

(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 Serrar Mostafa.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Monnier Brevets d'Invention.

(54) Vecteurs vésiculaires intracellulaires et leurs applications en cosmétique.

(57) Ces vecteurs vésiculaires intracellulaires sont des vecteurs intracellulaires d'affinité spécifique du fibroblaste dont la composition membranaire, modifiée par introduction de ligands métaboliques, entraîne une modulation de l'activité de synthèse de la cellule ciblée.

Les ligands métaboliques sont choisis parmi les initiateurs et les modulateurs de la synthèse cellulaire dotés de fonction ou radical lipophile par acylation.

Les vecteurs 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 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.

Ces vecteurs vésiculaires trouvent des applications dans les compositions cosmétiques destinées au raffermissement du tissu cutané ainsi que dans les compositions cosmétiques destinées au traitement des petites cicatrices indurées et des ridules et dans les compositions cosmétiques destinées à provoquer un renforcement de la couche épithéliale.



VECTEURS VESICULAIRES INFRACELLULAIRES ET LEURS APPLICATIONS EN COSMETIQUE

La présente invention concerne des vecteurs vésiculaires infracellulaires, ainsi que leur application dans les compositions cosmétiques.

On sait que l'abondance de la matrice extracellulaire qui sépare les constituants cellulaires est l'une des caractéristiques du tissu conjonctif. Cette

- 5 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

- 10 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.

- Une très grande variété des molécules qui composent la matrice 15 extracellulaire (collagènes, protéoglycans et glycoprotéines) sont par ailleurs synthétisées 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 20 trois chaînes peptidiques en triple hélice alpha. Dans la partie hélicoïdale, une séquence d'amino-acide 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 25 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 30 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).

- 2 -

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 cosmétique.

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 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.

Un grand nombre de drogues ou molécules 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 par les fibroblastes : l'acide ascorbique (Chojkier et coll - Jol of Biological Chemistry - Oct. 5,1989 p. 16957 - 16962), les cytokines comme l'interleukine-1, le facteur de croissance dérivé des plaquettes(PDGF) (Kovacs), les peptides dérivés du collagène (Pacini et coll. Res. Comm. in Chemical Pathology and Pharmacology - Avril 1990 p. 89-101).

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 Jol of Investigative Dermatology suppl. déc.1990) et Kovacs.

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.

- 3 -

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

Les vecteurs vésiculaires infracellulaires selon l'invention, qui comportent 5 des ligands métaboliques aptes à s'exprimer à l'intérieur et à l'extérieur de leur structure, sont caractérisés en ce qu'ils sont des vecteurs d'affinité spécifique du fibroblaste dont la composition membranaire, modifiée par introduction de ligands métaboliques, entraîne une modulation de l'activité de synthèse de la cellule ciblée.

Les inventeurs ont constaté de façon surprenante que l'utilisation de ces 10 vecteurs vésiculaires infracellulaires permettait d'ajouter au milieu de culture des éléments nutritifs n'intervenant ni dans le pH ni dans l'expression de la pression osmotique.

Dans la présente description, le terme vecteur vésiculaire (ou pour simplifier "vecteurs") s'appliquera à tous vésicules, capsules ou sphères artificielles d'un 15 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.

Les vecteurs vésiculaires selon l'invention sont de préférence obtenus par 20 mise en oeuvre du procédé et du dispositif décrits dans FR - A - 89 09 275 du 5 Juillet 1989

Ce procédé repose sur l'utilisation d'un phénomène très particulier que l'on pourrait appeler "coup de bélier". Ce phénomène apparaît lorsqu'une veine liquide s'écoule très rapidement au sein d'un conduit rigide. L'écoulement rapide engendre 25 des zones de surpressions et des zones de dépressions très intenses.

Les zones de dépressions correspondent à des zones de cavitation. Ce phénomène apparaît aussi de manière ponctuelle et transitoire lorsque le fluide subit de brutales variations de débit. Dans ce cas, l'écoulement n'étant pas continu, il n'est pas possible d'entretenir le phénomène de cavitation et, quand un solide se 30 déplace à très grande vitesse au sein d'un liquide, on ne dispose pas de zones d'hyperpression. La succession de zones d'hyperpression et de zones de cavitation au sein de la veine liquide permet la synthèse des membranes vectoriales sans avoir recours à l'utilisation de solvant organique ou de chauffage pour inclure des substances lipidiques ou insolubles.

- 4 -

En effet, les zones d'hyperpression permettent de réaliser la fonte du matériel membranaire, d'une façon un peu similaire à celle utilisée lors de la formation des pastilles pour l'observation infrarouge. Les zones de cavitation assurent la sphérisation du matériel membranaire autour des bulles de gaz qui 5 apparaissent au sein du liquide. On peut ainsi arriver à des taux d'encapsulation très élevés car les composés à encapsuler pourront servir de germes à l'apparition des bulles de gaz et seront donc préférentiellement insérés dans la vacuité vectoriale.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les ligands 10 métaboliques sont choisis 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'hydrolysat 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 15 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 du collagène modifié pour une meilleure encapsulation et d'éléments 20 précurseurs de la synthèse du collagène.

Les inventeurs ont découvert que ces vecteurs vésiculaires trouvaient des applications nouvelles et originales dans le contrôle de la synthèse du collagène par les fibroblastes et tout spécialement comme vecteurs de compositions cosmétiques destinées à obtenir un meilleur raffermissement du tissu cutané.

25 Ces vecteurs vésiculaires trouvent également des applications comme vecteurs de compositions cosmétiques destinées au traitement des petites cicatrices indurées et des ridules, ainsi que comme vecteurs de compositions cosmétiques destinées à provoquer un renforcement de la couche épithéliale.

Selon l'invention l'utilisation des vecteurs vésiculaires cités plus haut en tant 30 que vecteurs de molécules bioactives aptes à stimuler la synthèse des collagènes par 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 ; ceci présente un intérêt considérable notamment dans l'application de ces vecteurs en cosmétique.

- 5 -

Dans les expériences décrites ci-après on a utilisé plus spécifiquement le palmitate d'ascorbyle, des peptides dérivés du collagène, le palmitate d'hydroxyproline pour stimuler la synthèse du collagène ou de la collagénase.

Les résultats des essais présentés ci-après ont été obtenus selon la 5 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).

10 Les subcultures sont réalisées par trypsination (Trypsin-EDTA, Gibco). Les cellules sont utilisées du 2e au 10e 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 15 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 inclue 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. 20 Puis on ajoute le sel de tétrazolium 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.

25 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 30 100 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.

- 6 -

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, 5 en solution dans CH₃COOH 0,1 M est neutralisé à pH 7,4 par du Tris 1 M et dilué avec le tampon NaCl 0,15 M/CaCl₂, 4 mM/Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contenant du NEM 0,5 mM et du PMSF 0,1mM à raison de 1000cpm/100µl substrat (= 10000 cpm/essai).

b) Dosage de la collagénase : 100 µl de milieu sont activés par 10 µl de 10 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 15 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 20 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 infracellulaires selon 25 l'invention va maintenant être décrite en détail pour chaque molécule.

PALMITATE D' ASCORBYLE

L'incorporation d'acide ascorbique sous forme de palmitate dans les vecteurs potentialise son action sur la synthèse de collagène par les fibroblastes.

On a pu en effet déterminer que la moitié de la dose de palmitate 30 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

- 7 -

sa dose (25 μ g/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

5. Stimulation de la synthèse de collagène par le palmitate d'ascorbyle après 48 heures de culture

		Collagène I ng/m	Collagène III ng/m
	fibroblastes + vecteurs	67 \pm 13	< 20
10	fibroblastes + palmitate d'ascorbyle en solution : 12,5 μ g/ml	668 a, b \pm 71	468 a,b \pm 41
	fibroblastes + vecteurs chargés en palmitate d'ascorbyle 12,5 μ g/ml	950 a,b \pm 58	882 a,b \pm 64
15	fibroblastes + palmitate d'ascorbyle en solution 25 μ g/ml	952 a,b \pm 81	781 a,b \pm 55
	fibroblastes + vecteurs chargés en palmitate d'ascorbyle 25 μ g/l	1275 a,b \pm 114	1035a,b \pm 95

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

b Significatif ($p < 0,05$) par rapport à la molécule soluble.

- 20 Ces résultats laissent apparaître tout l'intérêt de l'utilisation de ces vecteurs vésiculaires infracellulaires pour la préparation de produits cosmétiques visant à stimuler la synthèse de collagène afin d'obtenir un meilleur raffermissement de la peau. On remarque également que le produit en phase vectoriale permet, pour une quantité plus faible de principe actif, d'obtenir un effet similaire.

- 8 -

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). On a pu observer que l'hydrolysat de collagène 5. incorporé dans les vecteurs vésiculaires selon l'invention est moins毒 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 10 collagène

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

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

^a significatif ($p < 0,05$) par rapport aux doses les plus faibles

25 ^c 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 µg / ml, l'hydrolysat de collagène stimule de façon significative la synthèse du collagène de type I et de type III. Cet effet est observé en utilisant la molécule incorporée aux vecteurs vésiculaires (tableaux 3 et 4).

- 9 -

TABLEAU 3

ANALYSE DE LA SYNTHESE DE COLLAGENE DE TYPE I PAR DES
FIBROBLASTES TRAITES AVEC LE PALMITATE D'HYDROLYSAT DE COLLAGENE

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

Les données sont exprimées en ng/ml

^a significatif ($p > 0,05$) par rapport aux doses plus faibles^b significatif ($p > 0,05$) par rapport au témoin^c significatif ($p > 0,05$) par rapport à la molécule sous forme soluble

- 10 -

TABLEAU 4

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

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

Les données sont exprimées en ng/ml

^a significatif ($p > 0,05$) par rapport aux doses plus faibles20 ^b significatif ($p > 0,05$) par rapport au témoin^c 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et uniquement lorsque l'hydrolysat de collagène est incorporé aux vecteurs vésiculaires infracellulaires selon l'invention.

- 11 -

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 vésiculaires (tableau 5).

5

TABLEAU 5

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

	Forme	μg/ml		
		1	5	10
10	Solution	1551 ^a ±110	1158 ^a ±152	1144 ^a ±41
	Vecteur	2372 ^{a,b} ±328	2463 ^{a,b} ±167	2050 ^{a,b} ±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 ^a significatif ($p < 0,05$) par rapport au témoin

^b 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 l'obtention de produits cosmétiques permettant la simulation de la synthèse collagénique et du renouvellement de la matrice extracellulaire du derme (synthèse 20 de collagène et synthèse de collagénase) et notamment le raffermissement de la peau d'individus âgés. De plus les molécules incorporées dans les vecteurs vésiculaires infracellulaires sont moins toxiques.

- 12 -

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 µg / ml.

Cependant son incorporation dans les vecteurs élimine cet effet cytotoxique
5 même à une dose de 80 µg / ml (tableau 6) .

TABLEAU 6

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

Forme	µg / ml					
10	1	5	10	20	40	80

24 heures

Solution $0,493 \pm 0,029$ $0,492 \pm 0,016$ $0,502 \pm 0,019$ $0,457 \pm 0,022$ $0,147^a \pm 0,019$ $0,060^a \pm 0,022$
Vecteur $0,483 \pm 0,026$ $0,479 \pm 0,029$ $0,485 \pm 0,033$ $0,502 \pm 0,037$ $0,487^c \pm 0,019$ $0,485^c \pm 0,023$

48 heures

15 Solution $0,494 \pm 0,012$ $0,513 \pm 0,025$ $0,511 \pm 0,020$ $0,471 \pm 0,028$ $0,118^a \pm 0,018$ $0,060^a \pm 0,016$
Vecteur $0,493 \pm 0,021$ $0,495 \pm 0,025$ $0,487 \pm 0,035$ $0,519 \pm 0,024$ $0,545^c \pm 0,021$ $0,556^{a,c} \pm 0,022$

72 heures

Solution $0,490 \pm 0,019$ $0,500 \pm 0,028$ $0,496 \pm 0,017$ $0,414^a \pm 0,010$ $0,063^a \pm 0,021$ $0,033^a \pm 0,012$
Vecteur $0,505 \pm 0,018$ $0,515 \pm 0,017$ $0,506 \pm 0,020$ $0,498^c \pm 0,015$ $0,495^c \pm 0,018$ $0,520^c \pm 0,022$

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

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

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

- 13 -

La synthèse de collagène type I et III 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 SYNTHESE DE COLLAGENE TYPE I PAR DES FIBROBLASTES
5 TRAITES AFEC LE PALMITATE D'HYDROXYPROLINE

	Forme	µg/ml					
		1	5	10	20	40	80
<u>24 heures</u>							
10	Témoin	246 ± 46	275 ± 22	292 ± 3	259 ± 8	221 ± 11	145 ^a ± 12
	Solution	268 ± 18	232 ± 10	166 ^{a,b} ± 15	128 ^{a,b} ± 4	61 ^{a,b} ± 8	41 ^{a,b} ± 2
	Vecteur	266 ± 10	288 ^c ± 14	253 ^c ± 11	251 ^c ± 16	184 ^{a,c} ± 31	164 ^{a,c} ± 7
<u>48 heures</u>							
15	Témoin	487 ± 67	518 ± 0	449 ± 57	392 ± 22	345 ^a ± 18	298 ^a ± 15
	Solution	519 ± 37	360 ^{a,b} ± 42	260 ^{a,b} ± 7	227 ^{a,b} ± 11	196 ^{a,b} ± 6	49 ^{a,b} ± 10
	Vecteur	528 ± 30	605 ^c ± 43	423 ^c ± 69	421 ^{a,c} ± 9	422 ^{a,b,c} ± 26	401 ^{a,b,c} ± 18
<u>72 heures</u>							
20	Témoin	431 ± 8	446 ± 15	446 ± 52	499 ± 39	368 ^a ± 18	297 ^a ± 5
	Solution	513 ± 77	470 ± 5	281 ^{a,b} ± 15	223 ^{a,b} ± 29	73 ^{a,b} ± 10	49 ^{a,b} ± 3
	Vecteur	483 ± 46	516 ± 78	524 ^c ± 17	526 ^c ± 90	387 ^{a,c} ± 10	354 ^{a,b,c} ± 20
Les données sont exprimées en ng/ml							
	^a	significatif (p > 0,05) par rapport aux doses plus faibles					
	^b	significatif (p > 0,05) par rapport au témoin					
	^c	significatif (p > 0,05) par rapport à la molécule sous forme soluble					

- 14 -

TABLEAU 8Analyse 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 ^a \pm 9	81 ^a \pm 10
Solution	295 \pm 24	281 \pm 16	154 ^{a,b} \pm 13	105 ^{a,b} \pm 6	25 ^{a,b} \pm 2	24 ^{a,b} \pm 4
Vecteur	272 \pm 21	292 ^b \pm 2	290 ^{b,c} \pm 16	313 ^{b,c} \pm 22	215 ^{a,b,c} \pm 14	119 ^{a,b,c} \pm 10
<u>10</u> <u>48 heures</u>						
Témoin	624 \pm 83	528 \pm 47	376 ^a \pm 36	385 ^a \pm 14	369 ^a \pm 23	310 ^a \pm 14
Solution	588 \pm 69	519 \pm 20	330 ^a \pm 35	253 ^{a,b} \pm 18	36 ^{a,b} \pm 5	18 ^{a,b} \pm 3
Vecteur	699 \pm 117	702 ^{b,c} \pm 14	509 ^{b,c} \pm 65	525 ^{b,c} \pm 14	532 ^{b,c} \pm 91	494 ^{b,c} \pm 20
<u>72 heures</u>						
15 Témoin	452 \pm 41	450 \pm 46	405 \pm 49	385 \pm 18	313 ^a \pm 29	280 ^a \pm 18
Solution	628 \pm 161	548 \pm 24	301 ^a \pm 23	240 ^{a,b} \pm 11	29 ^{a,b} \pm 1	24 ^{a,b} \pm 1
Vecteur	519 \pm 108	558 ^b \pm 7	616 ^{b,c} \pm 91	637 ^{b,c} \pm 38444 ^{b,c} \pm 27	419 ^{b,c} \pm 26	

Les données sont exprimées en ng/ml

^a significatif ($p > 0,05$) par rapport aux doses plus faibles^b significatif ($p > 0,05$) par rapport au témoin^c 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

25 de la collagénase même avec une dose de 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (tableau 9). Par contre l'utilisation de la forme vectoriale du palmitate d'hydroxyproline réduit progressivement, de façon dépendante, la synthèse de collagénase .

- 15 -

TABLEAU 9

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

Forme	μg/ml		
5	1	5	10
Solution	1273 ^a ± 154	1934 ^a ± 49	2189 ^a ± 118
Vecteur	1648 ^{a,b} ± 166	1090 ^{a,b} ± 66	604 ^a ± 101

Témoin : 438 ± 82

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

^a significatif ($p < 0,05$) par rapport au témoin

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

15 La forme vectoriale permet donc l'obtention de produits cosmétiques visant à stimuler la synthèse de collagène afin d'obtenir un meilleur raffermissement de la peau. Ce produit (vecteur vésiculaire / acide ascorbique) serait plus actif à faibles doses.

- 16 -

REVENDICATIONS

- 1 - Vecteurs vésiculaires infracellulaires comportant des ligands métaboliques aptes à s'exprimer à l'intérieur et à l'extérieur de leur structure, caractérisés en ce qu'ils sont des vecteurs infracellulaires d'affinité spécifique du fibroblaste dont la composition membranaire, modifiée par introduction de ligands
- 5 - métaboliques, entraîne une modulation de l'activité de synthèse de la cellule ciblée.
- 2 - Vecteurs selon la revendication 1 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.
- 3 - Vecteurs selon la revendication 1 et la revendication 2, caractérisés en
- 10 - ce que les initiateurs de la synthèse cellulaire sont choisis parmi les esters gras de l'acide ascorbique et plus spécialement son palmitate.
- 4 - Vecteurs selon la revendication 1 et la revendication 2, caractérisés en ce que le modulateur de la synthèse cellulaire est le palmitate d'hydrolysat de collagène.
- 15 - 5 - Vecteurs selon la revendication 1 et la revendication 2, caractérisés en ce que les modulateurs de la synthèse cellulaire sont choisis les esters gras de l'hydroxyproline et plus spécialement son palmitate.
- 6 - Vecteurs vésiculaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce qu'ils 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.
- 25 - 7 - Application des vecteurs vésiculaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans les compositions cosmétiques destinées au raffermissement du tissu cutané.
- 8 - Application des vecteurs vésiculaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans les compositions cosmétiques destinées au traitement
- 30 - des petites cicatrices indurées et des ridules.
- 9 - Application des vecteurs vésiculaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans les compositions cosmétiques destinées à provoquer un renforcement de la couche épithéliale.

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 9112597
FA 462213

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 160 286 (TERUMO K.K.) * Le document en entier * ---	1-3, 6, 7
X	WO-A-8 706 460 (L'OREAL)(VERSION CORRIGEE) * Le document en entier * ---	1, 2, 4-7 , 9
X	EP-A-0 424 282 (ERPHAR) * Page 2, lignes 50-52; revendications 1, 5 * -----	1, 2, 4-7 , 9
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)
		A 61 K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
17-06-1992		COUCKUYT P.J.R.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		