

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 08.10.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 09.04.93 Bulletin 93/14.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société: «PATRINOVE» Société  
Civile — FR, Société: «TEXINFINE» Société Anonyme  
— FR et Association: «SOCIETE D'HEPATOLOGIE  
EXPERIMENTALE» Association suivant la loi 1901 —  
FR.

⑦2 Inventeur(s) : Gutierrez Gilles, Grimaud Jean-Alexis,  
Andujar Mauricio et Emonard Hervé.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Monnier.

⑤4 Milieux synthétiques pour la culture des fibroblastes et leurs applications.

⑤7 Ces milieux synthétiques pour la culture cellulaire  
contiennent des vecteurs vésiculaires intracellulaires d'affi-  
nité spécifique dont la composition membranaire, modifiée  
par introduction de ligands métaboliques aptes à s'exprimer  
à l'intérieur et à l'extérieur de leur structure, entraîne  
une modulation de l'activité de synthèse de la cellule ciblée.  
Les ligands métaboliques sont choisis parmi les initia-  
teurs et les modulateurs de la synthèse cellulaire dotés de  
fonction ou radical lipophile par acylation, et les vecteurs  
vésiculaires sont choisis parmi les vésicules, capsules ou  
sphères artificielles d'un diamètre qui peut aller de 30 à  
1000 nanomètres, mis en œuvre pour incorporer une sub-  
stance active soit dans un milieu aqueux remplissant le vo-  
lume intérieur du vecteur soit dans la paroi même dudit  
vecteur puis pour transporter cette substance active vers  
un site où elle sera libérée et utilisée à différentes fins.

Application de ces milieux de culture à la production de  
peptides de la matrice extracellulaire et de peptides à acti-  
vité enzymatique.



## MILIEUX SYNTHETIQUES POUR LA CULTURE DES FIBROBLASTES ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne des milieux synthétiques pour la culture des fibroblastes et leurs applications.

On sait que l'abondance de la matrice extracellulaire qui sépare les constituants cellulaires est l'une des caractéristiques du tissu conjonctif. Cette matrice est à l'origine de différentes fonctions remplies par ce tissu. Elle sert d'élément de support biomécanique et sa composition variée influence le comportement cellulaire. Loin d'être une structure stable, cette matrice est en remaniement constant du fait de l'activité cellulaire qui la synthétise et la modifie. Les changements se produisant au niveau de la matrice extracellulaire peuvent être de nature quantitative ou de nature qualitative. Un déséquilibre entre la synthèse et/ou la dégradation peut contribuer à la mise en place d'une matrice extracellulaire "modifiée" ou pathologique.

On sait qu'une très grande variété des molécules qui composent la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycanes et glycoprotéines) sont synthétisés par les fibroblastes. Le collagène représente un des composants majeurs de la matrice extracellulaire. On connaît actuellement 13 types de collagènes originaires d'une famille d'une vingtaine de gènes. Ces molécules sont formées d'une association de trois chaînes peptidiques en triple hélice alpha. Dans la partie hélicoïdale, une séquence d'acide-amino se répète, où la glycine précède souvent une proline et une hydroxyproline. La structure protéique spécifique permet aux collagènes d'exercer différentes fonctions au sein du tissu conjonctif.

Parmi les différents types de collagène, les collagènes de type I et III constituent le produit de synthèse majeur des fibroblastes. Emonard et Grimaud (Cellular and Molecular Biology, 36 (2) 131-153 - 1990) ont montré que les fibroblastes peuvent contrôler la qualité et la quantité des collagènes non seulement par la diminution de la synthèse, mais aussi par la synthèse des enzymes de dégradation correspondants. Ainsi, la cellule fibroblastique peut, à elle seule, contrôler l'ensemble du dépôt matriciel conjonctif. Cette cellule fibroblastique est de plus influencée en permanence par des facteurs solubles (cytokines) et par des facteurs insolubles (les composants matriciels). Le résultat de ces interactions conditionne la fonction fibroblastique vers une activité de synthèse ou de dégradation à l'égard de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes constituent donc une pièce fondamentale dans la physiologie du tissu conjonctif et le contrôle de ses fonctions est d'une importance capitale dans le domaine biotechnologique.

Le contrôle de la synthèse du collagène par les fibroblastes est d'une importance majeure pour la physiologie du tissu conjonctif.

En effet, le fibroblaste est la cellule mésenchymateuse responsable de la synthèse, de l'organisation et du remodelage de la matrice conjonctive. Parmi les  
5 différentes molécules synthétisées par les fibroblastes, nous avons vu que les collagènes de type I et III sont quantitativement les plus importants. De ce fait, l'utilisation de la culture de fibroblastes permet d'analyser de manière précise l'action des différentes molécules sur l'activité de synthèse ou de dégradation du collagène.

10 Un grand nombre de drogues ont déjà été décrites comme susceptibles de modifier la fonction fibroblastique (Bissel et Coll, Hepatology ,vol. 11 n° 3,1990 p. 488-498 - Emonard et Grimaud, in Cellular and Molecular Biology, 36 (2) 131-153 - 1990 - Kovacs in Immunology Today Vol. 12 ,N 1, 1991).

Certaines de celles-ci sont capables de stimuler la synthèse du collagène  
15 par les fibroblastes : l'acide ascorbique (Chojkier et coll - J of Biological Chemistry - Oct. 5,1989 p. 16957 - 16962), les cytokines comme l'interleukine-1, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Kovacs - Immunology Today 1 - 1991), les peptides dérivés du collagène (Pacini et coll. Res. Comm. in Chemical Pathology and Pharmacology - Avril 1990 p. 89-101).

20 D'autres molécules ont été étudiées pour inhiber la synthèse du collagène et parfois induire la synthèse d'enzymes de dégradation (collagénases). Les plus connues sont les hormones corticoïdes, les cytokines comme le facteur dérivé de la nécrose tumorale (TNF) et les interférons ; voir : Bissel et Coll , Emonard et Grimaud, Granstein et coll. (The J of Investigative Dermatology suppl. déc.1990) et Kovacs

25 On a toutefois constaté que les milieux nutritifs les meilleurs ne permettaient pas d'augmenter la teneur en acides aminés au sein des cytoplasmes cellulaires. Or on sait que la synthèse du collagène nécessite un apport important en acides aminés.

Il n'est notamment pas possible d'accroître de manière significative la  
30 teneur en acide ascorbique d'un milieu nutritif en raison du pH ou des modifications de la pression osmotique lorsque celui-ci est neutralisé.

La demande de brevet déposée le même jour pour "Vecteurs vésiculaires  
infracellulaires et leur application dans les compositions cosmétiques" décrit et revendique certains vecteurs vésiculaires infracellulaires comportant des ligands  
35 métaboliques aptes à s'exprimer à l'intérieur et à l'extérieur de leur structure.

Les inventeurs ont pu déterminer que les aptitudes que présentent l'ensemble de ces vecteurs vésiculaires dans le contrôle de la synthèse du collagène par les fibroblastes leur permettaient de trouver des applications spécialement intéressantes dans la réalisation de milieux de synthèse et de culture des fibroblastes.

En effet l'utilisation de ces vecteurs vésiculaires intracellulaires permet d'ajouter au milieu de culture des éléments nutritifs n'intervenant ni dans le pH ni dans l'expression de la pression osmotique.

L'invention concerne donc des milieux synthétiques pour la culture des fibroblastes contenant des vecteurs vésiculaires intracellulaires comportant des ligands métaboliques aptes à s'exprimer à l'intérieur et à l'extérieur de leur structure.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les vecteurs sont des vecteurs intracellulaires d'affinité spécifique dont la composition membranaire, modifiée par introduction de ligands métaboliques, entraîne une modulation de l'activité de synthèse de la cellule ciblée .

Ces ligands métaboliques sont choisis de préférence parmi les initiateurs et les modulateurs de la synthèse cellulaire dotés de fonction ou radical lipophile par acylation, tels que les esters gras de l'acide ascorbique et notamment son palmitate, le palmitate d'hydrolysate de collagène, et les esters gras de l'hydroxyproline et plus spécialement son palmitate.

L'acide ascorbique est notamment immobilisé au sein du vecteur sous forme d'ester d'acide gras, ce qui évite toute fuite de composé.

L'hydrophilie de la membrane du vecteur est obtenue par la fixation d'amide grasse (lipoaminoacide) à l'extérieur du vecteur.

On voit tout l'intérêt du transport par un même vecteur d'un stimulant de la synthèse de collagène modifié pour une meilleure encapsulation et d'éléments précurseurs de la synthèse des fibroblastes.

Dans la présente description, le terme vecteur vésiculaire (ou, pour simplifier "vecteur") s'appliquera à tous vésicules, capsules ou sphères artificielles d'un diamètre qui peut aller de 30 à 1000 nanomètres, et qui sont mis en oeuvre pour incorporer une substance active soit dans un milieu aqueux remplissant le volume intérieur du vecteur soit dans la paroi même dudit vecteur puis pour transporter cette substance active vers un site où elle sera libérée et utilisée à différentes fins.

Selon l'invention l'utilisation des vecteurs vésiculaires cités plus haut en tant que vecteurs de molécules bioactives aptes à stimuler la synthèse des collagènes par des cellules comme les fibroblastes ou à inhiber cette synthèse et à induire la synthèse d'enzymes de dégradation renforce ou modifie considérablement l'action de ces molécules ; ils agissent de plus comme modificateurs de leur cytotoxicité ce qui présente un intérêt considérable dans leur application dans les milieux de synthèse et de culture des fibroblastes.

Dans les expériences décrites ci-après on a utilisé plus spécifiquement le palmitate d'ascorbyle, des peptides dérivés du collagène, et le palmitate d'hydroxyproline.

Les résultats des essais présentés ci-après ont été obtenus selon la méthodologie suivante :

Conditions de culture : les fibroblastes sont obtenus à partir d'explants de peau humaine. Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu DMEM (Gibco) additionné de 10 % de sérum de veau foetal (Gibco) et d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml). Les subcultures sont réalisées par trypsination (Trypsin-EDTA, Gibco). Les cellules sont utilisées du 2<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> passage.

Conditions de traitements : Les cultures de fibroblastes témoins se réfèrent aux cultures avec vecteurs sans principe actif, en quantité similaire aux autres traitements.

Les cultures traitées avec la molécule en solution se réfèrent aux conditions de la culture témoin et de la molécule sous forme soluble.

Les cultures traitées avec la forme vectoriale de la molécule impliquent que la molécule active soit incluse préalablement dans les vecteurs.

Test de prolifération cellulaire (test MTT) : après ensemencement, les cellules sont incubées trois jours avec du milieu contenant les molécules à tester. Puis on ajoute le sel de tétrazolum jaune (5 mg / ml).

Il est réduit par les réductases mitochondriales des cellules vivantes en un produit formazan violet qui est ensuite solubilisé par de l'HCl 0,04 N dans de l'isopropanol. La réaction colorée est lue à une longueur d'onde de 570 nm par un Multiskan Titertek (Flow Laboratories) et exprimée en densité optique.

Evaluation des collagènes solubles par dosage radioimmunologique : On prélève 100 µl de surnageant de culture et on y ajoute 100 µl d'anticorps anti-collagène de type I ou anti-collagène de type III et 200 µl de PBS.

Après 24 heures à 4°C, on ajoute 100 µl de collagène de type I ou de type III marqué à l'iode 125.

On sépare ensuite de l'antigène libre l'antigène lié à l'anticorps par précipitation avec 100 µl d'antisérum de chèvre anti-IgG de lapin en présence de polyéthylène glycol (PEG) 6000. Après centrifugation on mesure la radioactivité du précipité à l'aide d'un compteur LKB 1260 multigamma.

#### 10 Mesure de l'activité collagénasique dans le milieu de culture

On mesure la collagénase interstitielle qui dégrade les collagènes interstitiels natifs de type I-III.

a) Préparation du substrat : le collagène de type I, marqué au carbone-14, en solution dans CH<sub>3</sub>COOH 0,1 M est neutralisé à pH 7,4 par du Tris 1 M et dilué avec le tampon NaCl 0,15 M/CaCl<sub>2</sub> 4 mM/Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contenant du NEM 0,5 mM et du PMSF 0,1 mM à raison de 10000 cpm/100µl substrat (= 10000 cpm/essai).

b) Dosage de la collagénase : 100 µl de milieu sont activés par 10 µl de trypsine (1 mg/ml) à 37°C pendant 10 mn, suivi de l'addition de 10 µl de SBTI (5 mg/ml) : 10 mn à température ambiante. 100 µl de milieu sont aussi testés sans activation par la trypsine (mesure de la forme active de l'enzyme).

Le substrat (10000 cpm/essai) est ajouté, éventuellement en présence d'EDTA 25 mM, le volume final étant de 250 µl.

La réaction se déroule pendant 18 h à 25°C puis est stoppée par addition de 20 µl d'EDTA 250 mM (10 mn à température ambiante). Le mélange est ensuite chauffé 10 mn à 39°C. Le collagène non dégradé est précipité par l'éthanol à la concentration finale de 18 % (30 mn à température ambiante). Finalement, le mélange est centrifugé à 6000 g pendant 30 mn à 4°C. Des aliquots de 200 µl des surnageants sont mélangés avec 5 ml de liquide scintillant aqueux puis comptés pour leur radioactivité. Une unité de collagénase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 µg de collagène natif par heure à 25°C.

L'étude de l'influence des vecteurs vésiculaires intracellulaires selon l'invention et de l'intérêt qu'ils présentent pour la réalisation de milieux de culture et de synthèse du collagène va maintenant être décrite en détail pour chacune des molécules.

#### 5 PALMITATE D' ASCORBYLE

L'incorporation de palmitate d'ascorbyle dans les vecteurs potentialise son action sur la synthèse de collagène par les fibroblastes. En effet la moitié de la dose de palmitate d'ascorbyle (12,5 µg/ml) incorporé aux vecteurs selon l'invention est capable d'induire le même niveau de synthèse de collagène de type I que le double de sa dose (25 µg/ml) sous forme soluble. L'effet du palmitate d'ascorbyle incorporé aux vecteurs selon l'invention est encore plus forte sur la synthèse de collagène de type III.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1 ci-après .

TABLEAU 1

#### 15 Stimulation de la synthèse de collagène par le palmitate d'ascorbyle après 48 h de culture

|                                                                        | Collagène I<br>ng/ml       | Collagène III<br>ng/ml    |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| fibroblastes + vecteurs                                                | 67 ± 13                    | < 20                      |
| 20 fibroblastes + palmitate d'ascorbyle<br>en solution : 12,5 µg/ml    | 668 <sup>a, b</sup> ± 71   | 468 <sup>a, b</sup> ± 41  |
| fibroblastes + vecteurs chargés<br>en palmitate d'ascorbyle 12,5 µg/ml | 950 <sup>a, b</sup> ± 58   | 882 <sup>a, b</sup> ± 64  |
| 25 fibroblastes + palmitate d'ascorbyle<br>en solution 25 µg/ml        | 952 <sup>a, b</sup> ± 81   | 781 <sup>a, b</sup> ± 55  |
| fibroblastes + vecteurs chargés<br>en palmitate d'ascorbyle 25 µg/l    | 1275 <sup>a, b</sup> ± 114 | 1035 <sup>a, b</sup> ± 95 |

<sup>a</sup> Significatif (p < 0,05) par rapport aux fibroblastes + vecteurs (contrôle)

<sup>b</sup> Significatif (p < 0,05) par rapport à la molécule soluble

Ces résultats laissent apparaître tout l'intérêt de l'utilisation de ces vecteurs vésiculaires intracellulaires pour la préparation de milieux de culture permettant une forte production de collagène par les fibroblastes en utilisant une faible dose de palmitate d'ascorbyle.

#### 5 PALMITATE D'HYDROLYSAT DE COLLAGENE

Des peptides de collagène sous forme de palmitate ont été utilisés pour stimuler la synthèse des collagènes de type I et III de même que la synthèse de la collagénase interstitielle (MMP-1)

10 On a pu observer que l'hydrolysat de collagène incorporé dans les vecteurs selon l'invention est moins toxique que sous forme soluble. En effet, une cytotoxicité est détectée à partir d'une dose de 20 µg / ml pour la molécule soluble (Tableau 2).

TABLEAU 2

Analyse de la prolifération des fibroblastes traités avec le Palmitate d'hydrolysat de collagène

| 15               | Forme                  |               |               |                            |                            |                            |
|------------------|------------------------|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                  | µg / ml                |               |               |                            |                            |                            |
|                  | 1                      | 5             | 10            | 20                         | 40                         | 80                         |
| <u>24 heures</u> |                        |               |               |                            |                            |                            |
|                  | Solution 0,486 ± 0,026 | 0,481 ± 0,009 | 0,450 ± 0,009 | 0,290 <sup>a</sup> ± 0,011 | 0,093 <sup>a</sup> ± 0,009 | 0,037 <sup>a</sup> ± 0,004 |
|                  | Vecteur 0,468 ± 0,019  | 0,476 ± 0,014 | 0,478 ± 0,012 | 0,487 <sup>c</sup> ± 0,013 | 0,496 <sup>c</sup> ± 0,015 | 0,493 <sup>c</sup> ± 0,011 |
| <u>48 heures</u> |                        |               |               |                            |                            |                            |
| 20               | Solution 0,488 ± 0,012 | 0,474 ± 0,018 | 0,470 ± 0,008 | 0,138 ± 0,017              | 0,058 <sup>a</sup> ± 0,010 | 0,033 <sup>a</sup> ± 0,008 |
|                  | Vecteur 0,493 ± 0,017  | 0,489 ± 0,007 | 0,494 ± 0,008 | 0,498 <sup>c</sup> ± 0,017 | 0,492 <sup>c</sup> ± 0,013 | 0,482 <sup>c</sup> ± 0,006 |
| <u>72 heures</u> |                        |               |               |                            |                            |                            |
|                  | Solution 0,491 ± 0,010 | 0,492 ± 0,021 | 0,466 ± 0,019 | 0,114 <sup>a</sup> ± 0,007 | 0,043 <sup>a</sup> ± 0,003 | 0,023 <sup>a</sup> ± 0,005 |
| 25               | Vecteur 0,497 ± 0,017  | 0,489 ± 0,016 | 0,491 ± 0,011 | 0,478 <sup>c</sup> ± 0,012 | 0,502 <sup>c</sup> ± 0,021 | 0,479 <sup>c</sup> ± 0,009 |

Les données sont exprimées en densité optique mesurée après traitement sur des cultures contenant 10<sup>4</sup> cellules par puits

<sup>a</sup> significatif (p<0,05) par rapport aux doses les plus faibles

<sup>c</sup> significatif (p< 0,05) par rapport à la molécule sous forme soluble

En ce qui concerne la synthèse du collagène, on a noté qu'à partir d'une dose de 5  $\mu\text{g}$  / ml, l'hydrolysate de collagène stimule de façon significative la synthèse du collagène de type I. Cet effet est observé en utilisant la molécule incorporée aux vecteurs (tableaux 3 et 4)

5

TABLEAU 3

Analyse de la synthèse de collagène de type I par des fibroblastes traités avec le palmitate d'hydrolysate de collagène

| Forme |                  | $\mu\text{g/ml}$          |                             |                             |                               |                               |                               |
|-------|------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|       |                  | 1                         | 5                           | 10                          | 20                            | 40                            | 80                            |
| 10    | <u>24 heures</u> |                           |                             |                             |                               |                               |                               |
|       | Témoin           | 274 $\pm$ 34              | 253 $\pm$ 22                | 228 $\pm$ 8                 | 187 <sup>a</sup> $\pm$ 10     | 160 <sup>a</sup> $\pm$ 15     | 135 <sup>a</sup> $\pm$ 10     |
|       | Solution         | 274 $\pm$ 28              | 211 <sup>a</sup> $\pm$ 12   | 203 <sup>a</sup> $\pm$ 13   | 63 <sup>a,b</sup> $\pm$ 2     | 49 <sup>a,b</sup> $\pm$ 13    | 30 <sup>a,b</sup> $\pm$ 3     |
|       | Vecteur          | 239 $\pm$ 23              | 297 $\pm$ 28                | 213 $\pm$ 20                | 229 <sup>c</sup> $\pm$ 21     | 225 <sup>b,c</sup> $\pm$ 27   | 221 <sup>b,c</sup> $\pm$ 5    |
|       | <u>48 heures</u> |                           |                             |                             |                               |                               |                               |
| 15    | Témoin           | 406 $\pm$ 37              | 360 $\pm$ 11                | 299 <sup>a</sup> $\pm$ 27   | 258 <sup>a</sup> $\pm$ 4      | 207 <sup>a</sup> $\pm$ 5      | 183 <sup>a</sup> $\pm$ 5      |
|       | Solution         | 454 $\pm$ 65              | 358 $\pm$ 13                | 272 <sup>a</sup> $\pm$ 11   | 80 <sup>a,b</sup> $\pm$ 5     | 31 <sup>a,b</sup> $\pm$ 8     | 41 <sup>a,b</sup> $\pm$ 4     |
|       | Vecteur          | 536 <sup>b</sup> $\pm$ 32 | 502 <sup>b,c</sup> $\pm$ 26 | 470 <sup>b,c</sup> $\pm$ 48 | 357 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 16 | 330 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 16 | 304 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 24 |
|       | <u>72 heures</u> |                           |                             |                             |                               |                               |                               |
| 20    | Témoin           | 454 $\pm$ 37              | 383 $\pm$ 25                | 249 <sup>a</sup> $\pm$ 40   | 246 <sup>a</sup> $\pm$ 3      | 232 <sup>a</sup> $\pm$ 8      | 219 <sup>a</sup> $\pm$ 5      |
|       | Solution         | 456 $\pm$ 29              | 353 <sup>a</sup> $\pm$ 9    | 302 <sup>a</sup> $\pm$ 5    | 97 <sup>a,b</sup> $\pm$ 5     | 19 <sup>a,b</sup> $\pm$ 5     | 14 <sup>a,b</sup> $\pm$ 3     |
|       | Vecteur          | 601 $\pm$ 128             | 577 <sup>b,c</sup> $\pm$ 41 | 457 <sup>b,c</sup> $\pm$ 13 | 352 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 20 | 360 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 23 | 325 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 10 |

Les données sont exprimées en ng/ml

<sup>a</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport aux doses plus faibles

<sup>b</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport au témoin

25 <sup>c</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport à la molécule sous forme soluble

TABLEAU 4

Analyse de la synthèse de collagène de type III par des fibroblastes traités avec le palmitate d'hydrolysate de collagène

| Forme |                  | µg/ml                 |                          |                           |                           |                           |                           |
|-------|------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|       |                  | 1                     | 5                        | 10                        | 20                        | 40                        | 80                        |
| 5     | <u>24 heures</u> |                       |                          |                           |                           |                           |                           |
|       | Témoin           | 258 ± 57              | 253 ± 43                 | 183 ± 18                  | 183 ± 30                  | 127 <sup>a</sup> ± 22     | 49 <sup>a</sup> ± 3       |
|       | Solution         | 318 ± 67              | 292 ± 25                 | 277 <sup>b</sup> ± 17     | 25 <sup>a,b</sup> ± 1     | 23 <sup>a,b</sup> ± 2     | 19 <sup>a,b</sup> ± 1     |
|       | Vecteur          | 309 ± 45              | 311 ± 12                 | 261 <sup>c</sup> ± 9      | 255 <sup>c</sup> ± 34     | 211 <sup>b,c</sup> ± 29   | 207 <sup>a,b,c</sup> ± 20 |
| 10    | <u>48 heures</u> |                       |                          |                           |                           |                           |                           |
|       | Témoin           | 498 ± 74              | 260 ± 15                 | 206 <sup>a</sup> ± 30     | 210 <sup>a</sup> ± 10     | 183 <sup>a</sup> ± 21     | 106 <sup>a</sup> ± 6      |
|       | Solution         | 744 ± 123             | 492 <sup>a,b</sup> ± 153 | 12 <sup>a,b</sup> ± 23    | 27 <sup>a,b</sup> ± 1     | 20 <sup>a,b</sup> ± 3     | 25 <sup>a,b</sup> ± 2     |
|       | Vecteur          | 780 <sup>b</sup> ± 76 | 677 <sup>b,c</sup> ± 126 | 65 <sup>b,c</sup> ± 120   | 518 <sup>a,b,c</sup> ± 29 | 382 <sup>a,b,c</sup> ± 48 | 309 <sup>a,b,c</sup> ± 26 |
| 15    | <u>72 heures</u> |                       |                          |                           |                           |                           |                           |
|       | Témoin           | 507 ± 30              | 268 <sup>a</sup> ± 8     | 182 <sup>a</sup> ± 37     | 163 <sup>a</sup> ± 12     | 173 <sup>a</sup> ± 29     | 128 <sup>a</sup> ± 1      |
|       | Solution         | 569 ± 61              | 446 <sup>b</sup> ± 39    | 352 <sup>a,b</sup> ± 44   | 31 <sup>a,b</sup> ± 3     | 18 <sup>a,b</sup> ± 1     | 15 <sup>a,b</sup> ± 2     |
|       | Vecteur          | 680 <sup>b</sup> ± 39 | 793 <sup>b,c</sup> ± 77  | 480 <sup>a,b,c</sup> ± 47 | 415 <sup>a,b,c</sup> ± 33 | 352 <sup>a,b,c</sup> ± 20 | 342 <sup>a,b,c</sup> ± 22 |

Les données sont exprimées en ng/ml

<sup>a</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport aux doses plus faibles

20 <sup>b</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport au témoin

<sup>c</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport à la molécule sous forme soluble

La synthèse du collagène de type III n'est stimulée qu'avec une dose de 10  $\mu\text{g}$  / ml et uniquement lorsque l'hydrolysate de collagène est incorporé aux vecteurs vésiculaires intracellulaires selon l'invention.

Ce même traitement stimule de manière significative la synthèse de collagénase interstitielle (MMP-1) que ce soit sous forme soluble ou sous forme vectoriale . Il faut cependant noter une stimulation significativement plus forte lorsque les molécules sont incorporées dans les vecteurs (tableau 5) .

5 TABLEAU 5  
Dosage de l'activité de la collagénase interstitielle (MMP-1) produite par des  
fibroblastes traités avec le Palmitate d'hydrolysate de collagène

|    | Forme    | $\mu\text{g/ml}$         |                          |                         |
|----|----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|    |          | 1                        | 5                        | 10                      |
| 10 | Solution | 1551 <sup>a</sup> ±110   | 1158 <sup>a</sup> ±152   | 1144 <sup>a</sup> ±41   |
|    | Vecteur  | 2372 <sup>a,b</sup> ±328 | 2463 <sup>a,b</sup> ±167 | 2050 <sup>a,b</sup> ±87 |

Témoin : 438 ± 82

Ces données sont exprimées en mU/ml des surnageants des cultures avec  $4.10^5$  cellules et mesurées après 48 heures de traitement.

15 <sup>a</sup> significatif ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin

<sup>b</sup> significatif ( $p < 0,05$ ) par rapport à la molécule sous forme soluble.

Les résultats ci-dessus laissent apparaître tout l'intérêt de la forme vectoriale pour la préparation de milieux de culture destinés à stimuler la synthèse de collagène de type I et de son enzyme de dégradation (collagénase interstitielle) par les fibroblastes. Les molécules incorporées dans les vecteurs sont en outre moins toxiques

#### PALMITATE D'HYDROXYPROLINE

Le traitement de cultures de fibroblastes avec le palmitate d'hydroxyproline montre que la forme soluble est cytotoxique à partir de 20  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

25 Cependant son incorporation dans les vecteurs vésiculaires intracellulaires selon l'invention élimine cet effet cytotoxique même à une dose de 80  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (tableau 6)

**TABLEAU 6**  
**Analyse de la prolifération des fibroblastes traités avec le Palmitate**  
**d'hydroxyproline**

| Forme            |          | µg / ml       |               |               |                            |                            |                              |
|------------------|----------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 5                | 1        | 5             | 10            | 20            | 40                         | 80                         |                              |
| <u>24 heures</u> |          |               |               |               |                            |                            |                              |
|                  | Solution | 0,493 ± 0,029 | 0,492 ± 0,016 | 0,502 ± 0,019 | 0,457 ± 0,022              | 0,147 <sup>a</sup> ± 0,019 | 0,060 <sup>a</sup> ± 0,022   |
|                  | Vecteur  | 0,483 ± 0,026 | 0,479 ± 0,029 | 0,485 ± 0,033 | 0,502 ± 0,037              | 0,487 <sup>c</sup> ± 0,019 | 0,485 <sup>c</sup> ± 0,023   |
| <u>48 heures</u> |          |               |               |               |                            |                            |                              |
| 10               | Solution | 0,494 ± 0,012 | 0,513 ± 0,025 | 0,511 ± 0,020 | 0,471 ± 0,028              | 0,118 <sup>a</sup> ± 0,018 | 0,060 <sup>a</sup> ± 0,016   |
|                  | Vecteur  | 0,493 ± 0,021 | 0,495 ± 0,025 | 0,487 ± 0,035 | 0,519 ± 0,024              | 0,545 <sup>c</sup> ± 0,021 | 0,556 <sup>a,c</sup> ± 0,022 |
| <u>72 heures</u> |          |               |               |               |                            |                            |                              |
|                  | Solution | 0,490 ± 0,019 | 0,500 ± 0,028 | 0,496 ± 0,017 | 0,414 <sup>a</sup> ± 0,010 | 0,063 <sup>a</sup> ± 0,021 | 0,033 <sup>a</sup> ± 0,012   |
|                  | Vecteur  | 0,505 ± 0,018 | 0,515 ± 0,017 | 0,506 ± 0,020 | 0,498 <sup>c</sup> ± 0,015 | 0,495 <sup>c</sup> ± 0,018 | 0,520 <sup>c</sup> ± 0,022   |

15 Les données sont exprimées en densité optique mesurée après traitement sur des cultures contenant  $10^4$  cellules par puit

<sup>a</sup> significatif ( $p < 0,05$ ) par rapport aux doses plus faibles

<sup>c</sup> significatif ( $p < 0,05$ ) par rapport à la molécule sous forme soluble

La synthèse de collagène est stimulée de façon significative par la forme vectoriale de la molécule à une dose de 10 µg / ml (tableaux 7 et 8).

TABLEAU 7

Analyse de la synthèse de collagène type I par des fibroblastes traités avec le palmitate d'hydroxyproline

5

| Forme            | µg/ml    |                         |                         |                         |                           |                           |
|------------------|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                  | 1        | 5                       | 10                      | 20                      | 40                        | 80                        |
| <u>24 heures</u> |          |                         |                         |                         |                           |                           |
| Témoin           | 246 ± 46 | 275 ± 22                | 292 ± 3                 | 259 ± 8                 | 221 ± 11                  | 145 <sup>a</sup> ± 12     |
| 10 Solution      | 268 ± 18 | 232 ± 10                | 166 <sup>a,b</sup> ± 15 | 128 <sup>a,b</sup> ± 4  | 61 <sup>a,b</sup> ± 8     | 41 <sup>a,b</sup> ± 2     |
| Vecteur          | 266 ± 10 | 288 <sup>c</sup> ± 14   | 253 <sup>c</sup> ± 11   | 251 <sup>c</sup> ± 16   | 184 <sup>a,c</sup> ± 31   | 164 <sup>a,c</sup> ± 7    |
| <u>48 heures</u> |          |                         |                         |                         |                           |                           |
| Témoin           | 487 ± 67 | 518 ± 0                 | 449 ± 57                | 392 ± 22                | 345 <sup>a</sup> ± 18     | 298 <sup>a</sup> ± 15     |
| Solution         | 519 ± 37 | 360 <sup>a,b</sup> ± 42 | 260 <sup>a,b</sup> ± 7  | 227 <sup>a,b</sup> ± 11 | 96 <sup>a,b</sup> ± 6     | 49 <sup>a,b</sup> ± 10    |
| 15 Vecteur       | 528 ± 30 | 605 <sup>c</sup> ± 43   | 423 <sup>c</sup> ± 69   | 421 <sup>a,c</sup> ± 9  | 422 <sup>a,b,c</sup> ± 26 | 401 <sup>a,b,c</sup> ± 18 |
| <u>72 heures</u> |          |                         |                         |                         |                           |                           |
| Témoin           | 431 ± 8  | 446 ± 15                | 446 ± 52                | 499 ± 39                | 368 <sup>a</sup> ± 18     | 297 <sup>a</sup> ± 5      |
| Solution         | 513 ± 77 | 470 ± 5                 | 281 <sup>a,b</sup> ± 15 | 223 <sup>a,b</sup> ± 29 | 73 <sup>a,b</sup> ± 10    | 49 <sup>a,b</sup> ± 3     |
| Vecteur          | 483 ± 46 | 516 ± 78                | 524 <sup>c</sup> ± 17   | 526 <sup>c</sup> ± 90   | 387 <sup>a,c</sup> ± 10   | 354 <sup>a,b,c</sup> ± 20 |

20 Les données sont exprimées en ng/ml

<sup>a</sup> significatif (p > 0,05) par rapport aux doses plus faibles

<sup>b</sup> significatif (p > 0,05) par rapport au témoin

<sup>c</sup> significatif (p > 0,05) par rapport à la molécule sous forme soluble

TABLEAU 8

Analyse de la synthèse de collagène type III par des fibroblastes traités avec le  
palmitate d'hydroxyproline

| 5                | Forme            | $\mu\text{g/ml}$ |                             |                             |                             |                               |                               |
|------------------|------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                  | 1                | 5                | 10                          | 20                          | 40                          | 80                            |                               |
| <u>24 heures</u> |                  |                  |                             |                             |                             |                               |                               |
|                  | Témoin           | 239 $\pm$ 33     | 221 $\pm$ 31                | 224 $\pm$ 17                | 211 $\pm$ 14                | 137 <sup>a</sup> $\pm$ 9      | 81 <sup>a</sup> $\pm$ 10      |
|                  | Solution         | 295 $\pm$ 24     | 281 $\pm$ 16                | 154 <sup>a,b</sup> $\pm$ 13 | 105 <sup>a,b</sup> $\pm$ 6  | 25 <sup>a,b</sup> $\pm$ 2     | 24 <sup>a,b</sup> $\pm$ 4     |
|                  | Vecteur          | 272 $\pm$ 21     | 292 <sup>b</sup> $\pm$ 2    | 290 <sup>b,c</sup> $\pm$ 16 | 313 <sup>b,c</sup> $\pm$ 22 | 215 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 14 | 119 <sup>a,b,c</sup> $\pm$ 10 |
| 10               | <u>48 heures</u> |                  |                             |                             |                             |                               |                               |
|                  | Témoin           | 624 $\pm$ 83     | 528 $\pm$ 47                | 376 <sup>a</sup> $\pm$ 36   | 385 <sup>a</sup> $\pm$ 14   | 369 <sup>a</sup> $\pm$ 23     | 310 <sup>a</sup> $\pm$ 14     |
|                  | Solution         | 588 $\pm$ 69     | 519 $\pm$ 20                | 330 <sup>a</sup> $\pm$ 35   | 253 <sup>a,b</sup> $\pm$ 18 | 36 <sup>a,b</sup> $\pm$ 5     | 18 <sup>a,b</sup> $\pm$ 3     |
|                  | Vecteur          | 699 $\pm$ 117    | 702 <sup>b,c</sup> $\pm$ 14 | 509 <sup>b,c</sup> $\pm$ 65 | 525 <sup>b,c</sup> $\pm$ 14 | 532 <sup>b,c</sup> $\pm$ 91   | 494 <sup>b,c</sup> $\pm$ 20   |
| <u>72 heures</u> |                  |                  |                             |                             |                             |                               |                               |
| 15               | Témoin           | 452 $\pm$ 41     | 450 $\pm$ 46                | 405 $\pm$ 49                | 385 $\pm$ 18                | 313 <sup>a</sup> $\pm$ 29     | 280 <sup>a</sup> $\pm$ 18     |
|                  | Solution         | 628 $\pm$ 161    | 548 $\pm$ 24                | 301 <sup>a</sup> $\pm$ 23   | 240 <sup>a,b</sup> $\pm$ 11 | 29 <sup>a,b</sup> $\pm$ 1     | 24 <sup>a,b</sup> $\pm$ 1     |
|                  | Vecteur          | 519 $\pm$ 108    | 558 <sup>b</sup> $\pm$ 7    | 616 <sup>b,c</sup> $\pm$ 91 | 637 <sup>b,c</sup> $\pm$ 38 | 444 <sup>b,c</sup> $\pm$ 27   | 419 <sup>b,c</sup> $\pm$ 26   |

Les données sont exprimées en ng/ml

<sup>a</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport aux doses plus faibles

20 <sup>b</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport au témoin

<sup>c</sup> significatif ( $p > 0,05$ ) par rapport à la molécule sous forme soluble.

L'activité collagénolytique des fibroblastes est modulée par l'utilisation du palmitate d'hydroxyproline et ses effets sont en relation avec la forme d'utilisation : vectoriale ou soluble. La forme soluble stimule de manière significative la synthèse de la collagénase même avec une dose de 1  $\mu\text{g}$  / ml . Par contre l'utilisation de la

5 forme vectoriale du palmitate d'hydroxyproline réduit progressivement, de façon dépendante, la synthèse de collagénase (tableau 9).

TABLEAU 9

Dosage de l'activité de la collagénase interstitielle (MMP-1) produite par des fibroblastes traités avec le Palmitate d'hydroxyproline

| 10 | Forme    | $\mu\text{g/ml}$          |                          |                         |
|----|----------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
|    |          | 1                         | 5                        | 10                      |
|    | Solution | 1273 <sup>a</sup> ± 154   | 1934 <sup>a</sup> ± 49   | 2189 <sup>a</sup> ± 118 |
|    | Vecteur  | 1648 <sup>a,b</sup> ± 166 | 1090 <sup>a,b</sup> ± 66 | 604 <sup>a</sup> ± 101  |

Témoin : 438 ± 82

15 Ces données sont exprimées en mU/ml des surnageants des cultures avec  $4 \cdot 10^5$  cellules et mesurées après 48 heures de traitement.

<sup>a</sup> significatif ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin

<sup>b</sup> significatif ( $p < 0,05$ ) par rapport à la molécule sous forme soluble.

20 La forme vectoriale permet donc de préparer des milieux de culture avec le palmitate d'hydroxyproline incorporé dans les vecteurs vésiculaires intracellulaires selon l'invention pour stimuler la synthèse de collagène sans stimuler la synthèse de collagénase.

On a pu enfin déterminer l'intérêt de l'utilisation, comme modulateurs de la synthèse cellulaire, de peptides dérivés de l'élastine.

25 Les milieux de culture selon l'invention trouvent en particulier des applications intéressantes dans la production de peptides de la matrice extracellulaire et la production de peptides à activité enzymatique.

### REVENDEICATIONS

1 - Milieux synthétiques pour la culture cellulaire, caractérisés en ce qu'ils contiennent des vecteurs vésiculaires intracellulaires comportant des ligands métaboliques aptes à s'exprimer à l'intérieur et à l'extérieur de leur structure.

5 2 - Milieux de synthèse et de culture cellulaire selon la revendication 1 caractérisés en ce que les vecteurs sont des vecteurs intracellulaires d'affinité spécifique dont la composition membranaire, modifiée par introduction de ligands métaboliques, entraîne une modulation de l'activité de synthèse de la cellule ciblée .

10 3 - Milieux de synthèse et de culture selon la revendication 2 caractérisés en ce que les ligands métaboliques sont choisis parmi les initiateurs et les modulateurs de la synthèse cellulaire dotés de fonction ou radical lipophile par acylation.

4 -Milieux de synthèse et de culture selon la revendication 2 et la revendication 3, caractérisés en ce que les initiateurs de la synthèse cellulaire sont choisis parmi les esters gras de l'acide ascorbique et notamment son palmitate.

15 5 - Milieux de synthèse et de culture selon la revendication 2 et la revendication 3, caractérisés en ce que le modulateur de la synthèse cellulaire est le palmitate d'hydrolysate de collagène.

20 6 - Milieux de synthèse et de culture selon la revendication 2 et la revendication 3, caractérisés en ce que les modulateurs de la synthèse cellulaire sont choisis parmi les esters gras de l'hydroxyproline et plus spécialement son palmitate.

25 7 - Milieux de synthèse et de culture selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que les vecteurs vésiculaires sont choisis parmi les vésicules, capsules ou sphères artificielles d'un diamètre qui peut aller de 30 à 1000 nanomètres, mis en oeuvre pour incorporer une substance active soit dans un milieu aqueux remplissant le volume intérieur du vecteur soit dans la paroi même dudit vecteur puis pour transporter cette substance active vers un site où elle sera libérée et utilisée à différentes fins.

30 8 - Application des milieux de culture selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 à la production de peptides de la matrice extracellulaire.

9 - Application des milieux de culture selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 à la production de peptides à activité enzymatique.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

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

N° d'enregistrement  
national

FR 9112598  
FA 462850

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                             | Revendications<br>concernées<br>de la demande<br>examinée |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes                                                                                                                                                                                          |                                                           |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | FR-A-2 540 381 (PARFUMS CHRISTIAN DIOR)<br>* revendications *                                                                                                                                                                                                               | 1-3, 7-9                                                  |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | ---                                                                                                                                                                                                                                                                         | 4-6                                                       |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | EP-A-0 160 286 (TERUMO CORPORATION)<br>* page 5, ligne 25 - page 6, ligne 6;<br>revendications *                                                                                                                                                                            | 4                                                         |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | WO-A-8 706 460 (L'OREAL)<br>* revendications *                                                                                                                                                                                                                              | 5, 6                                                      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | EP-A-0 424 282 (ERPHAR)<br>* revendication 5 *                                                                                                                                                                                                                              | 6                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | MATRIX<br>vol. 10, no. 6, Décembre 1990, STUTTGART,<br>ALLEMAGNE<br>pages 373 - 377;<br>H. EMONARD ET AL.: 'Reconstituted basement<br>membrane matrix stimulates interstitial<br>procollagenase synthesis by human fibroblasts in<br>culture.'<br>* le document en entier * | 1-9                                                       |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                             | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int. Cl.5)             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                             | C12N<br>A61K                                              |
| Date d'achèvement de la recherche<br>27 MAI 1992                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             | Examinateur<br>NOOIJ F.J.M.                               |
| <p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br/>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>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.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons<br/>.....<br/>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                           |