

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
13 décembre 2012 (13.12.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/168585 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/07 (2010.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2012/050282

(22) Date de dépôt international :

9 février 2012 (09.02.2012)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1151090 10 février 2011 (10.02.2011) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I** [FR/FR]; 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR). **HOSPICES CIVILS DE LYON** [FR/FR]; 3 Quai Des Celestins, F-69229 Lyon Cedex 02 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **DIOUF, El-hadji** [SN/FR]; 9 Allée des Acacias, F-69200 Venissieux (FR). **DESPIAU, Marie-Claire** [FR/FR]; 114 Bd de la République, F-92210 Saint-cloud (FR). **PIVOT, Christine** [FR/FR]; 10 rue de la Lozère, F-69200 Venissieux (FR). **PIROT, Fabrice** [FR/FR]; 9 Rue Crillon, F-69006 Lyon (France) (FR). **TALL, Mamadou lamine** [GN/FR]; 18 rue Thomas Blanchet, F-69008 Lyon (FR). **DAMOUR, Odile** [FR/FR]; 32 rue C Luizet, F-69230 Saint Genis Laval (FR).

(74) Mandataire : **SARLIN, Laure**; Cabinet Beau de Lomenie, 51 Avenue Jean Jaures, BP7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

(54) Title : COMPOSITION FOR SUPPLEMENTING CELL CULTURE MEDIA

(54) Titre : COMPOSITION POUR SUPPLEMENTER DES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

(57) Abstract : The present invention relates to a composition for supplementing an epithelial cell culture medium including triiodo-L-thyronine (T3) sodium, an alkaline hydroxide, a C1-C3 alcohol, and water, as well as to the use of such a composition for supplementing an epithelial cell culture medium.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition destinée à compléter un milieu de culture de cellules épithéliales comprenant de la Triiodo-L-thyronine (T3) sodique, un hydroxyde alcalin, un alcool en C1-C3 et de l'eau, ainsi que l'utilisation d'une telle composition pour compléter un milieu de culture de cellules épithéliales.



WO 2012/168585 A1

COMPOSITION POUR SUPPLEMENTER DES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

La présente invention concerne le domaine technique des milieux de culture cellulaire, et en particulier des milieux de culture de cellules épithéliales.

La Triiodo-L-thyronine (T3) sodique correspond au nom IUPAC : sel de sodium de l'acide (2S)-2-amino-3- [4-(4-hydroxy-3-iodo-phénoxy)- 3,5-diiodo-phényl]propanoïque et au numéro CAS : 55-06-1. La T3 est utilisée dans différentes spécialités pharmaceutiques : des comprimés contenant de la T3 sont notamment commercialisés pour le traitement d'urgence ou de courte durée de l'hypothyroïdie ou dans le traitement d'appoint d'autres affections de la thyroïdie. La société Goldshield commercialise un lyophilisat de T3 sodique de Dextran 110 et d'hydroxyde de sodium qui doit être reconstitué dans de l'eau PPI, juste avant administration par voie parentérale.

La T3 a également été préconisée pour son intérêt dans des milieux de culture comme le milieu de Green permettant de cultiver en série des cellules épithéliales. De telles applications sont notamment décrites dans :

- Safer JD, Crawford TM, Fraser LM, Hoa M, Ray S, Chen TC, Persons K, Holick MF. Thyroid hormone action on skin: diverging effects of topical versus intraperitoneal administration : Thyroid, 2003 Feb; 13 (2) : 159-65).
- Simon M, Green H. Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro. Cell. 1985 Mar;40(3):677-83.
- Formanek M et al In J Oral Maxillofac. In vitro approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. Urg. 1996, Apr 25 (2) : 157-160
- Mossman BT. Environ Health Perspect. 1983 Nov;53:155-61. Review.

La composition du milieu Green est donnée dans la **TABLEAU 1** ci-après :

TABEAU 1

	Concentrations		Volume pour un volume final de milieu	
	aliquots	milieu final	de 100 ml	de 500 ml
DMEM /glutamax Gibco			58 ml	290 ml
HAM F12 Gibco			30 ml	150 ml
Sérum de Veau FetalClone II Hyclone			10 ml	50 ml
Hydrocortisone Upjohn	0,2 mg/ml	0,4 µg/ml	200 µl	1 ml
Umuline® Lilly	100 UI/ml	0,12 UI/ml	120 µl	600 µl
Isuprel® Abbott	0,2 mg/ml	0,4 µg/ml	200 µl	1 ml
Tri Iodo Thyronine	2×10^{-6} M	2×10^{-9} M	100 µl	500 µl
Adénine Sigma	2,43 mg/ml	24,3 µg/ml	1 ml	5 ml
Pénicilline G 1MU Panpharma	200 000 UI/ml	100 UI/ml	50 µl	250 µl
<i>Streptomycine poudre pour préparation injectable en 1g Panpharma</i>	200 mg/ml	100 µg/ml	50 µl	250 µl
Amphotéricine B Bristol Myers Squibb	1 mg/ml	1 µg/ml	100 µl	500 µl
EGF* Austral biologicals	10 µg/ml	10 ng/ml	100 µl	500 µl

Dans le cadre d'études internes, la demanderesse a tout d'abord développée une solution prête à l'emploi de T3 sodique dans une solution saline tamponnée avec des phosphates (PBS de l'anglais « phosphate buffered saline »). Une telle solution ne s'est pas montrée satisfaisante, en termes de stabilité.

Dans ce contexte, la présente invention se propose de fournir une solution aqueuse de T3 sous la forme d'un sel de sodium, qui soit prête à l'emploi pour compléter un milieu de culture donné. Une telle solution se doit d'être stable, dans des conditions de température, notamment appartenant à la gamme 2-8°C, voire même à température ambiante (25°C), afin de faciliter son stockage et son utilisation.

La composition proposée dans le cadre de l'invention se doit également de pouvoir être préparée facilement et à un coût de revient non prohibitif.

Le but de la composition selon l'invention étant de compléter des milieux de culture plus simples, déjà connus ou qui seront développés dans le futur, ses composants autres que la T3 sodique doivent être compatibles avec un milieu de culture cellulaire, et en particulier un milieu de culture de
5 cellules épithéliales.

La présente invention a pour objet une composition pour compléter un milieu de culture de cellules épithéliales, comprenant de la Triiodo-L-thyronine (T3) sodique, un hydroxyde alcalin, un alcool en C₁-C₃ et de l'eau.

A titre d'exemple d'hydroxyde alcalin, on peut citer les hydroxydes de
10 lithium, sodium, potassium, rubidium, césium ou francium. L'hydroxyde alcalin a pour fonction d'aider à la solubilisation de la T3 sodique dans une solution aqueuse. Selon un mode de réalisation particulier, l'hydroxyde alcalin est de l'hydroxyde de sodium. De façon avantageuse, le rapport (m/m) T3 sodique/hydroxyde de sodium dans la composition appartient à la
15 gamme allant de 0,17/100 à 3,40/100, et est de préférence égal à 0,34/100.

A titre d'exemples d'alcool en C₁-C₃ (c'est-à-dire comprenant de 1 à 3 atomes de carbone), on peut citer le méthanol, l'éthanol, le *n*-propanol ou l'*iso*-propanol. La fonction de l'alcool est de stabiliser la solution obtenue, en combinaison avec l'hydroxyde alcalin. Selon un mode de réalisation
20 particulier pouvant être combiné aux précédents, l'alcool est le méthanol. De façon avantageuse, le rapport (m/v) T3 sodique/méthanol appartient à la gamme allant de 0,068/100 à 5,440/100, et est de préférence égal à 0,272/100.

La composition selon l'invention se présente sous la forme d'une
25 solution aqueuse. De façon avantageuse, le rapport (m/v) T3 sodique/eau appartient à la gamme allant de 0,068/100 à 5,440/100, et est de préférence égal à 0,272/100.

Compte tenu de son application, la composition selon l'invention est stérile et apyrogène. Pour obtenir une composition stérile, l'ensemble des
30 composants utilisés peuvent être stériles et/ou une étape de filtration stérilisante en système clos pourra être mise en œuvre.

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne l'utilisation d'une composition telle que précédemment définie pour compléter un milieu de culture de cellules épithéliales.

L'invention a également pour objet un procédé de culture de cellules
5 épithéliales, dans lequel on ajoute, à un milieu de culture initial, une composition telle que précédemment définie, puis on cultive des cellules épithéliales, dans le milieu de culture modifié obtenu. La composition selon l'invention est, par exemple, ajoutée en quantité telle pour avoir dans le milieu de culture modifié obtenu, une concentration en T3 sodique
10 appartenant à la gamme allant de 0,68 µg/L à 27,2 µg/L, de préférence, pour avoir une concentration égale à 1,36 µg/L.

Le milieu de culture initial peut être tout milieu de culture utilisé pour la culture de cellules épithéliales. A titre d'exemple, on peut citer un milieu qui après avoir été complété avec la composition selon l'invention correspond
15 sensiblement au milieu Green. De tels milieux comprennent, en général :

- au moins un oligo ou polysaccharide, par exemple choisi parmi glucose, fructose, galactose, mannose
- au moins un sel minéral, par exemple choisi parmi sels de sodium, potassium, calcium, magnésium, fer, zinc, cobalt, cuivre
- 20 - au moins un acide aminé naturel,
- au moins une vitamine et/ou un agent antioxydant, par exemple choisi parmi la biotine, le pantothénate de calcium, le chlorure de choline, l'acide folique, l'inositol, la nicotinamide, la pyridoxine, la riboflavine, la thiamine et la vitamine B12,
- 25 - éventuellement au moins un facteur de croissance, par exemple choisi parmi l'EGF (facteur de croissance épidermique de l'anglais « Epidermal Growth Factor ») et l'adénine
- éventuellement un ou plusieurs antibiotiques, antifongiques ou agents antibactériens.

30 La composition selon l'invention pourra être utilisée pour compléter des milieux de culture de cellules épithéliales. Cette composition est adaptée à la culture en série des kératinocytes, comme des cellules épidermiques

humaines, des kératinocytes de tératomes. La culture en série de cellules épithéliales pourra notamment être réalisée pour produire des colonies et éventuellement un épithélium squameux stratifié. Le procédé selon l'invention permet, notamment, de produire des cellules épidermiques qui peuvent être utilisées dans le traitement des brûlures ou encore pour tester les effets sur la peau d'actifs pharmaceutiques, dermatologiques ou cosmétiques.

Les exemples ci-après, en référence aux figures annexées, permettent d'illustrer l'invention, mais n'ont aucun caractère limitatif. Les **Figures 1** et **2** étudient la stabilité de différentes compositions au cours du temps.

Deux solutions diluées de T3 sodique prêtes à l'emploi ont été préparées et testées pour évaluer la stabilité de la T3 sodique comme suit :

1. Fabrication d'une solution concentrée de T3 sodique dans un flacon verre brun, à l'abri de la lumière :

Composition qualitative et quantitative

T3 sodique68 mg

NaOH 0,02M.....7,5 ml

Eau ppi quantité suffisante pour..... 500 ml

C = 200 μ M soit **136 mg/L**

Lors de la fabrication, la verrerie est protégée de la lumière. Dans un bécher en verre contenant 68 mg de T3 sodique, 7,5 ml d'une solution de NaOH 0,02M sont ajoutés. La poudre de T3 sodique est dissoute par sonication puis transférée dans une fiole jaugée de 0,5 L. Le bécher est rincé plusieurs fois à l'eau pour préparation injectable (ppi) puis l'eau de rinçage est transférée dans la fiole complétée jusqu'au trait de la jauge avec de l'eau ppi.

2. A partir de la solution concentrée aqueuse précédente (0,2 mM), on réalise une solution diluée (solution finale) dans le PBS (Phosphate Buffered Saline) et dans une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium (préparée avec 800 mg de NaOH dans 1000 ml d'eau ppi et 1000 ml de méthanol R),:

La formule de fabrication de la solution diluée de T3 dans le PBS est donnée ci-dessous.

5

Formule de fabrication de la solution diluée de T3 sodique dans le PBS:

10 mL de la solution concentrée (concentration T3 sodique :136 mg/L)

+ 990 mL PBS

$C = 2 \mu\text{M}$ soit **1,36 mg/L**

La formule de fabrication de la solution diluée de T3 dans la solution méthanolique d'hydroxyde de sodium est donnée ci-dessous.

10

Formule de fabrication de la solution diluée de T3 sodique dans la solution méthanolique de NaOH:

10 mL de la solution concentrée aqueuse (concentration T3 sodique :136 mg/L)

+ 495 mL Solution NaOH 0,2 mM:

15

+ 495 mL méthanol

$C = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L} = \textbf{1,36 mg/L}$

3. Etude de stabilité des solutions diluées

20

- 10 flacons de chaque dilution ont été conservés à +4°C pour dosage à Jour 0, Jour 7, Jour 14, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois; 6 mois; 9 mois; 12 mois
- 9 flacons de chaque dilution ont été conservés à -25°C pour dosage à Jour 7, Jour 14, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois; 6 mois; 9 mois; 12 mois.

25

4. Dosage de la T3 (High-performance liquid chromatography-UV)

Paramètres utilisés pour l'HPLC :

30

- Colonne : Atlantis dc18 (3 μm , 2,1x150 mm)
- Température du four : 40°C
- Volume injecté : 20 μL

- Eluant : tampon phosphate 100 mM et acétonitrile (70/30 ; v/v)
pH=5,6.
- Diluant : utilisé pour la gamme et les dilutions des échantillons :

Solution méthanolique d'hydroxyde de sodium

5 800 mg de NaOH R

1000 ml d'eau R

1000 ml de méthanol R

- Débit : 1,5 ou 2 mL/min
- Longueur d'onde de détection UV : 226 nm

10

Gamme d'étalonnage :

La gamme d'étalonnage est réalisée dans la solution méthanolique d'hydroxyde de sodium R : les concentrations allant de 0 mg/L à 5 mg/L.

Chaque flacon de la solution concentrée est utilisé pour deux dosages (à

15 +4°C dans le PBS et dans la solution méthanolique de NaOH ensuite à
-25°C dans le PBS et dans la solution méthanolique de NaOH):

Jour 0: 2 dosages

Jour 7: 4 dosages

Jour 14: 4 dosages

20 1 mois: 4 dosages

2 mois: 4 dosages

3 mois: 4 dosages

4 mois: 4 dosages

6 mois: 4 dosages

25 9 mois: 4 dosages

12 mois: 4 dosages

Pour doser la T3 dans la solution concentrée aqueuse, des dilutions au 1/100^{ème} dans la solution méthanolique d'hydroxyde de sodium puis dans le PBS sont effectuées au moment du dosage pour chaque solution, la gamme d'étalonnage allant de 0 mg/L à 5 mg/L. On obtient ainsi une solution méthanolique aqueuse à 1,36 mg/L et une solution avec le PBS à 1,36 mg/L.

30

- Chaque flacon de la solution diluée est utilisé pour un dosage :

Jour 0: 2 dosages

Jour 7: 4 dosages

Jour 14: 4 dosages

5 1 mois: 4 dosages

2 mois: 4 dosages

3 mois: 4 dosages

4 mois: 4 dosages

6 mois: 4 dosages

10 9 mois: 4 dosages

12 mois: 4 dosages

Aucune dilution n'est nécessaire pour la solution diluée : la concentration attendue est de 1,36 mg/L.

Les résultats sont présentés sur les **Figures 1** et **2**. La **Figure 1**
 15 présente l'étude de la variation de la concentration de solutions aqueuses
 concentrées de T3 (concentration initiale : 136 mg.l⁻¹) au cours du temps de
 stockage. Les solutions ont été conservées soit (i) à 4°C puis diluées au
 moment du dosage au 1/100^{ème} dans une solution méthanolique d'hydroxyde
 de sodium (●) ou dans une solution de PBS (○), soit (ii) à -25°C puis
 20 diluées au 1/100^{ème} au moment du dosage dans une solution méthanolique
 d'hydroxyde de sodium (■) ou dans une solution de PBS (□).

La **Figure 2** présente l'étude de la variation de la concentration de
 solutions diluées de T3 (concentration initiale : 1,36 mg.l⁻¹) au cours du
 temps de stockage. Les solutions de T3 ont été conservées soit (i) à 4°C (● :
 25 solvant méthanol/hydroxyde de sodium) et (○ : solvant : PBS), soit (ii) à -
 25°C (■ : solvant méthanol/hydroxyde de sodium) et (□ : solvant : PBS).

L'étude de stabilité réalisée pendant un an (ou deux ans dans le cas des
 solutions diluées à + 4°C) de la solution méthanolique de NaOH conforme à
 l'invention, versus le PBS, a montré que la solution selon l'invention est plus
 30 stable.

5. Supplémentation d'un milieu de culture

Composition du milieu de culture modifié de cellules épithéliales (ECCM)

Produit	Fournisseur	Concentration dans le milieu final	Quantité pour 100 ml de milieu
DMEM/Glutamax	Invitrogen	/	64 ml
HAM F12	Invitrogen	/	23 ml
Sérum de veau foetal II	Thermo Fisher Hyclone	/	10 ml
Hydrocortisone	Serb	0,4 µg/ml	200 µl
Umuline Rapide	Lily France	0,12 UI/ml	120µl
Sélénium	Aguettant	0,033 µg/ml	340µl
Isuprel	Hospira France	0,4 µg/ml	200 µl
T3	Pharmacie HEH	2x10⁻⁹ M	100 µl
EGF	Austral Biologicals	10 ng/ml	100 µl
Pénicilline	Panpharma	100 UI/ml	10 µl
Streptomycine	Panpharma	100 µg/ml	10 µl
Amphotéricine B	BMS	1 µg/ml	20 µl

La culture de cellules épithéliales a été réalisée avec succès dans ce milieu et aucun signe de toxicité de la composition selon l'invention *in vitro* n'a été mis en évidence.

REVENDICATIONS

1 - Composition pour compléter un milieu de culture de cellules épithéliales comprenant de la Triiodo-L-thyronine(T3) sodique, un hydroxyde alcalin, un alcool en C₁-C₃ et de l'eau.

2 - Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'hydroxyde alcalin est de l'hydroxyde de sodium.

3 - Composition selon la revendication 2 précédentes caractérisée en ce que le rapport (m/m) T3 sodique/hydroxyde de sodium appartient à la gamme allant de 0,17/100 à 3,40/100, et est, de préférence, égal à 0,34/100.

4 - Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que l'alcool en C₁-C₃ est le méthanol.

5 - Composition selon la revendication 4 caractérisée en ce que le rapport (m/v) T3 sodique/méthanol appartient à la gamme allant de 0,068/100 à 5,440/100, et est, de préférence, égal à 0,272/100.

6 - Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le rapport (m/v) T3 sodique /eau appartient à la gamme allant de 0,068/100 à 5,440/100, et est, de préférence, égal à 0,272/100.

7 - Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle est stérile et apyrogène.

8 - Utilisation d'une composition selon l'une des revendications précédentes pour compléter un milieu de culture de cellules épithéliales.

9 - Procédé de culture de cellules épithéliales dans lequel on ajoute, à un milieu de culture initial, une composition selon l'une des revendications 1 à 7, puis on cultive des cellules épithéliales dans le milieu de culture modifié obtenu.

10 - Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la composition selon l'une des revendications 1 à 7 est ajoutée en quantité telle pour avoir dans le milieu de culture modifié obtenu, une concentration en T3 sodique appartenant à la gamme allant de 0,68 µg/L à 27,20 µg/L, et de préférence une concentration égale à 1,36 µg/L.

11 - Procédé selon la revendication 9 ou 10 caractérisé en ce que le milieu de culture initial comprend au moins un sucre, au moins un sel inorganique, au moins un acide aminé naturel et au moins une vitamine et/ou un agent anti-oxydant.

- 5 **12** - Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisé en ce que le milieu de culture initial comprend au moins un facteur de croissance.

13 - Procédé selon l'une des revendications 9 à 12 caractérisé en ce que le milieu de culture initial comprend au moins un agent choisi parmi les agents antibiotiques, antifongiques et antibactériens.

1/1

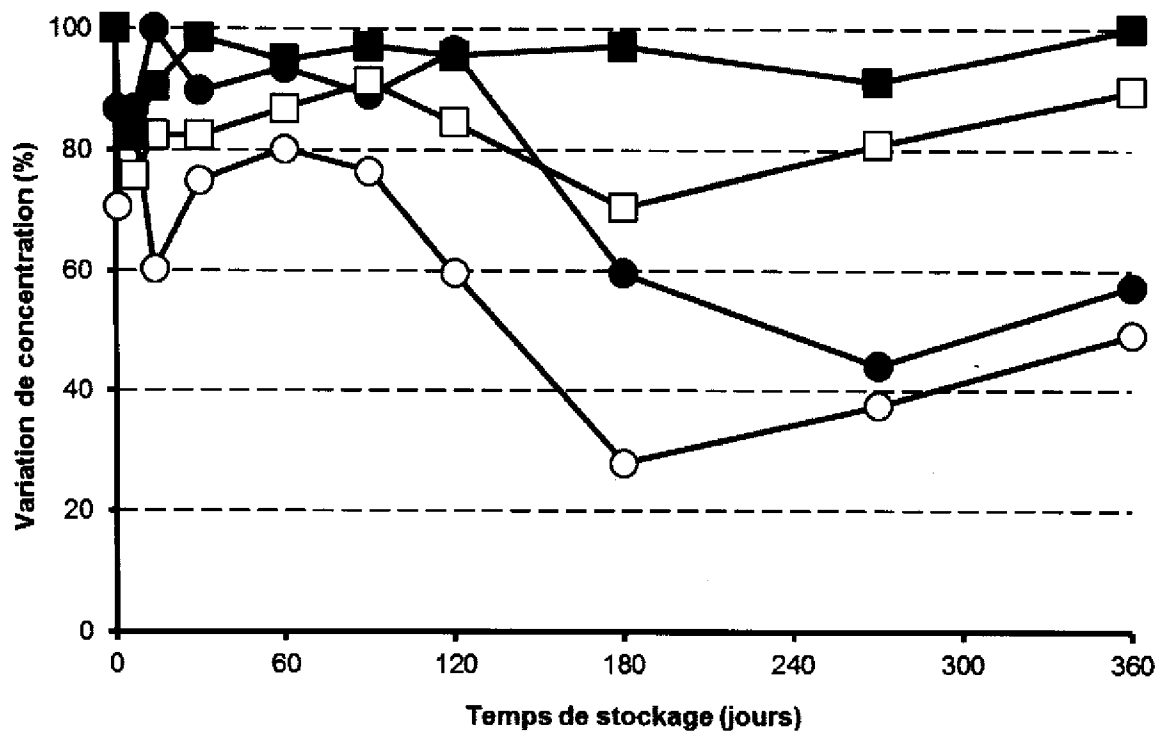


FIGURE 1

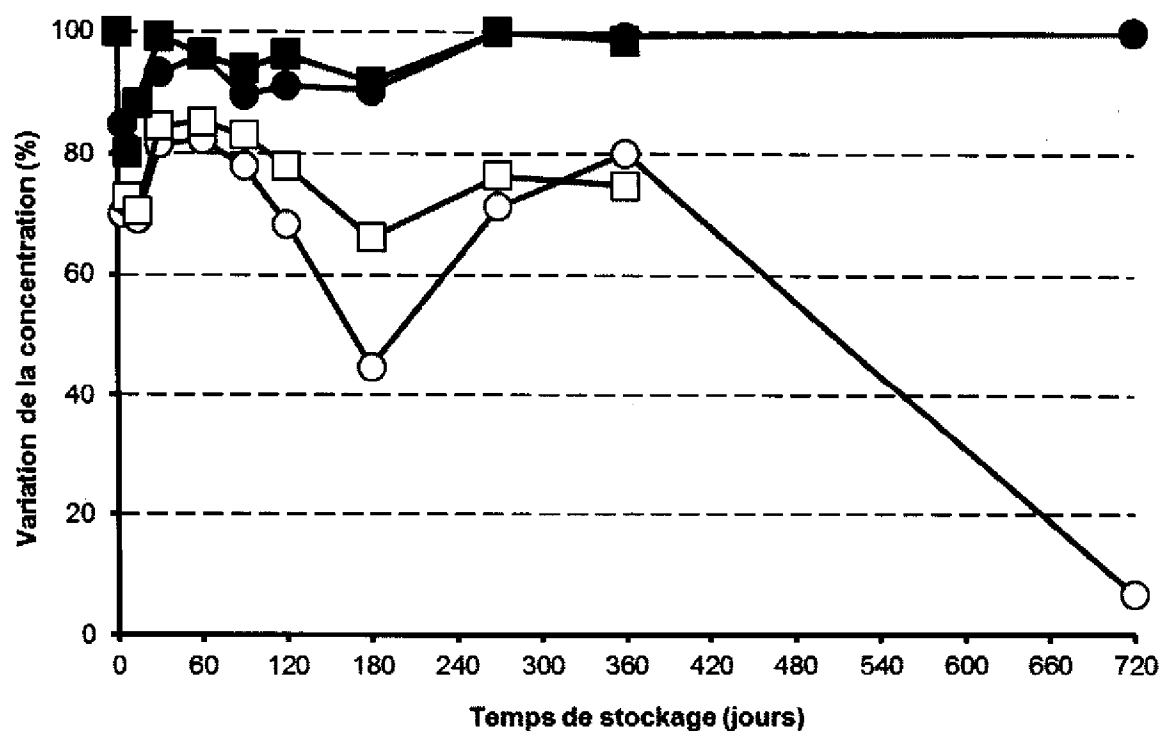


FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/050282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N5/07
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GANGATIRKAR PRADNYA ET AL: "Establishment of 3D organotypic cultures using human neonatal epidermal cells", NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 2, no. 1, 8 February 2007 (2007-02-08), pages 178-186, XP009110487, ISSN: 1750-2799, DOI: DOI:10.1038/NPROT.2006.448 section ITT; page 179	1-13
X	US 2006/188977 A1 (SCHWARTZ RICHARD [US] ET AL) 24 August 2006 (2006-08-24) paragraphs [0002], [0139], [0141] ----- -/-	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2012

Date of mailing of the international search report

05/10/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Surdej, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/050282

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Sigma-Aldrich product catalogue - T6397", 2010, XP002639632, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ [retrieved on 2011-05-31] the whole document -----	1-13
X	"Sigma-Aldrich product catalogue - T5516", 2010, XP002639633, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ [retrieved on 2011-05-31] the whole document -----	1-13
X	DARBRO BENJAMIN W ET AL: "Co-regulation of p16INK4A and migratory genes in culture conditions that lead to premature senescence in human keratinocytes.", THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY SEP 2005 LNKD- PUBMED:16117791, vol. 125, no. 3, September 2005 (2005-09), pages 499-509, XP002639634, ISSN: 0022-202X page 506, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 -----	1-13
X	WO 2010/036760 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; LIU JONATHAN [US]; THOMPSON MARK [US]; MARANGA LUI) 1 April 2010 (2010-04-01) paragraph [0333] page 92 - page 94 table 3 -----	1-13
A	US 2006/194323 A1 (JUDD DAVID A [US] ET AL) 31 August 2006 (2006-08-31) paragraphs [0003], [0039], [0040], [0085] page 5 - page 6 table 1 -----	1-13
A	THÉPOT A ET AL: "Evaluation of tumorigenic risk of tissue-engineered oral mucosal epithelial cells by using combinational examinations.", CELL TRANSPLANTATION 2010 LNKD- PUBMED:20977830, vol. 19, no. 8, 2010, pages 999-1006, XP002639635, ISSN: 1555-3892 page 1000, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/050282

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006188977 A1	24-08-2006	AT 547511 T	15-03-2012
		AU 2005322353 A1	06-07-2006
		CA 2592120 A1	06-07-2006
		EP 1831353 A2	12-09-2007
		EP 2368975 A1	28-09-2011
		ES 2382557 T3	11-06-2012
		JP 2008525025 A	17-07-2008
		KR 20070098998 A	08-10-2007
		US 2006188977 A1	24-08-2006
		US 2010112000 A1	06-05-2010
		US 2012115206 A1	10-05-2012
		WO 2006071563 A2	06-07-2006

WO 2010036760 A1	01-04-2010	AU 2009296701 A1	01-04-2010
		CA 2738022 A1	01-04-2010
		CN 102216450 A	12-10-2011
		EP 2344634 A1	20-07-2011
		JP 2012503486 A	09-02-2012
		KR 20110074564 A	30-06-2011
		US 2010098725 A1	22-04-2010
		WO 2010036760 A1	01-04-2010

US 2006194323 A1	31-08-2006	US 6692961 B1	17-02-2004
		US 2004067584 A1	08-04-2004
		US 2006194323 A1	31-08-2006

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/050282

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N5/07
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GANGATIRKAR PRADNYA ET AL: "Establishment of 3D organotypic cultures using human neonatal epidermal cells", NATURE PROTOCOLS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 2, no. 1, 8 février 2007 (2007-02-08), pages 178-186, XP009110487, ISSN: 1750-2799, DOI: DOI:10.1038/NPROT.2006.448 section ITT; page 179	1-13
X	US 2006/188977 A1 (SCHWARTZ RICHARD [US] ET AL) 24 août 2006 (2006-08-24) alinéas [0002], [0139], [0141]	1-13
	----- -/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 septembre 2012

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/10/2012

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Surdej, Patrick

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	"Sigma-Aldrich product catalogue - T6397", 2010, XP002639632, Extrait de l'Internet: URL:http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ [extrait le 2011-05-31] le document en entier -----	1-13
X	"Sigma-Aldrich product catalogue - T5516", 2010, XP002639633, Extrait de l'Internet: URL:http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ [extrait le 2011-05-31] le document en entier -----	1-13
X	DARBRO BENJAMIN W ET AL: "Co-regulation of p16INK4A and migratory genes in culture conditions that lead to premature senescence in human keratinocytes.", THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY SEP 2005 LNKD- PUBMED:16117791, vol. 125, no. 3, septembre 2005 (2005-09), pages 499-509, XP002639634, ISSN: 0022-202X page 506, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 -----	1-13
X	WO 2010/036760 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; LIU JONATHAN [US]; THOMPSON MARK [US]; MARANGA LUI) 1 avril 2010 (2010-04-01) alinéa [0333] page 92 - page 94 tableau 3 -----	1-13
A	US 2006/194323 A1 (JUDD DAVID A [US] ET AL) 31 août 2006 (2006-08-31) alinéas [0003], [0039], [0040], [0085] page 5 - page 6 tableau 1 -----	1-13
A	THÉPOT A ET AL: "Evaluation of tumorigenic risk of tissue-engineered oral mucosal epithelial cells by using combinational examinations.", CELL TRANSPLANTATION 2010 LNKD- PUBMED:20977830, vol. 19, no. 8, 2010, pages 999-1006, XP002639635, ISSN: 1555-3892 page 1000, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 -----	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/050282

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2006188977 A1	24-08-2006	AT 547511 T	15-03-2012
		AU 2005322353 A1	06-07-2006
		CA 2592120 A1	06-07-2006
		EP 1831353 A2	12-09-2007
		EP 2368975 A1	28-09-2011
		ES 2382557 T3	11-06-2012
		JP 2008525025 A	17-07-2008
		KR 20070098998 A	08-10-2007
		US 2006188977 A1	24-08-2006
		US 2010112000 A1	06-05-2010
		US 2012115206 A1	10-05-2012
		WO 2006071563 A2	06-07-2006

WO 2010036760 A1	01-04-2010	AU 2009296701 A1	01-04-2010
		CA 2738022 A1	01-04-2010
		CN 102216450 A	12-10-2011
		EP 2344634 A1	20-07-2011
		JP 2012503486 A	09-02-2012
		KR 20110074564 A	30-06-2011
		US 2010098725 A1	22-04-2010
		WO 2010036760 A1	01-04-2010

US 2006194323 A1	31-08-2006	US 6692961 B1	17-02-2004
		US 2004067584 A1	08-04-2004
		US 2006194323 A1	31-08-2006
