

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



A standard linear barcode is located at the bottom of the page, spanning most of the width.

(43) Date de la publication internationale
24 janvier 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/009859 A2

- (51) Classification internationale des brevets :**
G01N 33/50 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

- AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/051686

- (22) Date de dépôt international : 18 juillet 2007 (18.07.2007)

- (25) Langue de dépôt : français

- (—) ——g—n—t—i—l—s—

- (30) Données relatives à la priorité :**

- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **GAL-DERMA RESEARCH & DEVELOPMENT [FR/FR]**; 2400 Route des Colles, Les Templiers, F-06410 Biot (FR)

- (72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : LABRIE,
Fernand [CA/CA]; 2989, de la Promenade, Quebec, G1W
2J5 (CA).

- (74) **Mandataire : ANDRAL, Christophe**; L'Oreal, River Plaza - DIPI, 25-29 Quai Aulagnier, F-92665 Asnieres-sur-seine (FR).

- (81) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,

(84) **États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
 - avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MODULATORS OF SCARB-1 IN THE TREATMENT OF ACNE OR OF HYPERSEBORRHOEA

(54) Titre : MODULATEURS DE SCARB-1 DANS LE TRAITEMENT DE L'ACNÉ OU DE L'HYPERSÉBORRHÉE

(57) Abstract: The invention relates to an *in vitro* method of screening for candidate compounds for the preventive or curative treatment of acne, comprising the determination of the ability of a compound to modulate the expression or the activity of the SCARB-1 receptor, and also to the use of modulators of the expression or of the activity of this receptor for the treatment of acne or of skin disorders associated with hyperseborrhoea. The invention also relates to methods for the diagnosis or prognosis, *in vitro*, of these pathologies.

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif ou curatif de l'acné, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du récepteur SCARB-1, ainsi que l'utilisation de modulateurs de l'expression ou de l'activité de ce récepteur pour le traitement de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. L'invention concerne aussi des méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro* de ces pathologies.

Modulateurs de SCARB-1 dans le traitement de l'acné ou de l'hyperséborrhée

L'invention concerne l'identification et l'utilisation de composés modulateurs du récepteur SCARB-1, pour le traitement de l'acné, ainsi que des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. Elle concerne aussi des méthodes de diagnostic *in vitro* ou pronostic *in vitro* de ces pathologies.

Une peau grasse hyperséborrhéique est caractérisée par une sécrétion et une excrétion exagérées de sébum. Classiquement, un taux de sébum supérieur à 200 μ g/cm² mesuré au niveau du front est considéré comme caractéristique d'une peau grasse. Une peau grasse est souvent associée à un défaut de desquamation, un teint luisant, un grain de peau épais. En plus de ces désordres esthétiques, l'excès de sébum peut servir de support au développement anarchique de la flore bactérienne saprophyte (*P. acnes* en particulier), et provoquer l'apparition de comédons et/ou de lésions acnéiques.

Cette stimulation de la production de glandes sébacées est induite par les androgènes. L'acné est, de fait, une maladie chronique du follicule pilosébacé sous dépendance hormonale. Une thérapie hormonale contre l'acné est une possibilité de traitement pour les femmes, le but étant de s'opposer aux effets des androgènes sur la glande sébacée. Dans ce cadre on utilise généralement des oestrogènes, des anti-androgènes, ou des agents diminuant la production d'androgènes par les ovaires ou la glande surrénale. Les anti-androgènes utilisés pour le traitement de l'acné incluent notamment la spironolactone, l'acétate de cyprotérone, et le flutamide. Cependant, ces agents présentent des effets secondaires sévères. Ainsi, toute grossesse doit être absolument empêchée, du fait notamment d'un risque de féminisation pour le fœtus mâle. Ces agents sont prohibés chez les patients masculins.

Il existe donc un besoin d'identifier des médiateurs en aval de l'action des hormones stéroïdiennes, et de les moduler, pour obtenir un profil thérapeutique similaire, mais avec des effets secondaires réduits.

La demanderesse a maintenant découvert que le gène codant pour le récepteur SCARB-1 était exprimé dans les glandes sébacées humaines, et que son expression était régulée par les androgènes, *in vivo*, dans un modèle de glande préputiale de souris. Elle propose dès lors de cibler le gène SCARB-1 ou son produit d'expression, pour prévenir ou améliorer les phénomènes d'acné, ainsi que les désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, notamment l'aspect de peau grasse.

Par acné, on entend toutes les formes d'acné, à savoir notamment les acnés vulgaires, comédoniennes, polymorphes, les acnés nodulokystiques, conglobata, ou encore les acnés secondaires telles que l'acné solaire, médicamenteuse ou professionnelle.

- 5 La demanderesse propose également des méthodes de diagnostic, *in vitro* ou pronostic *in vitro*, basées sur la détection du niveau d'expression ou d'activité du SCARB-1.

SCARB-1

Les récepteurs éboueurs ("scavengers") sont des protéines de surface cellulaire, qui sont 10 typiquement trouvées sur les macrophages et qui se lient à divers types de lipoprotéines modifiées, telles que les lipoprotéines de basse densité (LDL). Cette famille de récepteurs transmembranaires, qui présente une grande diversité structurelle, est impliquée dans l'endocytose et la phagocytose des cellules apoptotiques et des bactéries, ainsi que dans 15 l'adhésion cellulaire. Ces récepteurs interviendraient aussi dans le dépôt du LDL cholestérol des macrophages au niveau des parois des artères coronaires, au cours des premières phases de la formation d'une plaque d'athérosclérose.

SCARB-1 ("scavenger receptor class B, member 1", désigné également SRB-1, ou Cla-1) appartient à la famille des récepteurs "éboueurs" ("scavengers"), de classe B, et est un 20 récepteur des lipoprotéines de haute-densité, qui médie l'incorporation de cholestérol dans les cellules. SRB-1 peut aussi servir de récepteur à des lipoprotéines non-HDL et jouerait un rôle important dans le transport inverse du cholestérol. L'expression de ce gène serait induite par la testostérone dans des macrophages et des hépatocytes en culture (Langer et al, Biochem Biophys Res Commun. 2002, 296(5) :1051-1057). Millena et al (Mol Cell Endocrinol, 2004, 224(1-2) :29-39) ont, de leur côté, montré qu'une 25 augmentation de la production androgénique en réponse au TGF β était associée à des niveaux élevés d'ARNm de SCARB-1.

Dans le contexte de l'invention, le terme « gène SCARB-1 » ou « acide nucléique SCARB-1 » signifie le gène ou la séquence nucléique codant pour un récepteur transmembranaire SCARB-1. Si la cible visée est de préférence le gène humain ou son 30 produit d'expression, l'invention peut également faire appel à des cellules exprimant un récepteur SCARB-1 hétérologue, par intégration génomique ou expression transitoire d'une séquence d'acides nucléiques exogène codant pour l'enzyme (par exemple une enzyme d'un autre organisme).

Une séquence d'ADNc humain de SCARB-1 est reproduite en annexe (SEQ ID No.1). Il 35 s'agit de la séquence NM005505 dont la partie codante se situe de l'acide nucléique 70 à 1599.

Applications diagnostiques

Un objet de l'invention concerne une méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution de lésions acnéiques ou d'un désordre cutané associé à une hyperséborrhée 5 chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité du SCARB-1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle.

L'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de la protéine SCARB-1 10 par radioimmunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant, par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité du SCARB-1 peut être également envisagé.

Dans le cadre d'un diagnostic, le sujet « contrôle » est un sujet « sain ». 15 Dans le cadre d'un suivi de l'évolution des lésions acnéiques ou d'un désordre cutané lié à une hyperséborrhée, le « sujet contrôle » fait référence au même sujet à un temps différent, qui correspond de préférence au début du traitement (T₀). Cette mesure de la différence d'expression ou de l'activité du SCARB-1, ou d'expression de son gène ou d'activité d'au moins un de ses promoteurs, permet notamment de suivre l'efficacité d'un 20 traitement, notamment un traitement par un modulateur du SCARB-1, tel qu'envisagé plus haut ou par un autre traitement contre l'acné ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée. Un tel suivi peut conforter le patient quant au bien fondé, ou à la nécessité, de poursuivre ce traitement.

25 Un autre aspect de la présente invention concerne une méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer des lésions acnéiques ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité du SCARB-1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon 30 biologique d'un sujet contrôle.

Là encore, l'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de la protéine SCARB-1 par radioimmunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité du 35 SCARB-1 peut être également envisagé.

Le sujet testé est ici un sujet asymptomatique, ne présentant aucun trouble cutané lié à une hyperséborrhée ou une acné. Le sujet « contrôle », dans cette méthode, signifie un

sujet ou une population de référence « saine ». La détection de cette susceptibilité permet la mise en place d'un traitement préventif et/ou d'une surveillance accrue des signes liés à l'acné ou à un désordre cutané associé à une hyperséborrhée.

- 5 Dans ces méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro*, l'échantillon biologique testé peut être n'importe quel échantillon de liquide biologique ou un échantillon d'une biopsie. De préférence l'échantillon peut être néanmoins une préparation de cellules de la peau, obtenues par exemple par desquamation ou biopsie. Il peut également s'agir de sébum.

10

Méthodes de criblage

Un objet de l'invention est une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du récepteur SCARB-1 ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, ladite modulation indiquant l'utilité du composé pour le traitement préventif ou curatif de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. La méthode permet donc de sélectionner les composés capables de moduler l'expression ou l'activité du récepteur SCARB-1, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

20

Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant les étapes suivantes :

- 25 a. préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- b. mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
- c. mesure de l'expression ou de l'activité de la protéine SCARB-1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- 30 d. sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité de la protéine SCARB-1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b), par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.

Par « modulation », on entend tout effet sur l'expression ou l'activité du récepteur, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, à savoir éventuellement une stimulation (c'est à dire une activité agoniste), mais de préférence 5 une inhibition, partielle ou complète (c'est à dire une activité antagoniste). La différence d'expression obtenue avec le composé testé par rapport à un contrôle réalisé en l'absence du composé est significative à partir de 25% ou plus.

Dans l'ensemble du présent texte, à moins qu'il ne soit spécifié autrement, par « expression d'une protéine », on entend la quantité de cette protéine ;

10 Par « activité d'une protéine », on entend son activité biologique ;

Par « activité d'un promoteur », on entend la capacité de ce promoteur à déclencher la transcription de la séquence d'ADN codée en aval de ce promoteur (et donc indirectement la synthèse de la protéine correspondante).

15 Les composés testés peuvent être de tout type. Ils peuvent être d'origine naturelle ou avoir été produits par synthèse chimique. Il peut s'agir d'une banque de composés chimiques structurellement définis, de composés ou de substances non caractérisés, ou d'un mélange de composés.

Différentes techniques peuvent être mises en œuvre pour tester ces composés et 20 identifier les composés d'intérêt thérapeutique, modulateurs de l'expression ou de l'activité du récepteur SCARB-1.

Selon un premier mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du 25 promoteur du gène SCARB-1, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

Le gène rapporteur peut notamment coder pour une enzyme qui, en présence d'un substrat donné, conduit à la formation de produits colorés, telle que CAT (chloramphenicol acétyltransférase), GAL (beta galactosidase), ou GUS (beta 30 glucuronidase). Il peut également s'agir du gène de la luciférase ou de la GFP (Green Fluorescent Protein). Le dosage de la protéine codée par le gène rapporteur, ou de son activité, est réalisé classiquement, par des techniques colorimétriques, fluorométriques, ou de chimioluminescence, entre autres.

Selon un deuxième mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène SCARB-1, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène.

- 5 La cellule utilisée ici peut être de tout type. Il peut s'agir d'une cellule exprimant le gène SCARB-1 de manière endogène, comme par exemple une cellule de foie, une cellule ovarienne, ou encore mieux un sébocyte. On peut également utiliser des organes d'origine humaine ou animale, comme par exemple la glande préputiale, clitoridienne, ou encore la glande sébacée de la peau.
- 10 Il peut également s'agir d'une cellule transformée par un acide nucléique hétérologue, codant pour un récepteur SCARB-1, de préférence humain, ou de mammifère. Une grande variété de systèmes de cellules hôtes peut être utilisée, telle que par exemples les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. L'acide nucléique peut être transfecté de manière stable ou transitoire, par toute méthode
- 15 connue de l'homme du métier, par exemple par phosphate de calcium, DEAE-dextran, liposome, virus, électroporation, ou microinjection.

Dans cette méthode, l'expression de SCARB-1 peut être déterminée en mesurant le taux de transcription dudit gène, ou son taux de traduction.

- 20 Par taux de transcription d'un gène, on entend la quantité d'ARNm correspondant produite. Par taux de traduction d'un gène, on entend la quantité de protéine correspondante produite. L'homme du métier est familier des techniques permettant la détection quantitative ou semi-quantitative de l'ARNm d'un gène d'intérêt. Les techniques basées sur l'hybridation
- 25 de l'ARNm avec des sondes nucléotidiques spécifiques sont les plus usuelles (Northern Blot, RT-PCR, protection à la RNase). Il peut être avantageux d'utiliser des marqueurs de détection, tels que des agents fluorescents, radioactifs, enzymatiques ou autres ligands (par exemple, avidine/biotine).

- En particulier, l'expression du gène peut être mesurée par PCR en temps réel ou par
- 30 protection à la RNase. Par protection à la RNase, on entend la détection d'un ARNm connu parmi les ARN-poly(A) d'un tissu qui peut se faire à l'aide d'une hybridation spécifique avec une sonde marquée. La sonde est un ARN complémentaire marqué (radioactif) du messager à rechercher. Elle peut être construite à partir d'un ARNm connu dont l'ADNc, après RT-PCR, a été cloné dans un phage. De l'ARN-poly(A) du tissu où la
- 35 séquence est à rechercher est incubé avec cette sonde dans des conditions d'hybridation lente en milieu liquide. Il se forme des hybrides ARN:ARN entre l'ARNm recherché et la

sonde antisens. Le milieu hybridé est alors incubé avec un mélange de ribonucléases spécifiques de l'ARN simple brin, de telle sorte que seuls les hybrides formés avec la sonde peuvent résister à cette digestion. Le produit de digestion est ensuite déprotéinisé et repurifié, avant d'être analysé par électrophorèse. Les ARN hybrides marqués sont 5 détectés par autoradiographie.

Le taux de traduction du gène est évalué par exemple par dosage immunologique du produit dudit gène. Les anticorps utilisés à cet effet peuvent être de type polyclonal ou monoclonal. Leur production relève de techniques conventionnelles. Un anticorps 10 polyclonal anti-SCARB-1 peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin ou une souris, à l'aide de l'enzyme entière, prélèvement puis épuisement de l'antisérum selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier. Un anticorps monoclonal peut, entre autres, être obtenu par la méthode classique de Köhler et Milstein (Nature (London), 256: 495- 497 (1975)). D'autres méthodes de préparation d'anticorps 15 monoclonaux sont également connues. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique clone à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage ("phage display"), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage 20 (par exemple fUSE5 pour E.coli).

Le dosage immunologique peut être réalisé en phase solide ou en phase homogène; en un temps ou en deux temps; en méthode sandwich ou en méthode compétitive, à titre d'exemples non limitatifs. Selon un mode de réalisation préféré, l'anticorps de capture est immobilisé sur une phase solide. On peut utiliser, à titre d'exemples non limitatifs de 25 phase solide, des microplaques, en particulier des microplaques de polystyrène, ou des particules ou des billes solides, des billes paramagnétiques.

Des dosages ELISA, des radioimmunoessais, ou toute autre technique de détection peuvent être mis en oeuvre pour révéler la présence des complexes antigènes-anticorps formés.

30 La caractérisation des complexes antigène/anticorps, et plus généralement des protéines isolées ou purifiées mais également recombinantes (obtenues *in vitro* et *in vivo*) peut être réalisée par analyse en spectrométrie de masse. Cette identification est rendue possible grâce à l'analyse (détermination de la masse) des peptides générée par l'hydrolyse enzymatique des protéines (trypsine en générale). De façon générale, les protéines sont 35 isolées selon les méthodes connues de l'homme du métier, préalablement à la digestion enzymatique. L'analyse des peptides (sous forme d'hydrolysat) est effectuée par

séparation des peptides par HPLC (nano-HPLC) basé sur leurs propriétés physico-chimiques (phase inverse). La détermination de la masse des peptides ainsi séparés est réalisée par ionisation des peptides et soit par couplage direct au spectromètre de masse (mode electrospray ESI) soit après dépôt et cristallisation en présence d'une matrice connue de l'homme de l'art (analyse en mode MALDI). Les protéines sont ensuite identifiées grâce à l'utilisation d'un logiciel approprié (par exemple Mascot).

Selon un troisième mode de réalisation, l'étape a) décrite ci-dessus consiste à préparer des mélanges réactionnels comprenant chacun un récepteur SCARB-1 et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer la capacité de liaison du composé au récepteur et la modulation de son activité.

Le récepteur SCARB-1 peut être produit selon des techniques usuelles en utilisant les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Elle peut également être produite à l'aide de microorganismes tels que des bactéries (par exemple *E. coli* ou *B. subtilis*), des levures (par exemple *Saccharomyces*, *Pichia*) ou des cellules d'insecte, telles que Sf9 ou Sf21.

La mesure de l'activité se réfère à la détermination de l'activité d'adhésion cellulaire, activité de transporteur, d'activité apoptotique, d'activité dans le métabolisme lipidique, dans la transduction du signal et/ou dans la sécrétion de cytokine.

Un exemple de méthode de détection est présenté dans TIAN et al., Bio Env Sci, 2005, 18 :265-272. Cette méthode de détection de l'activité du récepteur est basée sur l'utilisation de lipoprotéines humaines marquées par fluorescence, les Dil-lipoprotéines (Dil-AcLDL et DilHDL). La mesure de la liaison des Dil-lipoprotéines est réalisée par incubation de cellules Sf9, préalablement transformées avec un baculovirus à une M.O.I (multiplicité d'infection) de 5 avec des baculovirus possédant ou non la séquence codante pour le récepteur SCARB1, dans 50 µL de milieu de culture Grace contenant 0,2% de BSA (sérumalbumine bovine) avec différentes concentrations de Dil-AcLDL et de Dil-HDL à température ambiante pendant quelques heures. Après incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec un tampon phosphate (PBS) froid, détachées avec une pipette et transférées sur une plaque contenant 100µL de PBS. Les résultats ont été quantifiés avec un lecteur de fluorescence de plaque. La mesure de l'activité de liaison spécifique du récepteur est faite par différence entre l'activité de liaison des cellules transformées avec le baculovirus n'exprimant pas le récepteur (contrôle) et l'activité de liaison les cellules transformées avec le baculovirus exprimant le récepteur.

Modulateurs du récepteur

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un modulateur du récepteur humain SCARB-1 susceptible d'être obtenu selon l'une des méthodes décrites ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou
5 des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.

Il est ainsi décrit ici une méthode de traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, méthode comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un modulateur du récepteur humain SCARB-1, à un patient nécessitant un tel traitement.

10 L'invention vise enfin l'utilisation cosmétique d'un modulateur du récepteur SCARB-1, pour le traitement esthétique des peaux grasses.

De manière préférentielle, le modulateur est un antagoniste du récepteur. Le terme « antagoniste » ou « inhibiteur » se réfère à un composé ou une substance chimique qui élimine ou réduit substantiellement l'activité du récepteur SCARB-1. Le terme
15 « substantiellement » signifie une réduction d'au moins 25%, de préférence d'au moins 35%, de préférence encore d'au moins 50%, et de manière plus préférée d'au moins 70% ou 90%. Plus particulièrement il peut s'agir d'un composé qui interagit avec, et bloque, la liaison du récepteur avec son ligand.

Un inhibiteur préféré interagit avec le récepteur en solution à des concentrations en
20 inhibiteur de moins de 1 μ M, de préférence moins de 0,1 μ M, de préférence encore moins de 0,01 μ M.

Le composé modulateur peut également être un polypeptide, un polynucléotide antisens d'ADN OU d'ARN, un si-ARN, ou un PNA ("Peptide nucleic acid", chaîne polypeptidique substituée par des bases puriques et pyrimidiques, dont la structure spatiale mime celle
25 de l'ADN et permet l'hybridation à celui-ci).

Le composé modulateur peut être un anticorps inhibiteur anti- récepteur SCARB-1, de préférence un anticorps monoclonal. De manière avantageuse, un tel anticorps inhibiteur est administré en une quantité suffisante pour obtenir une concentration plasmatique
30 d'environ 0.01 μ g par ml à environ 100 μ g/ml, de préférence d'environ 1 μ g par ml à environ 5 μ g/ml.

Il peut par exemple s'agir d'un anticorps qui se lie au domaine extracellulaire collagénique du récepteur, qui joue un rôle dans la liaison au ligand (Acton, 1993, J. Biol. Chem. 268 (5): 3530-7). Des exemples d'anticorps neutralisants sont également décrits dans la
35 demande WO04/80385. D'autres anticorps neutralisants sont connus dans l'art antérieur (voir par exemple Frolov, 2000, J. Biol. Chem. 275 (17): 12769-12780).

L'invention comprend l'utilisation de tels composés antagonistes du récepteur SCARB-1 pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou tout désordre cutané associé à une hyperséborrhée.

- 5 D'autres composés modulateurs identifiés par la méthode de criblage décrite plus haut sont également utiles.

Les composés modulateurs sont formulés au sein de composition pharmaceutique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ces compositions 10 peuvent être administrées par exemple par voie orale, parentérale, ou topique. De préférence, la composition pharmaceutique est appliquée par voie topique. Par voie orale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granules, d'émulsions, de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques 15 ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

Par voie topique, la composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée au traitement de la peau et des muqueuses et peut se présenter sous forme d'onguents, de 20 crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques ou de patchs polymériques ou d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette 25 composition pour application topique peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion. Dans une variante préférée, la composition pharmaceutique se présente sous la forme d'un gel, d'une crème ou d'une lotion.

La composition peut comprendre une teneur en modulateur de la SCARB-1 allant de 0,001 à 10 % en poids, notamment de 0,01 à 5 % en poids par rapport au poids total de la 30 composition.

La composition pharmaceutique peut en outre contenir des additifs inertes ou des combinaisons de ces additifs, tels que :

- des agents mouillants;
35 - des agents d'amélioration de la saveur;
- des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque;

- des agents stabilisants;
 - des agents régulateurs d'humidité;
 - des agents régulateurs de pH;
 - des agents modificateurs de pression osmotique;
- 5 - des agents émulsionnans;
- des filtres UV-A et UV-B
 - et des antioxydants, tels que l'alpha-tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluene, la Super Oxyde Dismutase, l'Ubiquinol ou certains chelatants de métaux.

10

Les Figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

Légendes des Figures

- 15 La Figure 1 montre la mesure de l'expression du gène SCARB-1 chez des souris mâles gonadectomisés et traitées avec le véhicule, le DHT, le DHEA ou la combinaison de DHEA-Flutamide pendant une période de 7 jours une fois par jour (traitement long terme). A la fin de l'expérience les glandes préputiales ont été enlevées, l'ARN a été isolé et l'expression des gènes a été analysée par la technique Affymetrix.
- 20 GDX: souris gonadectomisées et traitées avec le véhicule
DHT: souris gonadectomisées et traitées avec le Dihydrotestosterone (agoniste du récepteur aux androgènes)
DHEA: souris gonadectomisées et traitées avec le Dihydroepiandrosterone (précurseur des hormones stéroïdiennes; dans les glandes préputiales métabolisé en androgène actif)
- 25 DHEA-Flu: souris gonadectomisées et traitées avec une combinaison de Dihydroepiandrosterone et Flutamide (antagoniste du récepteur aux androgènes; qui bloque les effets des agonistes DHT et DHEA).
Niveau d'expression: niveau d'expression de l'ARNm
- 30 La Figure 2 est un graphe d'une étude cinétique de 15 à 96 heures. Les points I_24h et I_24h(R1) montrent le niveau d'expression de SCARB-1 de souris contrôles (= souris non gonadectomisées; duplicita) au point 24 heures. Les points suivants proviennent de souris gonadectomisées et indiquent les temps successifs (en heures) de l'étude cinétique.

35

La ligne bleue pointillée représente l'expression dans les souris gonadectomisées suite au traitement avec le DHT au temps zéro. La ligne rouge représente l'expression dans les souris gonadectomisées sans traitement avec le DHT.

Niveau d'expression: niveau d'expression de l'ARNm

5

Exemples : DONNEES EXPERIMENTALES

Exemple 1 : Expression de SCARB-1 dans la glande sébacée humaine et dans l'épiderme humain.

10

Des glandes sébacées humaines ont été séparées de l'épiderme humain par traitement à la dispase et dissection sous une loupe binoculaire. Des échantillons d'ARN totaux ont été préparés à partir des glandes sébacées et à partir de l'épiderme.

L'expression des gènes a été analysée sur une station d'Affymetrix (module microfluidique; four à hybridation; scanner; ordinateur) en suivant les protocoles fournis par la société. En bref, l'ARN total isolé des tissus est transcrit en ADNc. A partir de l'ADNc double brin on synthétise un ARNc marqué à la biotine en utilisant la polymérase T7 et un NTP précurseur conjugué à la biotine. Les ARNc sont ensuite fragmentés en fragments de petites tailles. Toutes les étapes de biologie moléculaire sont contrôlées en utilisant le système « Lab on a chip » d'Agilent pour confirmer les bonnes efficacités des réactions enzymatiques. La puce Affymetrix est hybridée avec l'ARNc biotinylé, rincée et ensuite marquée par fluorescence en utilisant un fluorophore conjugué à la Streptavidine. Après des lavages la puce est scannée et les résultats sont calculés en utilisant le logiciel MAS5 fourni par Affymetrix. On obtient une valeur d'expression pour chaque gène ainsi que l'indication de la significativité de la valeur obtenue. Le calcul de la significativité de l'expression est basé sur l'analyse des signaux qui sont obtenus suite à l'hybridation de l'ARNc d'un gène donné avec un oligonucléotide s'hybridant parfaitement (« perfect match ») versus un oligonucléotide qui contient une mutation (« single mismatch ») dans la région centrale de l'oligonucléotide (voir tableau 1)

20

Tableau 1 : Mesure de l'expression de SCARB-1 dans l'épiderme et dans la glande sébacée humaine par utilisation de la technologie Affymetrix.

Identifiant Affymetrix	Nom du gène	Expression dans la glande sébacée humaine	Expression dans l'épiderme humain	Significativité de l'expression* dans la glande sébacée humaine	Significativité de l'expression* dans l'épiderme humain
201819_at	Récepteur scavenger membre 1 de la classe B (SCARB1)	190	77	1	1

*Indicateur de la significativité du gène analysé dans l'échantillon indiqué : présence (=1) ou absence (=0).

Résultats :

- 5 Le récepteur SCARB-1 est bien exprimé dans les deux tissus (glande sébacée, épiderme). L'analyse différentielle entre l'expression dans la glande sébacée humaine et l'épiderme humain montre que SCARB-1 est exprimé plus fortement dans la glande sébacée humaine.

10 **Exemple 2 : expression de SCARB-1 dans la glande préputiale de souris**

- A. Les glandes préputiales de souris montrent une différenciation du type sébocytaire et sont utilisées comme modèle expérimental de glande sébacée. Elles ont une taille suffisante pour permettre l'isolement d'ARN sans avoir recours à des technologies de 15 microdissection.

- L'analyse de l'expression de SCARB-1 dans les glandes préputiales de souris a été réalisée dans des conditions de déficience en hormones stéroïdiennes (notamment en hormones androgéniques) suite à une gonadectomie. Les animaux gonadectomisés ont ensuite été traités avec des quantités physiologiques de Dihydrotestostérone (DHT) ou de 20 Dihydroepiandrosterone (DHEA) pour restituer un niveau physiologique des hormones androgéniques, ou bien comme expérience de contrôle avec une combinaison de DHEA-Flutamide dans laquelle le Flutamide, un antagoniste du récepteur aux androgènes bloque l'effet de la DHEA. La comparaison de l'expression génique dans ces conditions

expérimentales permet d'identifier de façon non ambiguë la modulation ou non de l'expression génique d'un gène en question par les hormones androgéniques (Figure 1).

L'expression génique a été analysée en utilisant la technologie Affymetrix décrit ci-

5 dessus.

Résultat:

L'ARNm de SCARB-1 est induit par un traitement chronique pendant 7 jours aux androgènes dans la glande préputiale.

10

B. Des souris mâles gonadectomisées et traitées avec le véhicule, ou le DHT. Une étude cinétique de l'expression du gène, de 15 minutes à 96 heures, a été réalisée. Pour cela, les glandes préputiales ont été prélevées pendant une période allant jusqu'à 4 jours (traitement androgénique unique – observation d'une cinétique de court terme), l'ARN a 15 été isolé, et l'expression des gènes a été analysée par la technique Affymetrix (Figure 2).

Résultats:

La gonadectomie (qui provoque une déficience d'hormones stéroïdiennes) induit une diminution de la quantité d'ARNm de SCARB-1 dans la glande préputiale de la souris.

20

L'ARNm de SCARB-1 dans la glande préputiale de la souris n'est pas induit par un traitement court terme avec le DHT (effet non visible à 18, 24, 48 et 96 heures).

REVENDICATIONS

1. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du récepteur SCARB-1 ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
- 10 2. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné et/ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :
 - a. Préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
 - 15 b. Mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
 - c. Mesure de l'expression ou de l'activité du récepteur SCARB-1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
 - d. Sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité du récepteur SCARB-1, ou une modulation de l'expression de son gène ou une modulation de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b) par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.
- 25 3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que les composés sélectionnés à l'étape d) inhibent l'expression ou l'activité du récepteur SCARB-1, ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
- 30 4. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène codant le récepteur SCARB-1, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

5. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour SCARB-1, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.
- 10 6. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des sébocytes.
7. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue codant pour le récepteur SCARB-1.
- 15 8. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de transcription dudit gène.
9. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de traduction dudit gène.
- 20 10. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les mélanges réactionnels comprennent chacun un récepteur SCARB-1, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'activité du récepteur.

[1/1]

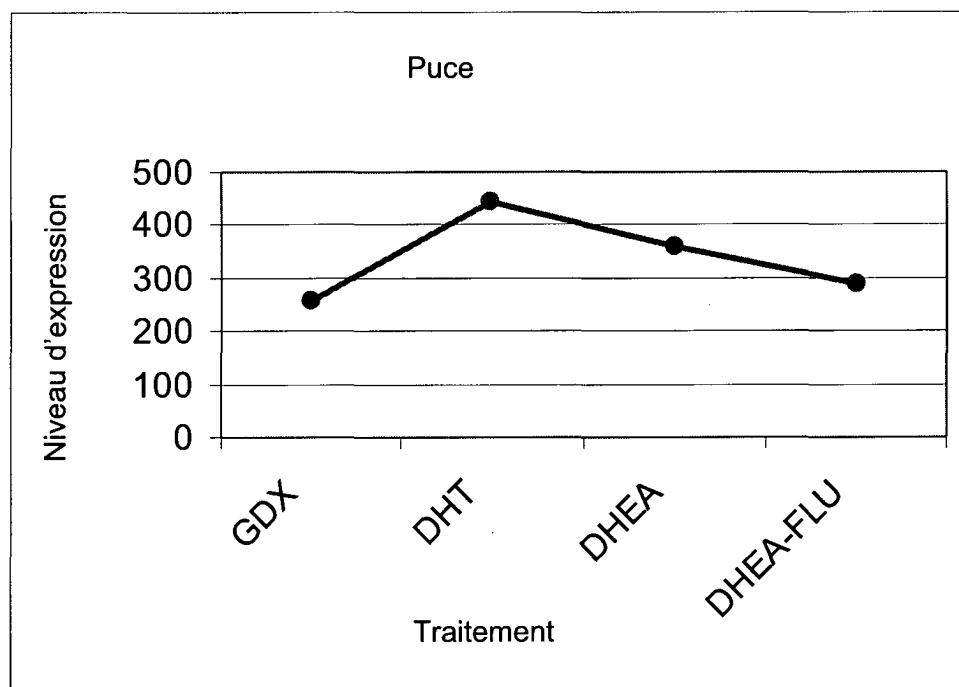


Figure 1

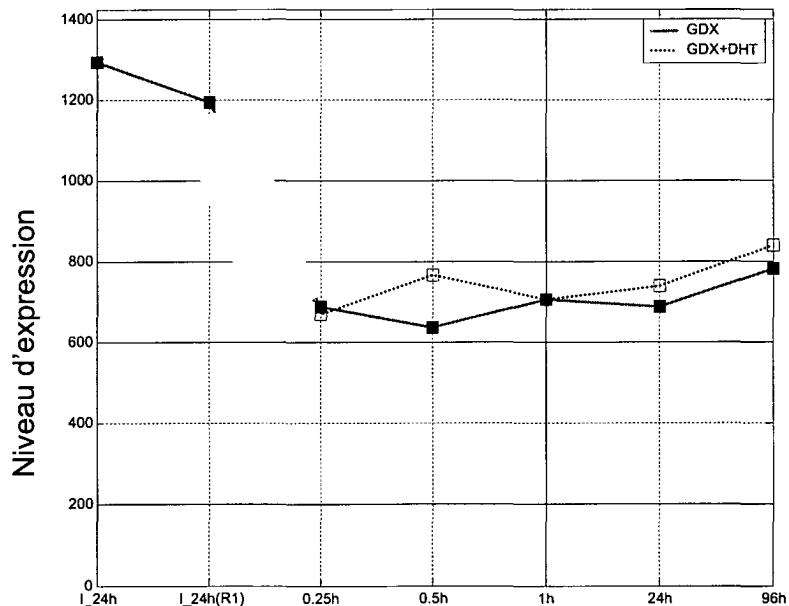


Figure 2