bénéfiques de l'invention dans un contexte d'utilisation de la composition de l'invention pour cicatriser la cornée, une articulation ou un cartilage, améliorer la viabilité de cellules, l'hydratation de muqueuses ou encore dans une indication de greffe tissulaire ou cellulaire.

REVENDEICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant :

- de l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels dont le poids moléculaire est supérieur à 2MDa ;
et
- au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain sélectionné dans le groupe consistant en la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, la thréonine et l'histidine.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que les au moins 8 acides aminés essentiels pour l'humain sont la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane et la thréonine.

3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels se présente sous une forme non réticulée.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels est le hyaluronate de sodium, le hyaluronate de potassium ou leurs mélanges, avantageusement le hyaluronate de sodium.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre de l'hydrogénophosphate de sodium, du dihydrogénophosphate de potassium, du chlorure de sodium et de l'eau, avantageusement de l'eau pour préparations injectables.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle consiste en :

- du hyaluronate de sodium ;
- les acides aminés essentiels suivants : la lysine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane et la thréonine ;
- du Na_2HPO_4 ;
- du KH_2PO_4 ;
- du NaCl ; et
- de l'eau.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que :

- l'acide hyaluronique ou l'un de ses sels, avantageusement le hyaluronate de sodium, représente entre 6 g/L et 8 g/L ;

- la lysine représente entre 33 mg/L et 39 mg/L ;
- la valine représente entre 21 mg/L et 25 mg/L ;
- l'isoleucine représente entre 5,7 mg/L et 6,6 mg/L ;
- la leucine représente entre 24,3 mg/L et 28,3 mg/L ;
- la méthionine représente entre 6,8 mg/L et 8,2 mg/L ;
- la phénylalanine représente entre 15 mg/L et 18 mg/L ;
- le tryptophane représente entre 4,6 mg/L et 5,6 mg/L ;
- la thréonine représente entre 21,1 mg/L et 25,2 mg/L ;
- le Na_2HPO_4 représente entre 1,35 g/L et 1,45 g/L ;
- le KH_2PO_4 représente entre 0,65 g/L et 0,75 g/L ;
- le NaCl représente entre 4,5 g/L et 5,5 g/L ; et
- l'eau représente une quantité suffisante pour 1L.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation comme médicament.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour utilisation pour améliorer la cicatrisation d'une plaie, avantageusement d'une plaie aigue ou chronique.

10. Composition pour son utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la cicatrisation est améliorée.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour utilisation pour hydrater un tissu, avantageusement la peau, la cornée, une muqueuse, un cartilage, un os, et/ou une plaie, avantageusement une plaie aigue ou chronique.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour utilisation dans une méthode d'amélioration de la viabilité des fibroblastes, des kératinocytes et/ou des cellules souches épithéliales.

13. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour utilisation pour améliorer la régénération cartilagineuse et/ ou articulaire.

14. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour utilisation pour améliorer la greffe et/ou transplantation d'un tissu ou d'une cellule.

[Fig. 1]

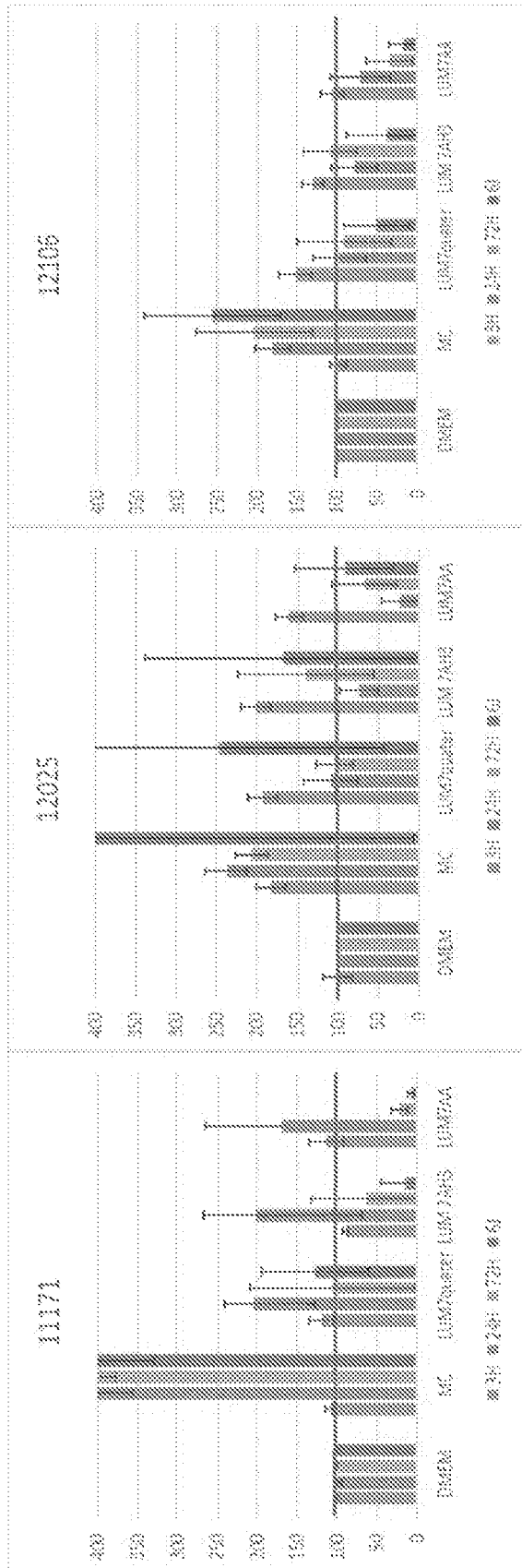
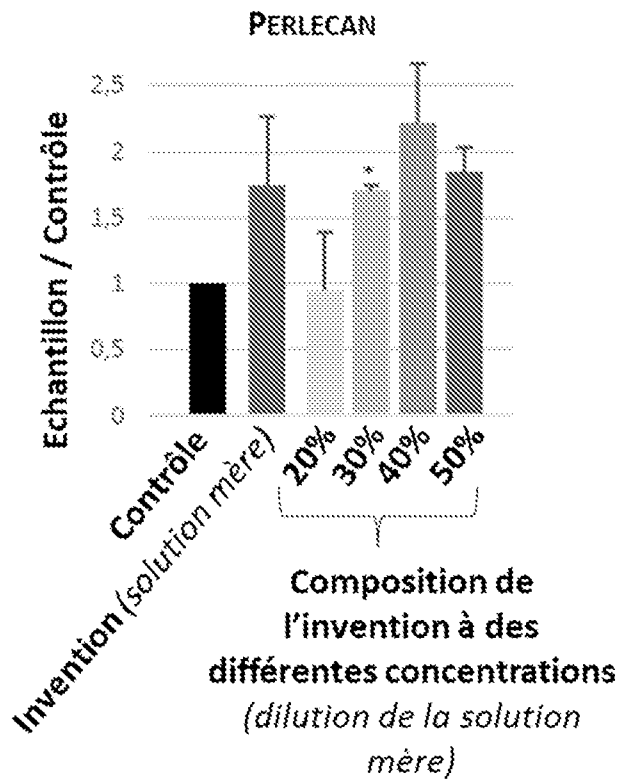


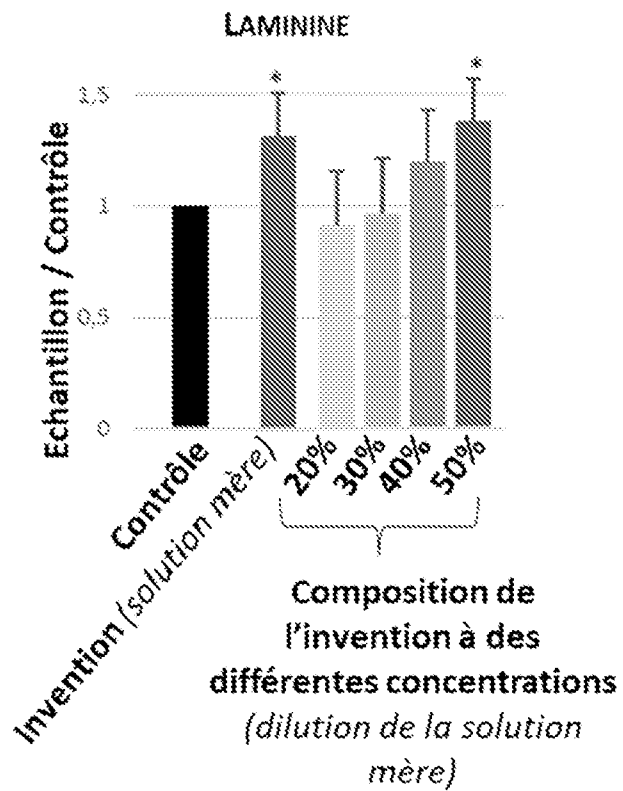
Figure 1 displays three bar charts showing the number of genes with significant differential expression (p < 0.05) for three comparisons: 11171 (100% vs 120% CO₂), 12025 (120% vs 150% CO₂), and 12106 (120% vs 150% CO₂). The charts compare four methods: DE, DESeq, edgeR, and SAM. The y-axis represents the number of genes (0 to 100). Error bars indicate standard deviation. Significance levels are indicated by asterisks above the bars.

Comparison	Method	Number of Genes (approx.)	Significance
11171 (100% vs 120% CO ₂)	DE	100	
	DESeq	100	
	edgeR	35	*
	SAM	25	*
12025 (120% vs 150% CO ₂)	DE	100	
	DESeq	100	
	edgeR	75	*
	SAM	45	*
12106 (120% vs 150% CO ₂)	DE	100	
	DESeq	100	
	edgeR	80	*
	SAM	25	*

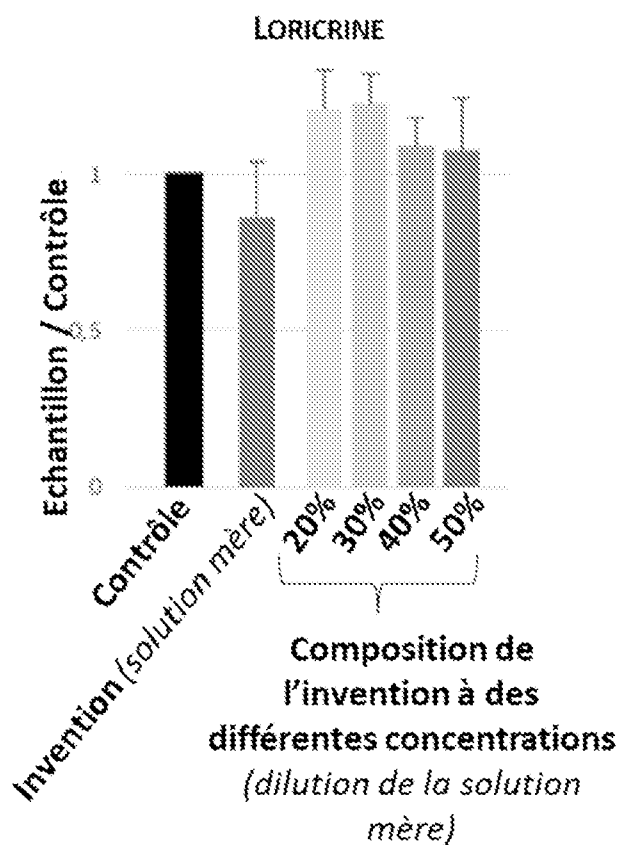
[Fig. 3]



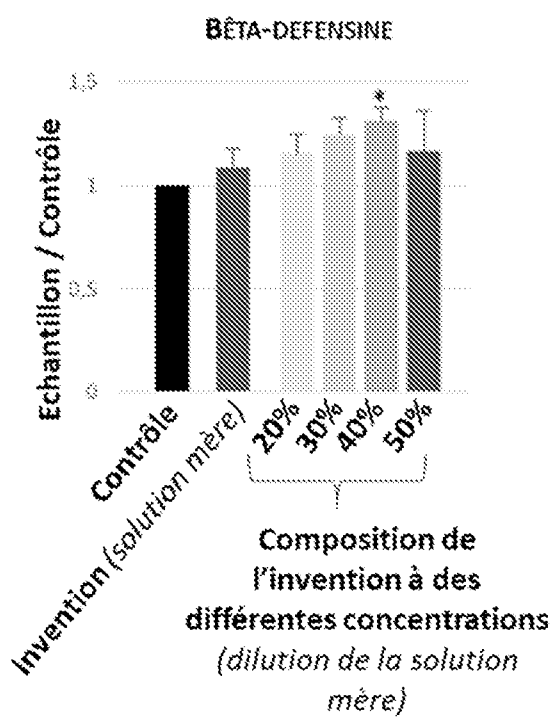
[Fig. 4]



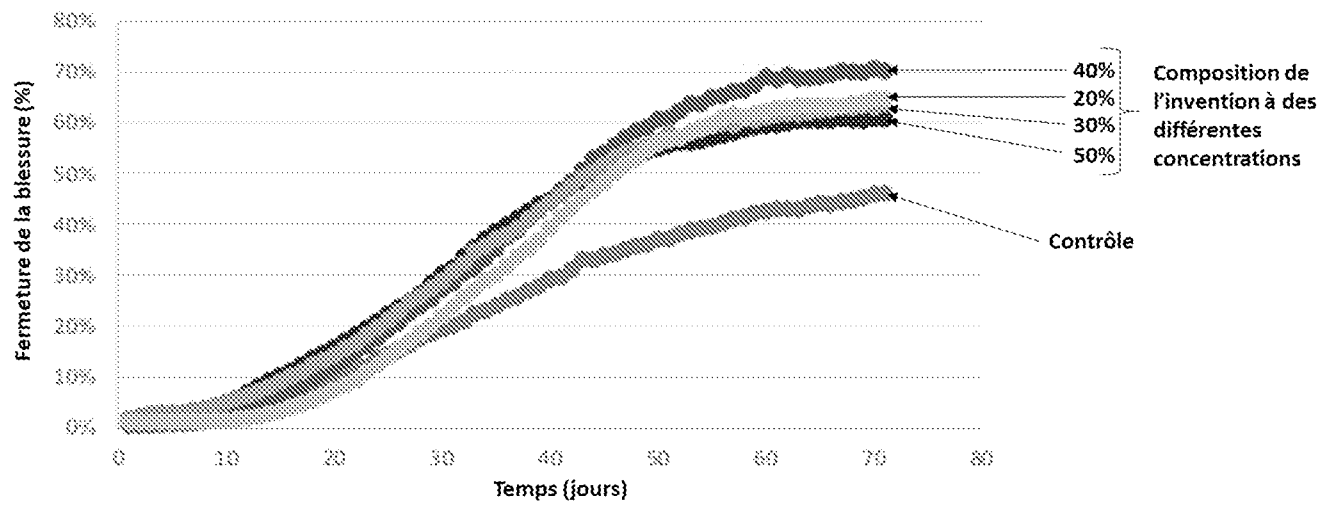
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

