

(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
5 novembre 2015 (05.11.2015)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/166063 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 8/73 (2006.01) A61K 31/728 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01) A61K 31/737 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2015/059544
- (22) Date de dépôt international :
30 avril 2015 (30.04.2015)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1453973 30 avril 2014 (30.04.2014) FR
- (71) Déposant : PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE
[FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-billan-
court (FR).
- (72) Inventeurs : POIGNY, Stéphane; 84 chemin des Ro-
quettes, F-31600 Saubens (FR). HERNANDEZ-PIGEON,
Hélène; 14 rue des Troubadours, F-31270 Cugnaux (FR).
SAURAT, Jean-Hilaire; 2, Place Reverdin, CH-1206 Ge-
neve (CH). KAYA, Gürkan; 2, chemin de Normandie,
CH-1206 Geneve (CH).
- (74) Mandataire : REGIMBEAU; Regimbeau, 20, rue de Cha-
zelles, F-75847 Paris Cedex 17 (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))



WO 2015/166063 A1

(54) Title : COMBINATION OF A HYALURONIC ACID AND OF A SULPHATED POLYSACCHARIDE

(54) Titre : ASSOCIATION D'UN ACIDE HYALURONIQUE ET D'UN POLYSACCHARIDE SULFATE

(57) Abstract : The present invention relates to a combination comprising a hyaluronic acid or a salt thereof and a sulphated polysaccharide of which the molecular weight is between 5 and 25 kDa, which is of use in particular for combating the signs of skin ageing or for treating and healing skin wounds.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une association comprenant un acide hyaluronique ou un de ses sels et un polysaccharide sulfaté dont le poids moléculaire est compris entre et 25 kDa, utile notamment pour lutter contre les signes du vieillissement cutané ou pour traiter et cicatriser les lésions cutanées.

ASSOCIATION D'UN ACIDE HYALURONIQUE ET D'UN POLYSACCHARIDE SULFATE

DOMAINE DE L'INVENTION

5 La présente invention concerne une nouvelle association d'un acide hyaluronique ou un de ses sels et d'un polysaccharide sulfaté de bas poids moléculaire ; ainsi que l'utilisation de ladite association dans les domaines de l'anti-âge et de la cicatrisation.

10 ART ANTERIEUR

L'acide hyaluronique (AH) est une molécule au rôle majeur dans la peau. C'est en effet la composante principale de la matrice extracellulaire. Cette dernière désigne l'ensemble de macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif. Elle est constituée en grande partie de glycoprotéines, de protéines pures ainsi que des glycosaminoglycane.

15 L'AH est un glycosaminoglycane linéaire non sulfaté composé d'unités répétitives de disaccharides eux-mêmes composés de D-acide glucuronique et N-acétyl-D-glucosamine liés par des liaisons glycosidiques alternées β 1-3 et β 1-4 entre les dimères (Tammi R., Agren U.M., Tuhkanen A.L., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry 29(2):1-81, 1994). Sous sa forme native,

20 l'AH est un polymère de très haut poids moléculaire compris entre 600 000 Da et 3 MDa (Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to peracellular cue. Nat Rev Cancer 2004, 4:538-539).

Avec l'âge, la quantité d'AH et son degré de polymérisation diminuent, résultant en une moindre quantité d'eau retenue dans la matrice extracellulaire. La peau subit

25 alors un processus de vieillissement qui aboutit à une augmentation de la fibrose et à une baisse de la teneur en fibres élastiques. Au cours du processus de vieillissement, on observe une modification de la structure et des fonctions cutanées. Ce vieillissement est de nature physiologique mais peut être également photo-induit, c'est-à-dire dû à une exposition répétée de la peau à la lumière solaire, notamment ultraviolette. Les

30 principaux signes cliniques du vieillissement cutané sont l'apparition de ridules et de rides profondes, qui augmentent bien évidemment avec l'âge. Les sillons et les rides se marquent ; la peau se creuse et perd sa fermeté ; en surface, la peau perd sa luminosité.

Les polysaccharides sulfatés comprennent entre autres les fucanes sulfatés et les ulvanes sulfatés de poids moléculaire compris entre 5 et 25kDa.

Ces polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaires ont des propriétés biologiques intéressantes : inhibition de la dégradation du collagène et de l'élastine, restructuration, action anti-inflammatoire, et induction de la production d'AH.

Au cours du vieillissement, les fibroblastes entrent en sénescence et leur capacité de prolifération diminue fortement. Ainsi, le fait de pouvoir stimuler à nouveau la prolifération de ces cellules est une des voies étudiées pour lutter contre le vieillissement cutané.

Par ailleurs, la cicatrisation des plaies est un processus biologique complexe et dynamique qui met en jeu l'interaction de nombreux facteurs locaux et systémiques dans la réparation normale des tissus. La progression de la cicatrisation comporte trois phases interdépendantes : l'hémostase et l'inflammation, la prolifération et le remodelage (General principles of wound healing. Witte MB, Barbul A. Surg Clin North Am. 1997 Jun; 77(3):509-28.). La prolifération implique trois processus bien observables : la granulation, la contraction et la réépithélialisation.

Au cours de la granulation, on observe la prolifération et la migration vers le lit de la plaie des cellules qui interviendront dans le reste du processus de réparation. Ainsi, on y retrouve des macrophages, des fibroblastes et des cellules endothéliales. Les macrophages libèrent constamment des facteurs chimiotactiques et des facteurs de croissance. Les fibroblastes construisent la nouvelle matrice cellulaire nécessaire à la croissance des cellules au fond de la plaie. Cet échafaudage favorise la migration cellulaire. Enfin, les cellules endothéliales déclenchent la formation de bourgeons vasculaires qui constitueront de nouveaux capillaires, ce qui permettra de rétablir la perfusion et d'assurer l'apport en oxygène et en nutriments essentiels à l'activité métabolique des cellules dans la plaie.

La contraction de la plaie est un mécanisme de réduction de la taille de la plaie et les fibroblastes jouent un rôle de premier plan dans cette contraction.

La ré-épithélialisation consiste en la régénération d'un épiderme qui recouvre une plaie pour reformer une barrière efficace contre l'environnement extérieur, capable

de se pigmenter et de retrouver ses fonctions sensorielles et immunitaires. Elle implique donc les processus cellulaires de migration et de prolifération des kératinocytes, mais aussi la différenciation de ce néo-épithélium et la restauration d'une membrane basale qui reconnecte le derme et l'épiderme. Lorsque la migration des cellules basales en direction du centre de la plaie permet aux deux bords de la plaie de se rejoindre, une vague de mitose cellulaire se produit pour combler les espaces laissés par la migration et fournir des cellules pour le tissu épithélial en régénération tri-dimensionnelle.

Les étapes de prolifération des cellules kératinocytaires, de fibroblastes ou de cellules endothéliales peuvent être considérées comme un des phénomènes fonctionnels témoignant de l'activité cicatrisante d'un actif. Une augmentation de la prolifération des fibroblastes participerait à la cicatrisation d'une plaie profonde (atteinte du derme), alors que l'augmentation de la prolifération des kératinocytes participerait à la ré-épithélialisation.

Il existe toujours un besoin de proposer de nouvelles compositions cosmétiques pour lutter contre les signes du vieillissement cutané.

La demanderesse a mis en évidence l'existence d'une synergie entre l'acide hyaluronique et un polysaccharide sulfaté de bas poids moléculaire sur la prolifération des fibroblastes. Cette activité est particulièrement intéressante dans le domaine de l'anti-âge mais aussi dans la régénération tissulaire et la cicatrisation des lésions cutanées.

DESCRIPTION DETAILLEE

La présente invention a pour objet une association comprenant un acide hyaluronique ou un de ses sels et un polysaccharide sulfaté dont le poids moléculaire est compris entre 5 et 25 kDa.

Dans le cadre de la présente invention, les termes « acide hyaluronique », « fragments d'acide hyaluronique », « AH » et « hyaluronane » sont utilisés indifféremment pour désigner de l'acide hyaluronique. Lorsque l'acide hyaluronique est sous forme de sel, on parlera de hyaluronate.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'association comprend un acide hyaluronique ou un de ses sels dont la masse moléculaire moyenne en poids (Mw) sera comprise entre 50 000 et 750 000 Da.

5 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le fragment d'AH ou un de ses sels se caractérise par une masse moléculaire moyenne en poids comprise entre 60 et 120 kDa, ladite masse moléculaire étant mesurée par une méthode analytique combinant une technique de chromatographie d'exclusion de taille (Size Exclusion Chromatography – SEC) avec un détecteur à diffusion laser multi-angle (Multi-Angle Light Scattering photometer – MALS) couplé à un viscosimètre (VIS) et à un
10 réfractomètre différentiel (RI).

Dans un mode de réalisation particulier, il s'agira du hyaluronate de sodium.

La masse moléculaire de l'AH ou un de ses sels peut être mesurée à l'aide de la méthode de la pharmacopée européenne qui mesure la viscosité intrinsèque avec un
15 viscosimètre capillaire de Ubbelohde (cf. Pharmacopée européenne 7.6, monographie du hyaluronate de sodium réf. : 01/2011 :1472). Cette valeur de viscosité est ensuite reliée à la masse moléculaire moyenne par la relation de Mark-Houwink. Cette méthode est longue et nécessite une parfaite reproductibilité.

Dans le cadre de la présente invention, la masse moléculaire moyenne en poids
20 de l'AH ou un de ses sels est mesurée par la méthode SEC-MALS-VIS-RI qui est une méthode analytique combinant une technique de chromatographie d'exclusion de taille (Size Exclusion Chromatography – SEC) avec un détecteur à diffusion laser multi-angle (Multi-Angle Light scattering photometer – MALS) couplé à un viscosimètre (VIS) et un réfractomètre différentiel. Cette technique permet d'obtenir la masse moléculaire
25 moyenne en poids (Mw).

Cette technique permet de caractériser les masses moléculaires des AH de façon précise et reproductible (Stepan Podzimek & al. Solution of Hyaluronic Acid and Comparaison of SEC-MALLS-VIS Data with Off-line Capillary Viscometry Journal of Applied Polymer science 2009).

30

Le couplage d'une chromatographie d'exclusion de taille SEC à un détecteur MALS permet après injection d'une solution de polymères dans un système

chromatographique, de séparer ces polymères par taille dans la colonne chromatographique, de mesurer cette taille par diffusion de lumière et de les quantifier à l'aide d'un réfractomètre différentiel ou d'un spectromètre UV.

- 5 • L'acide hyaluronique ou un de ses sels est solubilisé dans une solution aqueuse de NaCl 0,1 M puis élué sur une colonne remplie de billes de polystyrène-divinyl-benzène de porosité calibrée. Les grosses chaînes polymériques ne passent pas dans tous les pores et sont donc éluées avant les petites chaînes.
- 10 • Le détecteur MALS mesure la diffusion de la lumière incidente à différents angles. Ces angles permettent, par extrapolation, de mesurer R_0 qui est la diffusion à angle 0. R_0 est directement proportionnel à la taille de la molécule.
- La réponse S_i du réfractomètre différentiel est proportionnelle à la masse totale C_i du polymère de degré de polymérisation i suivant l'équation (1) suivante :

$$S_i = K' \cdot \frac{dn}{dc} \cdot C_i$$

- où :
- 15 S_i est donc la réponse du réfractomètre différentiel,
 - K' est une constante liée à l'appareil, et
 - C_i est la masse (poids) totale du polymère de degré de polymérisation i ($C_i = N_i \times M_i$), N_i étant le nombre de chaînes de masse molaire M_i .

20 L'incrément d'indice de réfraction dn/dc est en outre une valeur spécifique du polymère étudié.

Ce rapport dn/dc peut être mesuré selon le protocole suivant exemplifié avec le hyaluronate de sodium.

25 a/ Appareil et préparation des solutions :

Les mesures sont effectuées sur un réfractomètre tel que le modèle Brice-Phoenix ayant comme source de lumière incidente un laser hélium-néon ($\lambda=633\text{nm}$).

30 Différentes concentrations en polymère à étudier sont préparées indépendamment par pesée (durée de mise en solution = 24 heures). Les indices de réfractions (dn) respectifs sont ensuite mesurés à l'aide du réfractomètre.

b/ Résultat

Les résultats sont présentés sous forme de graphique $dn = f(\text{concentration})$ (voir Figure 1). Une régression linéaire du type $Y = A + B \cdot X$ est alors déterminée.

Dans le cas du hyaluronate de sodium, les valeurs A et B déterminées sont respectivement $A = -2,030$ et $B = 14927,911$.

5 Le rapport dn/dc correspond alors à $k \times B$ où k représente la constante de l'appareil qui est égale à $0,97 \cdot 10^{-5}$ dans le présent exemple.

Pour le hyaluronate de sodium, dn/dc est donc évalué à $0,97 \cdot 10^{-5} \times 14927,911 = 0,145 \text{ ml/g}$.

10 La formule suivante donne la relation entre tous les paramètres mesurés :

$$R_0 = K \cdot C_i \cdot M_i$$

où : R_0 est le rapport de RAYLEIG à angle de diffusion 0,

K est la constante de l'appareil,

15 C_i représente la masse totale du polymère de degré de polymérisation i [calculée suivant l'équation (1)] de la solution injectée,

et M_i représente la masse molaire de la chaîne polymérique recherchée.

La masse moléculaire moyenne en poids M_w peut alors être calculée selon la formule :

20 $M_w = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i}$

Toutes les masses moléculaires sont exprimées en Daltons.

25 L'acide hyaluronique ou son sel, objet de la présente invention, peut être obtenu selon un des procédés connus de l'homme du métier, tels que ceux rappelés dans le document EP1987153.

L'AH est principalement obtenu, de façon industrielle, par fermentation bactérienne : les filaments d'acide hyaluronique sont synthétisés par des bactéries.

30 Ainsi dans un mode de réalisation particulier de l'invention, un AH natif de haut poids moléculaire allant généralement de 1 MDa à 2 MDa est obtenu par fermentation bactérienne en utilisant une souche bactérienne sélectionnée.

Le polymère obtenu peut alors être séparé de la bactérie. La solution est ensuite purifiée puis hydrolysée par hydrolyse acide contrôlée jusqu'à l'obtention du poids moléculaire souhaité.

Dans le cas de la préparation du hyaluronate de sodium, on procédera à une
5 étape de neutralisation par ajout de NaOH.

Le sel de l'acide hyaluronique sera préférentiellement le hyaluronate de sodium.

Dans le cadre de la présente invention, les polysaccharides sulfatés de bas poids
10 moléculaire peuvent être choisis parmi les fucanes sulfatés et les ulvanes sulfatés de poids moléculaire compris entre 5 et 25kDa.

Les fucanes sulfatés sont des polysaccharides comprenant du L-fucose sulfaté. Ces polysaccharides peuvent être extraits notamment d'algues brunes, par exemple de l'ordre des Fucales ou des Laminariales.

15 Les ulvanes sulfatés sont des polysaccharides anioniques sulfatés comprenant des acides uroniques (par ex. acide glucuronique, acide iduronique) et des oses pouvant être sulfatés (par ex. 3-sulfate rhamnose, galactose, xylose, glucose) distribués dans des motifs répétés. Les principaux motifs sont :

- l'acide 3-sulfate ulvanobiuronique de type A constitué de 3-sulfate α -L-rhamnose
20 lié à de l'acide β -D-glucuronique par une liaison de type 1 \rightarrow 4, et
- l'acide 3-sulfate ulvanobiuronique de type B constitué de 3-sulfate α -L-rhamnose lié à de l'acide α -L-iduronique par une liaison de type 1 \rightarrow 4.

Les ulvanes peuvent être extraits notamment des algues vertes de type ulve ou entéromorphe (*Ulva sp.* et *Enteromorpha sp.*).

25

Selon un mode de réalisation particulier, le fucane sulfaté de bas poids moléculaire est tel que décrit dans WO 2010/086197.

On peut citer la spécialité commerciale Ascophyscient® d'Algues et Mer extrait de l'algue *Ascophyllum nodosum*.

30

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'ulvane sulfaté de bas poids moléculaire est tel que décrit dans WO 2013/150253.

On peut citer également la fraction QT40® commercialisée par Green Tech à base d'un oligosaccharide particulier issu de l'algue *Ulva Lactuca* : un sulfo-oligorhamnoglucuronane.

5 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le ratio massique acide hyaluronique / polysaccharide est compris entre 0,1 et 10.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le ratio massique acide hyaluronique / polysaccharide est compris entre 0,5 et 5, et de préférence entre 0,5 et 2.

10 La présente invention porte, en outre, sur une association d'acide hyaluronique ou un de ses sels et de polysaccharide sulfaté de bas poids moléculaire selon l'invention (c'est-à-dire de poids moléculaire compris entre 5 et 25 kDa) pour son utilisation pour favoriser la prolifération des fibroblastes.

15 La présente invention concerne également une composition cosmétique comprenant, en tant que principe actif anti-âge, une association d'un acide hyaluronique ou un de ses sels et d'un polysaccharide sulfaté de poids moléculaire compris entre 5 et 25 kDa et comprenant en outre au moins un excipient cosmétiquement acceptable.

20 De préférence, les excipients cosmétiquement acceptables sont adaptés à une administration topique.

Les excipients acceptables permettent en particulier d'assurer une bonne stabilité, une texture et un toucher agréables. Il peut aussi s'agir par exemple d'agents de formulations ou d'additifs d'usage connu et classique en cosmétique : on peut citer des tensioactifs, colorants, conservateurs, parfums, agents filmogènes, épaississants, etc.

25 Les compositions anti-âge peuvent se présenter sous les formes qui sont habituellement connues pour une administration topique sur la peau, c'est-à-dire notamment des crèmes, émulsions, lotions, sérums, masques, combleurs de rides, contours des yeux, ...

30 L'objet de la présente invention vise l'utilisation cosmétique de l'association selon la présente invention ou de cette composition cosmétique selon l'invention pour lutter contre les signes du vieillissement cutané. L'utilisation cosmétique de

l'association selon la présente invention ou la composition cosmétique selon l'invention est plus particulièrement destinée à redonner de la matière à la peau, renforcer sa fermeté et réduire visiblement les rides marquées et les sillons profonds.

La présente invention concerne également une méthode pour lutter contre les
5 signes du vieillissement cutané comprenant l'administration, de préférence topique, d'une quantité efficace d'une association selon l'invention ou d'une composition cosmétique selon l'invention à une personne en ayant besoin.

Un autre objet de la présente invention concerne une composition
10 dermatologique destinée à accélérer la réparation cutanée afin de rétablir l'intégrité et la qualité de la peau comprenant en tant que principe actif dermatologique ou cosmétique l'association d'un acide hyaluronique ou un de ses sels et un polysaccharide sulfaté dont le poids moléculaire est compris entre 5 et 25 kDa ci-dessus mentionné et comprenant en outre au moins un excipient dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.

15 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition est destinée à une application topique.

Les excipients dermatologiquement (pharmaceutiquement) ou cosmétiquement compatibles peuvent être tout excipient parmi ceux connus de l'homme de l'art en vue
20 d'obtenir une composition pour l'application topique sous forme d'un lait, d'une crème, d'un baume, d'une huile, d'une lotion, d'un gel, d'un gel moussant, d'une pommade, d'un spray, etc.

Dans un mode de réalisation préféré, la composition sera sous forme d'une
25 crème ou d'une pommade.

Dans un mode de réalisation particulier, les compositions dermatologiques et cosmétiques selon l'invention comprennent au moins un autre principe actif.

Cet autre principe actif pourra notamment être sélectionné dans le groupe
30 comprenant des agents anti-âge, cicatrisants, apaisants, antiprurit, antioxydants, anti-radicalaires, anti-UV, stimulant la synthèse de macromolécules dermiques ou le métabolisme énergétique, hydratants, dépigmentants, antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires, ou encore anesthésiques.

Selon un mode de réalisation particulier, les compositions selon l'invention, de préférence cosmétiques, comprennent en outre du rétinaldéhyde. Cet actif anti-âge complémentaire est un précurseur direct d'acide rétinoïque pour un effet réactivateur du métabolisme cellulaire immédiat. Le rétinaldéhyde augmente l'expression des récepteurs de l'AH, les CD44 et induit la synthèse d'AH.

La composition selon l'invention comprend alors une association d'acide hyaluronique ou un de ses sels, de polysaccharide sulfaté de bas poids moléculaire et de rétinaldéhyde. Une telle association a un effet restructurant et redensifiant dans la jonction dermo-épidermique et le derme papillaire.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition comprendra en outre un dérivé de tocophérol dont le delta tocophéryl glucopyranoside : ses effets anti-oxydants puissants protègent la peau et préservent sa luminosité.

La composition selon l'invention comprend alors une association d'acide hyaluronique ou un de ses sels, de polysaccharide sulfaté de bas poids moléculaire et de delta tocophéryl glucopyranoside.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'autre principe actif sera choisi parmi les agents cicatrisants, les agents apaisants et leurs mélanges. Un tel principe actif sera utilisé de préférence dans des compositions dermatologiques.

Enfin, un autre objet de la présente invention vise une association d'acide hyaluronique ou un de ses sels et de polysaccharide sulfaté de bas poids moléculaire ou une composition dermatologique la contenant selon l'invention pour son utilisation comme médicament (plus particulièrement dermatologique), destiné notamment au traitement et à la cicatrisation des lésions cutanées.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une association d'un acide hyaluronique ou un de ses sels et d'un polysaccharide sulfaté de poids moléculaire compris entre 5 et 25 kDa pour la préparation d'un médicament (plus particulièrement dermatologique), destiné notamment au traitement et à la cicatrisation des lésions cutanées.

La présente invention concerne également une méthode pour traiter et cicatriser des lésions cutanées comprenant l'administration, de préférence topique, d'une quantité efficace d'une association d'un acide hyaluronique ou un de ses sels et d'un

polysaccharide sulfaté de poids moléculaire compris entre 5 et 25 kDa ou une composition dermatologique la contenant selon l'invention à une personne en ayant besoin.

5 Les compositions dermatologiques et cosmétiques selon l'invention sont destinées notamment aux soins des peaux lésées :

- suite à des actes / traitements invasifs : actes chirurgicaux (exérèses, shavings) avec ou sans suture, cryothérapie, laser ablatif, peelings moyens ou forts, mésothérapie, curetage,

10 • en post traumatique lors de coupures ou brûlures superficielles,

- suite à des actes superficiels (non invasifs) nécessitant un produit cicatrisant qui accélère la récupération cutanée, utilisable au long cours (jusqu'à réparation complète de la peau),

- suite à une altération extérieure légère : écorchures superficielles, coup de soleil.

15 Le traitement des lésions de la peau et des muqueuses selon l'invention pourra notamment comprendre le traitement des coupures, des sutures, des écorchures, des éraflures, des égratignures, des cicatrices post-chirurgie ou post-acte de dermatologie esthétique, des brûlures superficielles, des coups de soleil.

20 La présente invention porte, en outre, sur l'utilisation d'une composition cosmétique selon l'invention destinée à l'amélioration de la cicatrisation et de la réparation cutanée.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des résultats ci-dessous qui l'illustrent sans en limiter la portée.

25

FIGURES

La Figure 1 représente l'indice de réfraction dn en fonction de la concentration c pour le hyaluronate de sodium.

30 La Figure 2 représente l'effet d'AH selon l'invention (HAF120) à 100 et à 1000 $\mu\text{g/ml}$ et d'Ascophyscient® à 10 et à 100 $\mu\text{g/ml}$ sur la prolifération des fibroblastes. * : $p < 0.05$ et ** : $p < 0.01$. Expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

La Figure 3 représente l'effet d'AH selon l'invention (HAF120) à 100 µg/ml, Ascophyscient® à 10 µg/ml et leur association sur la prolifération des fibroblastes. * : p<0.05. Expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

La Figure 4 représente l'effet d'AH selon l'invention (HAF120) à 1000 µg/ml, Ascophyscient® à 10 µg/ml et leur association sur la prolifération des fibroblastes. * : p<0.05 et ** : p<0.01. Expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

EXEMPLES

10 EVALUATION PHARMACOLOGIQUE de l'association d'un fragment de hyaluronate de sodium de masse moléculaire moyenne en poids comprise entre 60 et 120kDa (HAF120) et d'un fucane sulfaté de bas poids moléculaire (5-25kDa) sur la prolifération des fibroblastes

15 Protocole :

La technique utilisée est celle de l'incorporation d'un nucléotide, la 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU), analogue de la thymidine, dans l'ADN des cellules en phase S, à 37°C. Cette technique permet de quantifier les cellules dont l'avancée dans le cycle cellulaire est caractéristique d'une cellule proliférative (phase S ou de synthèse de l'ADN).

Les FNH (fibroblastes normaux humains), isolés de déchets opératoires cutanés, sont habituellement cultivés dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) avec 10 % de SVF (sérum de veau fœtal). Dans nos conditions expérimentales, les dilutions des produits à tester sont réalisées dans du DMEM avec 3 % de SVF.

25 Les cellules sont d'abord privées de SVF pendant 24 h pour arrêter la croissance cellulaire avant de les incuber en présence des molécules à évaluer pendant 44 h à 37°C, dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

L'incorporation du BrdU, proportionnelle au taux de prolifération cellulaire, est évaluée par un système d'anticorps anti-BrdU (Roche Applied Science). L'absorbance correspondante (DO) est mesurée à 450 nm. Cette donnée est donc proportionnelle au

30 taux de prolifération cellulaire.

Les actifs évalués sont les suivants :

- Contrôle positif : EGF (epidermal growth factor – facteur de croissance épidermique) à 10 ng/ml
- Spécialité commerciale Ascophyscient® d'Algues et Mer : 10 et 100 µg/ml (correspondant à 0,001 et 0,01 % respectivement)
- 5 - Hyaluronate de sodium 60- 120kDa selon l'exemple 1 : 100 et 1000 µg/ml (correspondant à 0,01 et 0,1 % respectivement)
- Association comprenant respectivement Ascophyscient® et hyaluronate de sodium 60- 120 kDa aux concentrations respectives suivantes :
 - 10 µg/ml + 100 µg/ml,
 - 10 - 10 µg/ml + 1000 µg/ml.

Analyse des résultats :

- en DO (proportionnelle à l'incorporation de BrdU et donc au taux de prolifération cellulaire)
- 15 - en pourcentage **de stimulation** :

$$\left[\frac{DO \text{ traité}}{DO \text{ témoin}} \times 100 \right] - 100$$

- en erreur standard de la moyenne : esm = **écart-type (Sd)/√n**

Analyses statistiques :

- 20 Des analyses statistiques par le test T de Student bilatéral non apparié ont été réalisées sur les valeurs brutes de DO.
- Ce test donne alors les valeurs des « p value » caractérisant la significativité des résultats obtenus pour les différentes conditions. Le degré de significativité est établi comme suit : significatif pour $p < 0,05$ (*)
- 25 très significatif pour $p < 0,01$ (**)
- hautement significatif pour $p < 0,001$ (***)
- non significatif pour $p > 0,05$

Résultats :

Dans ces conditions expérimentales,

- Ascophyscient® a induit la prolifération des fibroblastes de façon très reproductible et statistiquement significative, surtout à 100 µg/ml (Figure 2).
 - Le hyaluronate de sodium seul a un effet modéré sur la prolifération des fibroblastes (Figure 2).
- 5 - L'association de ces 2 composés a induit la prolifération des fibroblastes de façon synergique (Figures 3 et 4).

Conclusions :

Dans ces conditions expérimentales, Ascophyscient® a induit la prolifération des
10 fibroblastes de façon très reproductible et statistiquement significative. L'association
d'Ascophyscient® avec HAF120 a induit la prolifération des fibroblastes de façon
synergique.

En induisant la prolifération des fibroblastes, Ascophyscient® et son association avec le
15 fragment 60-120 kDa de hyaluronate de sodium restaure le métabolisme cellulaire et
participe à la réparation dermique et à la lutte contre le vieillissement.

EXEMPLES DE COMPOSITION*Exemple 1 :*

| Nom | Pourcentage |
|---|-------------|
| Eau purifiée | QSP 100 % |
| Glycérine | 6 |
| EDTA disodique | 0.1 |
| Phénoxyéthanol | 0.35 |
| Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer (Carbopol® Ultrez 21) | 0.4 |
| Polyacrylate-13 & Polyisobutène & Polysorbate 20 & Eau (Sepiplus™ 400) | 1 |
| Glycéryl Stéarate & PEG-100 Stéarate (Simulsol™ 165) | 4 |
| Alcool Cétylique | 1 |
| Caprylic/Capric Triglycérides Capryliques/Capriques (Myritol® 318) | 10 |
| Diméthicone (DC 200) | 4 |
| Dicaprylyl Carbonate | 4 |
| Hyaluronate de sodium 60-120 kDa selon l'invention | 0.5 |
| Ascophyscient® | 0.3 |
| Parfum | 0.1 |

Exemple 2 :

| Nom | Pourcentage |
|---|-------------|
| Eau purifiée | QSP 100 % |
| Glycérine | 6 |
| EDTA disodique | 0.1 |
| Phénoxyéthanol | 0.35 |
| Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer (Carbopol® Ultrez 21) | 0.4 |
| Polyacrylate-13 & Polyisobutène & Polysorbate 20 & Eau (Sepiplus™ 400) | 1 |
| Glycéryl Stéarate & PEG-100 Stéarate (Simulsol™ 165) | 4 |
| Alcool Cétylique | 1 |
| Triglycérides Capryliques/Capriques (Myritol® 318) | 10 |
| Diméthicone (DC 200) | 4 |
| Isododécane | 4 |
| Hyaluronate de sodium 60-120 kDa selon l'invention | 0.5 |
| Ascophyscient® | 0.3 |
| Rétinaldéhyde | 0.05 |
| Parfum | 0.1 |

REVENDEICATIONS

1. Association comprenant un acide hyaluronique ou un de ses sels et un polysaccharide sulfaté dont le poids moléculaire est compris entre 5 et 25 kDa
5 choisi parmi les fucanes sulfatés et les ulvanes sulfatés.
2. Association selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide hyaluronique ou un de ses sels a une masse moléculaire moyenne en poids comprise entre 50 et 750 kDa.
10
3. Association selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite masse moléculaire moyenne en poids est comprise entre 60 et 120 kDa.
4. Association selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le
15 polysaccharide sulfaté dont le poids moléculaire est compris entre 5 et 25 kDa est un fucane sulfaté.
5. Association selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le ratio massique acide hyaluronique / polysaccharide est compris entre 0,1 et 10.
20
6. Association selon l'une des revendications 1 à 5, pour son utilisation topique destinée à favoriser la prolifération des fibroblastes.
7. Utilisation topique d'une association selon l'une des revendications 1 à 5 pour
25 lutter contre les signes du vieillissement cutané.
8. Association selon l'une des revendications 1 à 5, pour son utilisation topique destinée à traiter les lésions cutanées.
- 30 9. Association selon l'une des revendications 1 à 5, pour son utilisation topique destinée à améliorer la cicatrisation et la récupération cutanées.

10. Composition dermatologique ou cosmétique comprenant à titre de principe actif une association selon l'une des revendications 1 à 5, avec au moins un excipient dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.
- 5 11. Composition selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un autre principe actif.
12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'autre principe actif est choisi parmi des agents anti-âge, cicatrisants, apaisants, antiprurit, anti-radicalaires, anti-UV, stimulant la synthèse de macromolécules dermiques ou le métabolisme énergétique, hydratants, dépigmentants, antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires, anesthésiques et leurs mélanges.
- 10 13. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'autre principe actif est du rétinaldéhyde.
- 15 14. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'autre principe actif est du delta tocophéryl glucopyranoside.
- 20 15. Utilisation cosmétique de la composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 pour lutter contre les signes du vieillissement cutané.
- 25 16. Composition dermatologique selon la revendication 10, pour son utilisation dans le traitement des coupures, des sutures, des écorchures, des éraflures, des égratignures, des cicatrices post-chirurgie ou post-acte de dermatologie esthétique, des brûlures superficielles, des coups de soleil.

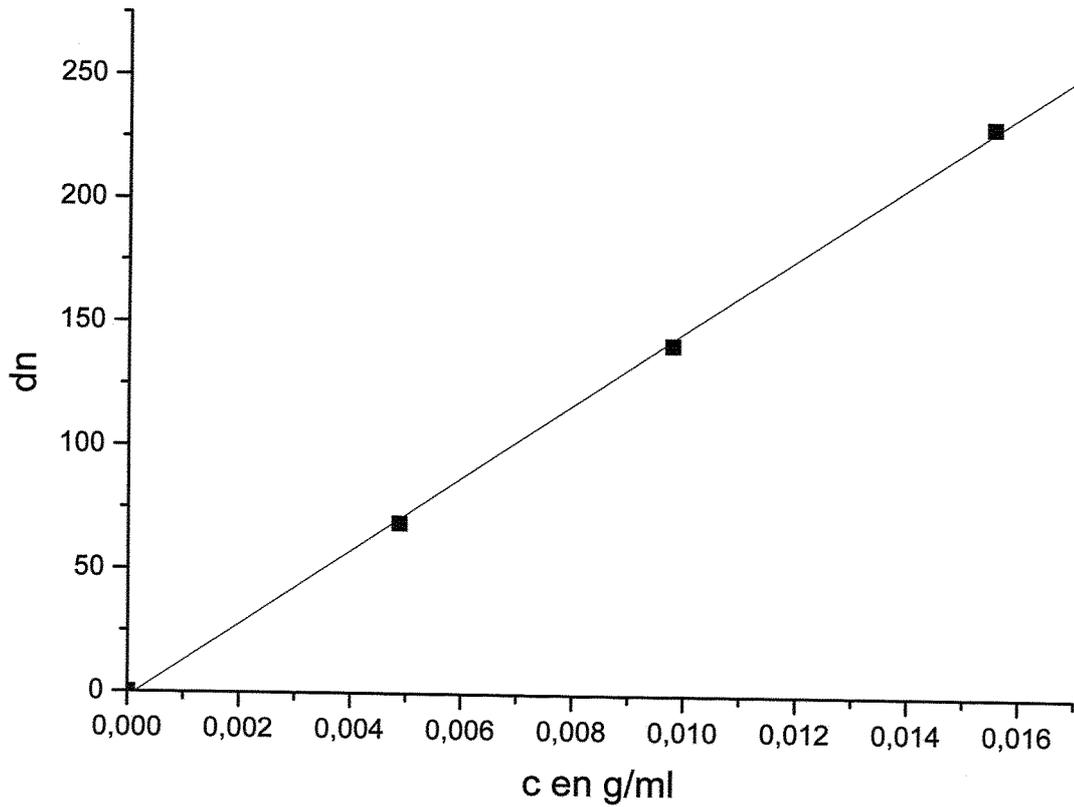


FIGURE 1

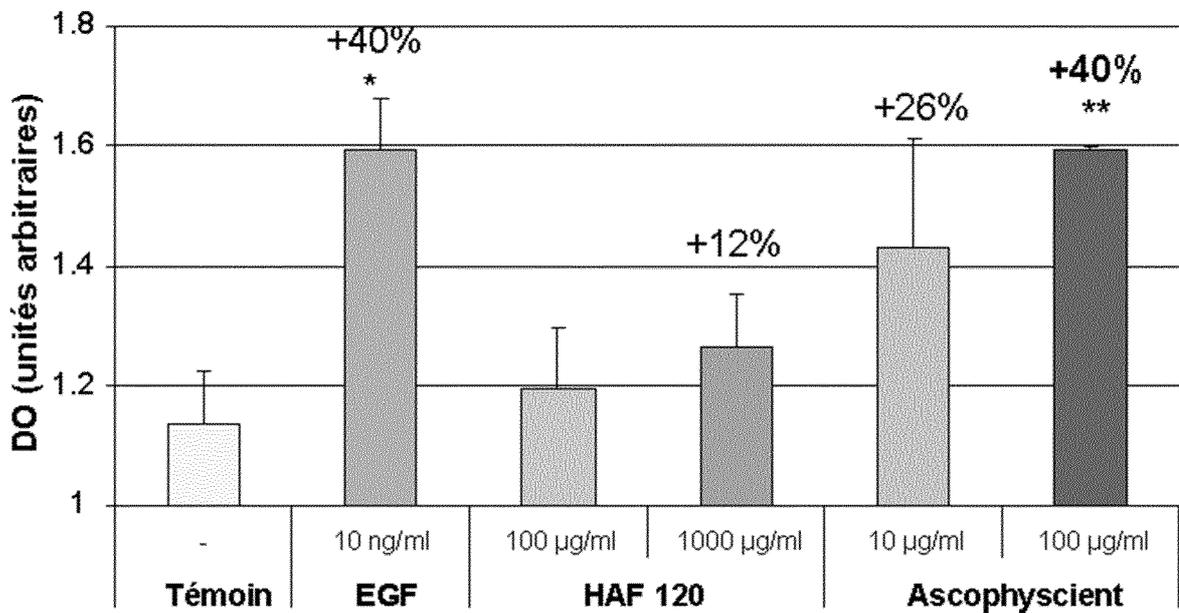


FIGURE 2

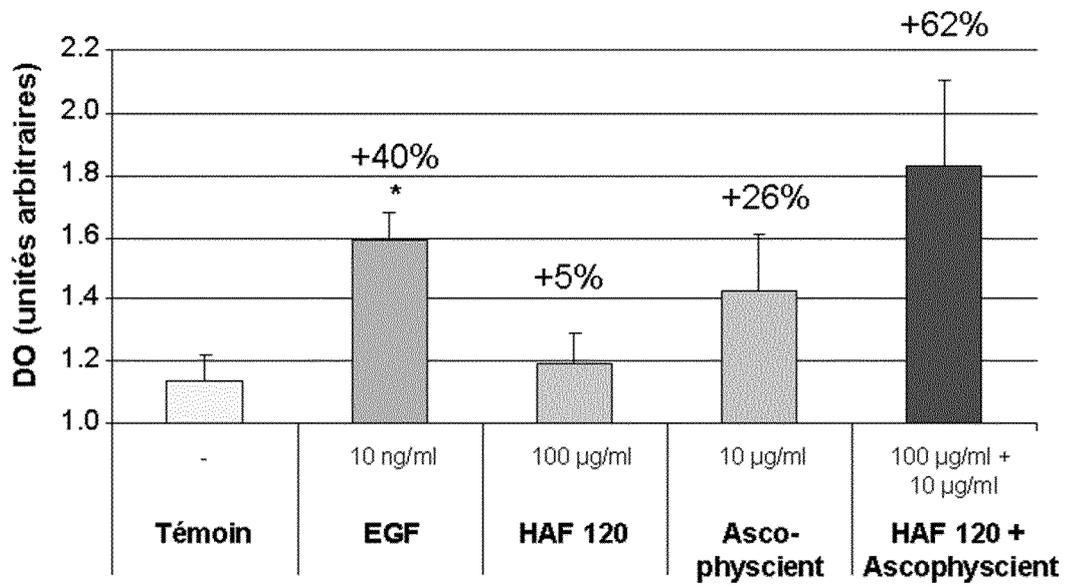


FIGURE 3

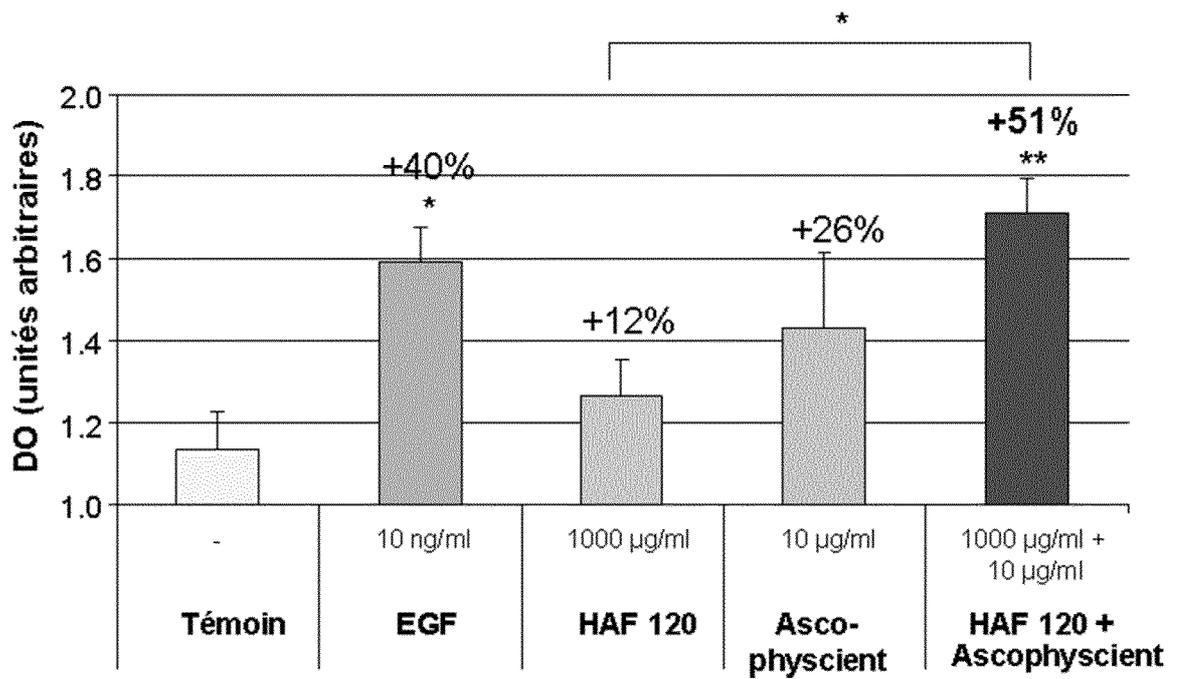


FIGURE 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/059544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K8/73 A61K31/715 A61K31/727 A61K31/728 A61K31/737
 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)
 A61K
 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, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | WO 2008/071245 A1 (FARCO GMBH [DE]; VESTWEBER ANNA-MARIA [DE]) 19 June 2008 (2008-06-19) page 5 - page 13; claims 1-24 ----- | 1-16 |
| A | WO 2013/150253 A1 (GREENTECH [FR]) 10 October 2013 (2013-10-10) examples 1-4 ----- | 1-16 |
| Y | WO 2013/017807 A1 (PETCARE INNOVATION [FR]; ALLART JEAN-CLAUDE [FR]; LEFEVRE JEAN-MARIE [FR]) 7 February 2013 (2013-02-07) page 1 - page 11; claims 1-11 ----- | 1-16 |
| Y | WO 2008/068297 A1 (FABRE PIERRE DERMO COSMETIQUE [FR]; PIRON ESTELLE [FR]) 12 June 2008 (2008-06-12) page 1 - page 10; claims 1-18 ----- | 1-16 |
| | -/-- | |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

| | |
|---|---|
| <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> |
|---|---|

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search 2 July 2015 | Date of mailing of the international search report 13/07/2015 |
|--|--|

| | |
|--|---|
| 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 Kling, Isabelle |
|--|---|

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/059544

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | US 2009/286756 A1 (CIANCIA MARINA [AR] ET AL) 19 November 2009 (2009-11-19) the whole document ----- | 1-16 |
| Y | US 6 572 868 B1 (COPE SANDRA E [US]) 3 June 2003 (2003-06-03) page 1 - page 2; claims 1-14 ----- | 1-16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/059544

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|--|--|
| WO 2008071245 A1 | 19-06-2008 | DE 202007001059 U1 WO 2008071245 A1 | 07-02-2008 19-06-2008 |
| WO 2013150253 A1 | 10-10-2013 | EP 2833863 A1 FR 2989087 A1 JP 2015515524 A KR 20150002659 A WO 2013150253 A1 | 11-02-2015 11-10-2013 28-05-2015 07-01-2015 10-10-2013 |
| WO 2013017807 A1 | 07-02-2013 | CA 2842577 A1 EP 2739275 A1 EP 2739276 A1 FR 2978664 A1 FR 2978665 A1 US 2014271881 A1 WO 2013017807 A1 WO 2013017808 A1 | 07-02-2013 11-06-2014 11-06-2014 08-02-2013 08-02-2013 18-09-2014 07-02-2013 07-02-2013 |
| WO 2008068297 A1 | 12-06-2008 | AR 064175 A1 AU 2007328917 A1 BR PI0720176 A2 CA 2671793 A1 CN 101594892 A EP 2152329 A1 EP 2489374 A1 FR 2909560 A1 IL 199002 A JP 5642388 B2 JP 2010511454 A KR 20090085102 A KR 20140101018 A MA 30978 B1 NZ 577917 A RU 2009125201 A TW 200836778 A UA 95660 C2 US 2010316683 A1 WO 2008068297 A1 ZA 200903919 A | 18-03-2009 12-06-2008 24-12-2013 12-06-2008 02-12-2009 17-02-2010 22-08-2012 13-06-2008 31-01-2013 17-12-2014 15-04-2010 06-08-2009 18-08-2014 01-12-2009 12-01-2012 20-01-2011 16-09-2008 25-08-2011 16-12-2010 12-06-2008 30-06-2010 |
| US 2009286756 A1 | 19-11-2009 | US 2009286756 A1 US 2011034409 A1 | 19-11-2009 10-02-2011 |
| US 6572868 B1 | 03-06-2003 | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2015/059544

| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K8/73 A61K31/715 A61K31/727 A61K31/728 A61K31/737 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) A61K | | |
| 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, WPI Data, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | WO 2008/071245 A1 (FARCO GMBH [DE]; VESTWEBER ANNA-MARIA [DE]) 19 juin 2008 (2008-06-19) page 5 - page 13; revendications 1-24 ----- | 1-16 |
| A | WO 2013/150253 A1 (GREENTECH [FR]) 10 octobre 2013 (2013-10-10) exemples 1-4 ----- | 1-16 |
| Y | WO 2013/017807 A1 (PETCARE INNOVATION [FR]; ALLART JEAN-CLAUDE [FR]; LEFEVRE JEAN-MARIE []) 7 février 2013 (2013-02-07) page 1 - page 11; revendications 1-11 ----- | 1-16 |
| Y | WO 2008/068297 A1 (FABRE PIERRE DERMO COSMETIQUE [FR]; PIRON ESTELLE [FR]) 12 juin 2008 (2008-06-12) page 1 - page 10; revendications 1-18 ----- | 1-16 |
| | -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents | | <input checked="" type="checkbox"/> 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 2 juillet 2015 | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13/07/2015 |
| 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 Kling, Isabelle |

| C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie* | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| Y | US 2009/286756 A1 (CIANCIA MARINA [AR] ET AL) 19 novembre 2009 (2009-11-19) le document en entier ----- | 1-16 |
| Y | US 6 572 868 B1 (COPE SANDRA E [US]) 3 juin 2003 (2003-06-03) page 1 - page 2; revendications 1-14 ----- | 1-16 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2015/059544

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|--|--|
| WO 2008071245 A1 | 19-06-2008 | DE 202007001059 U1 WO 2008071245 A1 | 07-02-2008 19-06-2008 |
| WO 2013150253 A1 | 10-10-2013 | EP 2833863 A1 FR 2989087 A1 JP 2015515524 A KR 20150002659 A WO 2013150253 A1 | 11-02-2015 11-10-2013 28-05-2015 07-01-2015 10-10-2013 |
| WO 2013017807 A1 | 07-02-2013 | CA 2842577 A1 EP 2739275 A1 EP 2739276 A1 FR 2978664 A1 FR 2978665 A1 US 2014271881 A1 WO 2013017807 A1 WO 2013017808 A1 | 07-02-2013 11-06-2014 11-06-2014 08-02-2013 08-02-2013 18-09-2014 07-02-2013 07-02-2013 |
| WO 2008068297 A1 | 12-06-2008 | AR 064175 A1 AU 2007328917 A1 BR PI0720176 A2 CA 2671793 A1 CN 101594892 A EP 2152329 A1 EP 2489374 A1 FR 2909560 A1 IL 199002 A JP 5642388 B2 JP 2010511454 A KR 20090085102 A KR 20140101018 A MA 30978 B1 NZ 577917 A RU 2009125201 A TW 200836778 A UA 95660 C2 US 2010316683 A1 WO 2008068297 A1 ZA 200903919 A | 18-03-2009 12-06-2008 24-12-2013 12-06-2008 02-12-2009 17-02-2010 22-08-2012 13-06-2008 31-01-2013 17-12-2014 15-04-2010 06-08-2009 18-08-2014 01-12-2009 12-01-2012 20-01-2011 16-09-2008 25-08-2011 16-12-2010 12-06-2008 30-06-2010 |
| US 2009286756 A1 | 19-11-2009 | US 2009286756 A1 US 2011034409 A1 | 19-11-2009 10-02-2011 |
| US 6572868 B1 | 03-06-2003 | AUCUN | |