RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 517 315**
(A n'utiliser que pour les commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21) **N° 81 22691**

(54) **Procédé de préparation de formes nouvelles de collagène, natif ou déréticulé, à structure hélicoïdale préservée, associées à des mucopolysaccharides et leurs applications notamment dans les domaines cosmétologiques, pharmaceutiques, analytiques et autres.**

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). **C 08 H 1/00; A 61 F 1/00; A 61 K 7/00, 31/73, 37/12 A 61 L 15/00; C 12 N 11/02.**

(22) Date de dépôt ..... 30 novembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande ..... B.O.P.I. — « Listes » n° 22 du 3-6-1983.

(71) Déposant : CENTRE TECHNIQUE DU CUIR. — FR.

(72) Invention de : Alain Roger Huc, Roland Louis Allard et Christian Louis Chavrier.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Germain et Maureau, Le Britannia, tour C, 20, bd E.-Déruelle, 69003 Lyon.

La présente invention concerne un procédé de préparations de formes nouvelles de collagène, natif ou déréticulé, à structure hélicoïdale préservée, associées à des mucopolysaccharides, ainsi que les compositions obtenues par mise en oeuvre dudit procédé et leurs applications notamment dans les domaines cosmétologiques, pharmaceutiques, analytiques et autres.

Les tissus conjonctifs, et la peau en particulier, sont constitués principalement de collagène. Cette protéine est donc responsable en grande partie de l'état de la peau. Au cours du vieillissement, le collagène se réticule -on dit qu'il se polymérise- et la peau se ride, tout en perdant son élasticité. L'apport de collagène jeune, à structure hélicoïdale préservée, peut pallier, du moins en partie, à ce processus de vieillissement.

Par ailleurs, le derme de la peau renferme deux autres types de macromolécules, qui sont l'élastine et les protéoglycanes . Alors que la première remplit un rôle qui lui est propre en ne réagissant pas avec le collagène, les secondes peuvent avoir une influence sur les propriétés de la peau par l'intermédiaire de leurs interactions avec le collagène.

Les protéoglycanes sont des macromolécules constituées d'acide hyaluronique et de substances protéiques, sur lesquelles sont branchés les glycosaminoglycanes , polymères de masse moléculaire d'environ 50.000 constitués d'acide uronique et d'héxosamines, que l'on appelle également mucopolysaccharides.

D'après "O. BRINK, COLSTON PAP., 26(Struct. Fibrous Biopolym), 1975, 81-92", les interactions des protéoglycanes avec le collagène sont de deux types : exclusion stérique et liaisons électrostatiques. La première intéraction est due à la taille importante des protéoglycanes et elle n'apparait pratiquement pas dans le cas des glycosaminoglycanes . La deuxième intéraction, par contre, due aux charges électrostatiques, existe aussi bien avec les protéoglycanes qu'avec les glycosaminogly-

canes . D'autres auteurs ont également étudiés le mécanisme de ces interactions : [TC LAURENT, COLSTON PAP, 26 (Struct. Fibrous Biopolym.), 1975, 27-33], [A. HUC, P. MANN-SCHOTT, D. HERBAGE et M. WEISS (1975) in Protides of Biological Fluids, 22nd colloquium (H. PEETERS éd.), p. 91, Pergamon Press, OXFORD and NEW-YORK], [D. HERBAGE, J.M. LUCAS, A. HUC, Biochim. Biophys. Acta, 336 (1974) 108-116]. Certains auteurs ont mis en évidence leur influence sur les propriétés mécaniques des tissus [(JACKSON et BENTLEY (1968) in Treatise on collagen, (GOULD B.S. éd.), vol. 2 A, p. 189, Academic Press, NEW-YORK]. Enfin, les glycosaminoglycanes comportant de nombreux groupements chargés sont entourés d'une grande quantité d'eau, qui confère au tissu une partie de sa souplesse. L'action des glycosaminoglycanes sur la peau peut ainsi être résumée selon les trois critères suivants :

- Protection de la structure native du collagène,
- Influence sur les propriétés mécaniques des tissus,
- Hydratation de la peau.

On voit donc l'intérêt de l'association des glycosaminoglycanes avec le collagène pour de nombreuses applications.

On sait par ailleurs que le collagène a la propriété de passer partiellement en solution aqueuse, sous l'action d'agents organiques ou minéraux. Néanmoins, sa solubilité reste faible et il n'est possible de mettre en solution qu'une fraction relativement faible de collagène, en général en milieu acide.

De nombreuses méthodes ont été proposées dans le but, non seulement d'extraire les fractions solubles du collagène, mais aussi d'augmenter la solubilité de la partie insoluble. Ces méthodes sont généralement basées sur le prétraitement des matières premières à l'aide d'agents chimiques ou d'enzymes plus ou moins spécifiques.

D'autres solutions préconisées consistent à utiliser, par exemple, l'action de la chaleur en milieu aqueux, mais dans ce cas, il se produit une dénaturation du collagène en gélatine, voire même une certaine hydrolyse

du collagène, aboutissant à la rupture des liaisons transversales de la molécule et à la destruction de la structure hélicoïdale du collagène.

En règle générale, les fractions solubles du collagène en milieu aqueux ont des valeurs de pH inférieures ou égales à 4. Dans certains cas cette acidité peut présenter des inconvénients majeurs pour l'utilisation du collagène soluble, dans la mesure où ces valeurs de pH sont inférieures au pH physiologique. Cela peut être le cas pour des applications cosmétiques, dermatologiques et même thérapeutiques.

Or, on sait que le collagène a un point isoélectrique voisin du pH physiologique et que la neutralisation de fractions solubles du collagène provoque généralement une précipitation. Seules de très faibles quantités peuvent rester solubilisées dans des solutions tampons , diminuant d'autant l'intérêt de leur utilisation.

De même, lorsque des mucopolysaccharides comme par exemple de l'acide chondroïtine-4-sulfate ou de l'acide chondroïtine-6-sulfate sont ajoutésen quantités assez importantes à une solution aqueuse de collagène natif, la protéine collagénique précipite, du fait des interactions physiques qui s'établissent entre les deux composés.

On a déjà proposé d'associer le collagène à des mucopolysaccharides pour certains traitements dermatologiques. C'est ainsi que le brevet français 2 362 632 propose d'incorporer à du sérum une certaine quantité de glycoaminoglycanes et de collagène, en même temps que des agents facilitant la lipolyse des tissus adipeux, mais aucune indication ne permet de réaliser cette association collagène/glycoaminoglycanes sous forme de solutions limpides ou de gels homogènes, toutes les proportions étant indiquées en "principe actif sec".

On a également proposé (brevet français 2 332 863) de réaliser la première couche d'une membrane multicouche destinée à la réalisation de peaux synthétiques à l'aide d'un composite réalisé par mise en contact intime de

collagène et d'un mucopolysaccharide suivie d'une réticulation de l'ensemble. Il est toutefois précisé que le produit de réaction coprécipite dans le milieu aqueux dans lequel il se forme ce qui, bien évidemment, ne permet pas de disposer de solutions limpides ou de gels homogènes.

La présente invention vise à pallier ces inconvénients en proposant un procédé qui permet de réaliser sous forme de solutions limpides ou de gels homogènes l'association des glycosaminoglycanes avec du collagène déréticulé ou natif tout en conservant la structure hélicoïdale et les propriétés physiques et chimiques dudit collagène.

C'est ainsi que l'invention a pour objet un procédé de préparation de compositions résultant de l'association de collagène et de mucopolysaccharides et dont l'originalité consiste en ce que l'on met en présence du collagène, éventuellement déréticulé, sous forme de suspension homogène ou de solution avec une solution de glycosaminoglycane et que l'on porte le pH du mélange à 7.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le collagène est tout d'abord déréticulé par contact prolongé du tissu collagénique avec une solution de soude à pH 14 et l'association est obtenue sous forme de solution limpide.

Selon un autre mode de réalisation, le collagène utilisé est du collagène natif sous forme de gel obtenu à partir de fibres déshydratées, et l'association est obtenue sous forme de gel homogène.

La concentration en collagène est de préférence le double de la concentration en glycosaminoglycane.

L'invention concerne également les compositions obtenues par mise en oeuvre du procédé selon l'invention ainsi que leurs différentes formes de présentations telles que solutions, poudres, éponges, films, tubes, crins, etc... ainsi que leurs applications notamment dans les domaines cosmétiques, pharmaceutiques, vétérinaires et thérapeutiques, telles qu'en paradontologie et chirurgie osseuse, et en tant que pansements hémostatiques et cicatriciels, ainsi que dans les domaines analytiques et notamment comme supports de

molécules actives telles que des enzymes.

La présente invention sera mieux comprise d'ailleurs et ses avantages ressortiront bien des exemples suivants de deux modes de réalisation qui l'illustrent sans toutefois la limiter.

Exemple 1 - Préparation d'une solution limpide d'une composition à base de collagène déréticulé et de chondroïtine-4-sulfate

a) Préparation de l'acide chondroïtine-4-sulfate à partir des cloisons nasales de bovins

Les cloisons nasales fraiches sont tout d'abord lavées soigneusement dans une solution de chlorure de sodium 9 pour 1000. Elles sont ensuite hachées et broyées. Le broyat est alors placé à raison de 1 kg par litre dans une solution de potasse 0,5 N. Après agitation, l'ensemble est laissé au repos à température ambiante pendant 24 h. Au bout de ce laps de temps, le surnageant est séparé des matières insolubles par centrifugation à 30.000 g pendant 50 mn. De l'acide acétique pur est ajouté au surnageant pour neutraliser la soude. La solution est alors concentrée cinq fois par évaporation sous vide. Le concentrat est versé dans un volume trois fois supérieur d'éthanol. Le précipité récupéré par décantation est dissous dans l'eau permutée. L'acide chondroïtine-4-sulfate est obtenu par lyophilisation de cette solution.

b) Préparation du collagène déréticulé

Des peaux de veaux provenant d'animaux fraichement abattus sont tout d'abord lavées à l'eau du robinet par brassage pendant une heure dans un foulon.

Le système pileux et le tissu sous-cutané sont séparés du derme à l'aide d'une refendeuse à bande rotative. Le derme récupéré est haché et broyé. Le broyat est lavé par trois bains successifs de tampon phosphate (pH 7,8). Entre chaque bain, le broyat est séparé de la solution par centrifugation en continu à 4000 t/mn. Le résidu est alors rincé par deux bains successifs d'eau permutée et le liquide est séparé du broyat de la même façon que dans les

opérations précédentes. Ces premiers traitements servent à éliminer les substances non collagéniques. Le tissu est alors placé dans une cuve contenant une solution de soude à pH 14. Après agitation pendant une demi-heure environ, l'ensemble est laissé au repos pendant huit jours. Le milieu est ensuite acidifié par l'acide chlorhydrique jusqu'à obtention d'un pH de 2. Dans le mélange obtenu, du chlorure de sodium est ajouté jusqu'à obtention d'une concentration de 10 %. Le collagène précipité est dialysé contre de l'eau permutée stérile.

c) Préparation de la solution limpide d'une composition selon l'invention.

Le gel de collagène dialysé à une concentration de 1,2 %, est dilué à raison de deux fois par une solution contenant 0,6 % de l'acide chondroïtine-4-sulfate préparé en a), additionnée de 0,4 % d'un produit conservateur tel que celui commercialisé sous la dénomination Phénonip. On ajoute à ce mélange une solution de soude 0,1 N jusqu'à ce que le pH du mélange soit égal à 7. A ce moment, on obtient une solution limpide dans laquelle la concentration en collagène est de 0,6 % et celle de glycosaminoglycane de 0,4 %.

La solution ainsi obtenue peut être incorporée par exemple dans une crème cosmétique.

D'autres applications cosmétiques (masques pour le visage), pharmaceutiques ou thérapeutiques (paradontologie, chirurgie osseuse...) analytiques (supports de molécules actives et notamment d'enzymes) imposent toutefois de disposer de la composition selon l'invention sous forme de gel homogène pouvant être ensuite facilement transformé en formes facilement utilisables telles qu'éponges, comme décrit dans l'exemple 2.

Exemple 2 - Préparation d'un gel homogène selon l'invention

a) Préparation de l'acide chondroïtine-6-sulfate

On prépare cet acide à partir d'ailerons de requins selon le processus décrit en a) dans l'exemple 1.

b) Préparation d'une suspension homogène de collagène

On prépare une pâte de collagène à partir de peaux d'origine animale par broyage suivi de malaxage en présence d'acides organiques chlorés selon le processus décrit dans le brevet français n° 1 568 829 de la demanderesse. Cette pâte est diluée à l'eau de façon à obtenir une concentration de 1 % en collagène. La protéine contenue dans la solution est précipitée par du chlorure de sodium à 10 %. Les fibres obtenues sont séparées du surnageant par centrifugation en continu à 4000 t/mn. Elles sont ensuite déshydratées par séjour dans trois bains successifs d'acétone. Le séchage des fibres est effectué par chauffage à 30°C dans une étuve ventilée.

Ces fibres sont placées dans un bain d'eau permutée à une concentration de 2g/l. Après agitation pendant une heure, un gel est obtenu.

c) <u>Préparation d'un gel homogène de la composition selon l'invention</u>

On ajoute au gel un volume égal d'une solution à 1g/l d'acide chondroïtine-6-sulfate préparé en a). Le gel à tendance à se casser et une dispersion est obtenue. Une solution de soude 0,1 N est alors versée sous agitation dans le mélange jusqu'à obtention d'un pH égal à 7. La dispersion se transforme alors à nouveau en un gel homogène.

On peut ensuite transformer ce gel par exemple en éponge.

On place le gel dans un plateau en quantité telle que son épaisseur soit inférieure à 10 mm.

Une opération de lyophilisation ultérieure permet d'obtenir une éponge sur le plateau.

Les éponges ainsi obtenues ayant une composition assez voisine du tissu de soutien de l'os favorisent l'ostéogénèse quand elles sont placées dans des cavités osseuses en facilitant la réhabilitation de ces cavités par les ostéocytes. Elles trouvent donc des applications en paradontologie et en chirurgie osseuse.

Comme il va de soi et comme il ressort de ce qui précède, la présente invention ne se limite pas aux deux seuls modes de réalisation présentés à titre d'exemples ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes, quelle que soit notamment la forme de présentation des compositions obtenues par mise en oeuvre du procédé : poudres, éponges, films, tubes, crins ou autres...

- REVENDICATIONS -

1 - Procédé de préparation de compositions résultant de l'association de collagène et de mucopolysaccharides, caractérisé en ce que l'on met en présence du collagène éventuellement déréticulé, sous forme de suspension homogène ou de solution, avec une solution de glycosaminoglycane et que l'on porte le pH du mélange à 7.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration en collagène est le double de la concentration en glycosaminoglycane.

3 - Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le collagène est tout d'abord déréticulé par contact prolongé du tissu collagénique avec une solution de soude à pH 14 et que l'association est obtenue sous forme de solution limpide.

4 - Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le collagène utilisé est du collagène natif sous forme de gel obtenu à partir de fibres déshydratées et que l'association est obtenue sous forme de gel homogène.

5 - Compositions obtenues par mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ainsi que leurs différentes formes de présentations telles que solutions, poudres, éponges, films, tubes, crins, etc...

6 - Applications des compositions selon la revendication 5 notamment dans les domaines cosmétiques, pharmaceutiques, vétérinaires et thérapeutiques, telles que par exemple en paradontologie, en chirurgie osseuse et en tant que pansements hémostatiques et cicatriciels, ainsi que dans les domaines analytiques et notamment comme supports de molécules actives telles que des enzymes.