

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLÉE 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
16 juin 2011 (16.06.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/069921 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07H 11/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/7024 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2010/068873

(22) Date de dépôt international :
3 décembre 2010 (03.12.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0958689 7 décembre 2009 (07.12.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE [FR/FR];
45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-billancourt
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **FABRE, Pierre** [FR/FR]; 31 avenue d'Albi, F-81100 Castres (FR).
JEULIN, Séverine [—/FR]; 33 rue Charles Gide,
F-94240 L'Hay Les Roses (FR). **KOPEC, Marion**
[FR/FR]; Appartement B36 53 grande rue Saint Michel,
F-31400 Toulouse (FR).

(74) Mandataire : **AHNER, Francis**; Cabinet Regimbeau, 20,
rue de Chazelles, 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

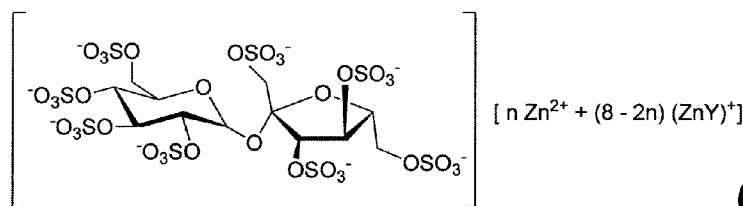
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : SUCROSE OCTASULFATES OF ZINC, THE PREPARATION OF SAME AND THE PHARMACEUTICAL AND COSMETIC USES THEREOF

(54) Titre : SUCROSE OCTASULFATES DE ZINC, LEUR PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES ET COSMETIQUES



(I)

(57) Abstract : The present invention relates to an sucrose octasulfate of zinc of general formula (I), to the method for the preparation of same and to the use thereof in the pharmaceutical and/or cosmetic field, where: $0 \leq n \leq 4$, n is an integer, and Y is OH, Cl, Br, I, NO_3 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, CH_3CO_2 , CF_3CO_2 or $-\text{OCH}_3$.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un sucrose octasulfate de zinc de formule générale (I), son procédé de préparation et son utilisation dans le domaine pharmaceutique et/ou cosmétique dans laquelle : $0 \leq n \leq 4$ n est un nombre entier Y représente OH, Cl, Br, I, NO_3 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, CH_3CO_2 , CF_3CO_2 ou $-\text{OCH}_3$.

WO 2011/069921 A1

SUCROSE OCTASULFATES DE ZINC, LEUR PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES ET COSMETIQUES

La présente invention concerne un sucrose octasulfate de zinc, son procédé de préparation et son utilisation dans le domaine pharmaceutique et/ou cosmétique.

Les oligosaccharides sont des glucides dont l'hydrolyse fournit uniquement des oses. Ce sont des sucres constitués par l'union d'au moins deux molécules de sucres simples (ou oses). Parmi les oligosaccharides, on trouve le sucrose, sucre double formé par la condensation de 2 oses : une molécule de glucose et une molécule de fructose.

Les oligosaccharides sulfatés sont connus dans la littérature et possèdent de multiples activités biologiques, cosmétiques et/ou thérapeutiques.

WO2006/017752 décrit une méthode de traitement des inflammations des voies aériennes en employant des oligosaccharides comme substance active. Parmi les oligosaccharides est cité, en outre, l'oligosaccharide totalement sulfaté issu de la condensation du glucose et du fructose.

Les oligosaccharides sulfatés, principalement le sucrose octasulfate d'aluminium, sont également employés dans le traitement de l'alopécie (US 5 767 104).

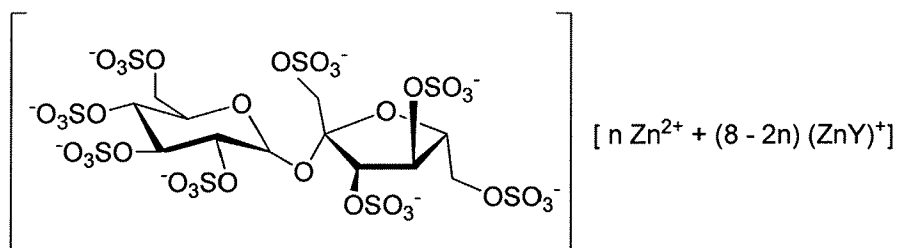
Le sucrose octasulfate est utilisé comme principe actif dans le traitement des ulcères gastriques pour ses propriétés réparatrices/cicatrisantes. FR 2 646 604 décrit des formulations de sucrose octasulfate d'aluminium, ou sucralfate, aux propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes destinées au traitement de plaies ou autres inflammations ulcéreuses. WO 94/00476 décrit une méthode de traitement des lésions et/ou inflammations de l'appareil digestif par administration d'un sel de sucrose sulfaté, plus particulièrement le sucrose octasulfate de potassium ou de sodium.

FR 1 390 007 décrit l'utilisation par voie topique de formulation contenant du sucralfate en association avec du sulfate de cuivre et de zinc comme régénérant tissulaire, cicatrisant et apaisant.

EP 0 230 023 décrit l'utilisation d'oligosaccharides polysulfatés, plus particulièrement du sucrose octasulfate de potassium, comme agent guérissant les blessures.

L'objet de la présente invention est de proposer un nouveau composé additionnant propriétés réparatrices, antimicrobiennes et anti-radicalaire. Un tel composé apparaît utile dans la préparation de compositions pharmaceutiques et/ou cosmétiques permettant la réparation de la peau, la guérison de blessures et favorisant la cicatrisation. Ce type de composition allie le traitement de la peau à la protection antimicrobienne.

La présente invention concerne les composés de formule générale I



Formule générale I

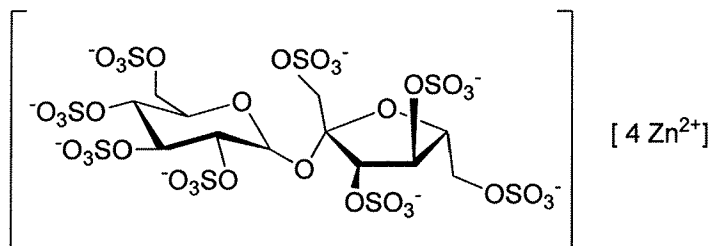
dans laquelle :

$$0 \leq n \leq 4$$

n est un nombre entier

Y représente OH, Cl, Br, I, NO₃, C₆H₅O₇, CH₃CO₂, CF₃CO₂ ou -OCH₃.

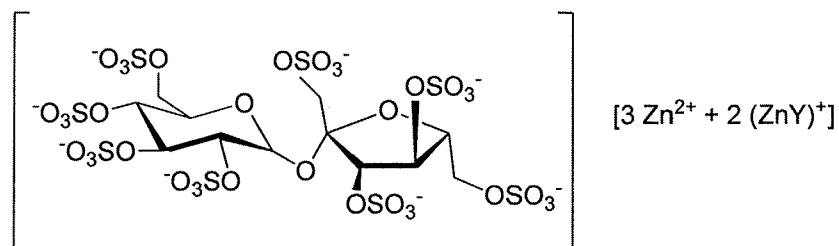
Dans un mode de réalisation de l'invention, le composé est un composé de formule II



Formule II

Dans ce mode de réalisation de l'invention, le composé de formule II correspond à n égal à 4 dans la formule générale I.

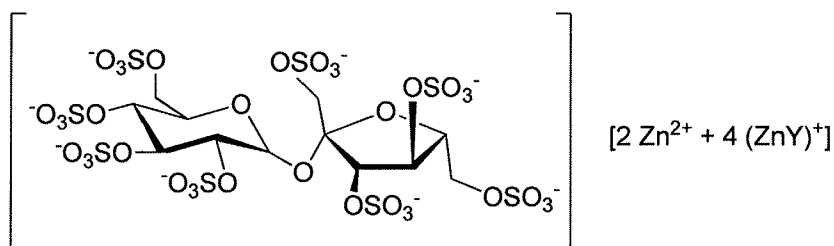
Dans un mode de réalisation de l'invention, le composé est un composé de formule III



Formule III

Dans ce mode de réalisation de l'invention, le composé de formule II correspond à n égal à 3 dans la formule générale I.

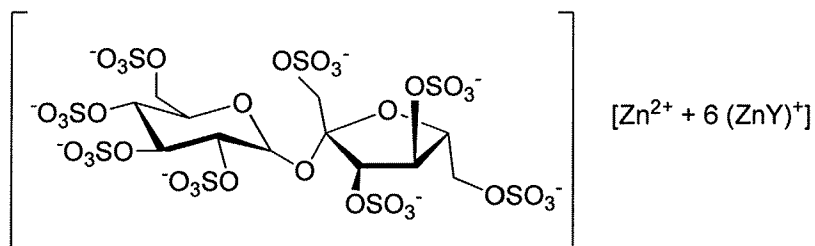
Dans un mode de réalisation de l'invention, le composé est un composé de formule IV



Formule IV

Dans ce mode de réalisation de l'invention, le composé de formule II correspond à n égal à 2 dans la formule générale I.

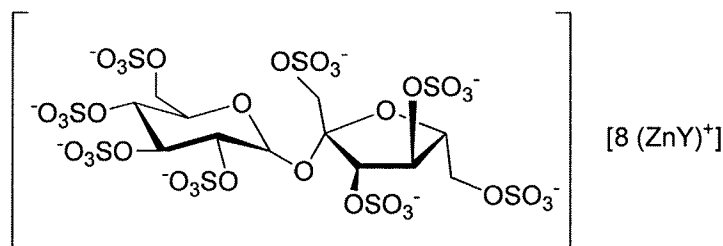
Dans un mode de réalisation de l'invention, le composé est un composé de formule V



Formule V

Dans ce mode de réalisation de l'invention, le composé de formule II correspond à n égal à 1 dans la formule générale I.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le composé est un composé de formule VI



Formule VI

Dans ce mode de réalisation de l'invention, le composé de formule II correspond à n égal à 0 dans la formule générale I.

La présente invention a pour objet également le procédé de préparation de ces composés.

Les composés de formule générale I sont préparés selon le schéma 1 :

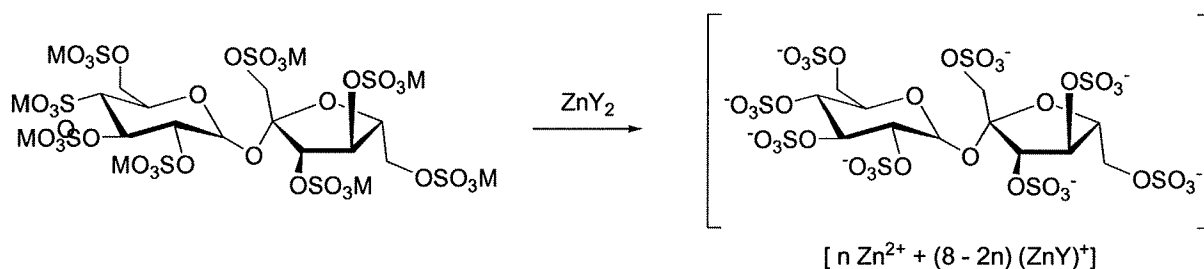


Schéma 1

dans lequel :

M représente K, Na ou H

Y représente OH, Cl, Br, I, NO₃, BF₄, C₆H₅O₇, CH₃CO₂, CF₃CO₂ ou -OCH₃

$0 \leq n \leq 4$

n est un nombre entier.

Les composés de formule générale I sont obtenus en partant du sucrose octasulfate de potassium (M représente K), du sucrose octasulfate de sodium (M représente Na) ou de la forme acide du sucrose octasulfate (M représente H). Dans le cas où le sel de sucrose octasulfate de départ est le sel de sodium ou de potassium, une étape d'échange des ions potassium ou sodium par des

protons est réalisée par passage sur une résine échangeuse d'ions. A la forme acide du sucrose octasulfate est additionné un sel minéral de zinc, choisi parmi $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnCl_2 , ZnBr_2 , ZnI_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ou $\text{Zn}(\text{BF}_4)_2$, ou un sel organique de zinc, choisi parmi $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ou $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{O})_2$. Le sel de zinc est additionné dans les proportions nécessaires pour aboutir à un composé de formule générale I présentant un nombre n entier compris entre, ou égal à, 0 et 4.

L'invention s'étend donc aux procédés de préparation suivants.

Procédé de préparation des composés de formule générale I comprenant les étapes suivantes :

- 1) dissolution dans l'eau d'un sel de sucrose octasulfate ;
- 2) passage sur colonne échangeuse d'ions dudit sel ;
- 3) addition d'un sel de zinc ;
- 4) précipitation du sucrose octasulfate de zinc.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le sel de sucrose octasulfate de l'étape 1 est choisi parmi le sucrose octasulfate de potassium ou le sucrose octasulfate de sodium.

Le passage sur la colonne échangeuse d'ions permet d'obtenir la forme acide du sel de sucrose octasulfate. Il s'agit plus particulièrement d'une résine échangeuse de cations. Dans un mode de réalisation de l'invention, la résine échangeuse de cations est l'Amberlite.

Dans un mode de réalisation de l'invention, le sel de zinc est choisi parmi les sels minéraux de zinc tels que $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnO , ZnCl_2 , ZnBr_2 , ZnI_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ou $\text{Zn}(\text{BF}_4)_2$ ou les sels organiques de zinc tels que $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ou $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{O})_2$. Le sel de zinc est par exemple l'hydroxyde de zinc $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la précipitation du sucrose octasulfate de zinc est réalisée par addition d'acétone.

Procédé de préparation des composés de formule générale I comprenant les étapes suivantes :

- 1) dissolution dans l'eau de la forme acide du sucrose octasulfate ;
- 2) addition d'un sel de zinc ;
- 3) précipitation du sucrose octasulfate de zinc.

Le sel de zinc est choisi parmi les sels minéraux de zinc tels que $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnO , ZnCl_2 , ZnBr_2 , ZnI_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ou $\text{Zn}(\text{BF}_4)_2$ ou les sels organiques de zinc tels que $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ou $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{O})_2$.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la précipitation du sucrose octasulfate de zinc est réalisée par addition d'acétone.

Les composés de formule I selon l'invention peuvent être administrés par voie topique ou orale. En particulier le composé peut être administré par la voie topique dans une formulation appropriée. Les dosages des composés de formule I dans les compositions de l'invention peuvent être ajustés afin d'obtenir une quantité de substance active qui est efficace pour obtenir la réponse thérapeutique et/ou cosmétique désirée pour une composition particulière à la méthode d'administration. Le niveau choisi de dosage dépend donc de l'effet thérapeutique et/ou cosmétique désiré, de la voie de l'administration, de la durée désirée du traitement et d'autres facteurs.

L'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique et/ou cosmétique comprenant au moins un composé de formule générale I et un excipient pharmaceutiquement et/ou cosmétologiquement acceptable.

L'invention a également pour objet un dispositif médical comprenant au moins un composé de formule générale I et un excipient pharmaceutiquement ou cosmétologiquement acceptable.

Par « pharmaceutiquement et/ou cosmétologiquement acceptable » on se réfère à des entités moléculaires et des compositions qui ne produisent aucun effet adverse, allergique ou autre réaction indésirable quand elles sont administrées à un animal ou un humain.

Dans un mode de réalisation, la composition selon l'invention présente une teneur en sucrose octasulfate de zinc selon la formule générale I comprise entre 0,01 et 30 % en poids.

Dans un mode de réalisation selon l'invention, la composition comprend le composé selon la formule II.

L'excipient pharmaceutiquement et/ou cosmétologiquement acceptable en vue d'obtenir une composition selon l'invention est choisi pour permettre une administration topique ou orale.

Avantageusement, la forme topique est choisie parmi le groupe constitué 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, d'une pâte, d'un patch, d'un suppositoire, etc.

Avantageusement, la forme orale est choisie parmi le groupe constitué d'un d'une gomme, d'une pastille, d'un comprimé, d'un sucre cuit, d'un gel à boire, d'une poudre à dissoudre, etc.

Au sens de la présente invention, la forme topique inclut les formes galéniques topiques pour application cutanée, pour application buccale (muqueuse buccale), pour application génitale (muqueuse anale, vaginale) et/ou pour application gastrique.

Au sens de la présente invention, la forme orale inclut les formes galéniques orales pour application buccale (muqueuse buccale) et/ou pour application gastrique.

Les compositions pharmaceutiques et/ou cosmétiques selon la présente invention sont destinées à favoriser la cicatrisation.

Les propriétés antimicrobiennes du zinc sont bien décrites. Les compositions pharmaceutiques et/ou cosmétiques selon la présente invention sont donc également destinées à protéger des infections microbiennes.

Ainsi, les compositions pharmaceutiques et/ou cosmétiques selon la présente invention favorisent la cicatrisation et/ou protègent des infections microbiennes.

Il a été montré par des études *in vitro* que les composés selon l'invention induisent la migration kératinocytaire. En comparaison, le sucrose octasulfate de potassium et le sucrose octasulfate de sodium n'induisent pas la migration cellulaire.

Ainsi, de manière surprenante, contrairement au sucrose octasulfate de potassium et au sucrose octasulfate de sodium, le sucrose octasulfate de zinc apparaît posséder des propriétés très intéressantes sur la migration kératinocytaire et donc pour la cicatrisation cutanée.

Les composés de l'invention peuvent donc être utilisés dans le traitement de la peau notamment dans le processus de cicatrisation et d'amélioration de son aspect esthétique.

Les composés de l'invention peuvent donc être employés pour la préparation de compositions et de produits pharmaceutiques et/ou cosmétiques pour favoriser la cicatrisation.

Un autre objet de la présente invention concerne ainsi un composé selon la présente invention pour son utilisation en tant que médicament.

Un autre objet de la présente invention concerne également un composé selon la présente invention pour son utilisation en tant que principe actif cosmétique.

Un autre objet de la présente invention concerne un composé selon la présente invention pour son utilisation en tant que médicament et/ou principe actif cosmétique.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, les composés de Formule I sont utilisés pour le traitement de la peau.

Plus particulièrement, les composés de Formule I sont utilisés pour favoriser la cicatrisation. Plus particulièrement, l'invention concerne la cicatrisation de plaies aiguës telles que par exemple les écorchures, les brûlures, les radiodermes, ou chroniques telles que par exemple les ulcères, les escarres, le pied du diabétique.

Plus particulièrement, l'invention concerne la cicatrisation des brûlures (thermiques, mécaniques, chimiques, rayonnement), des radiodermes, des irritations diverses, des dermites, des écorchures, des éraflures, des égratignures, des coupures, des ulcères de jambes, des escarres, des plaies du diabétique, des ulcères gastriques, des aphtes, des diverses plaies de la sphère buccale, de l'acné cicatriciel, des cicatrices de cryothérapie, des

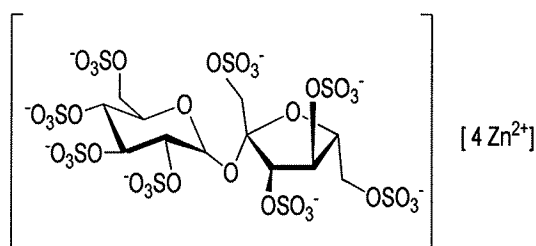
cicatrices post chirurgie ou post acte de dermatologie esthétique (laser, épilation, peeling, injection), des ampoules, des chéilites, de l'eczéma, des érythèmes fessiers, des dermatoporoses etc.

Dans un mode particulier de mise en œuvre de l'invention, les composés de Formule I sont utilisés pour favoriser la cicatrisation et/ou protéger des infections microbiennes.

Les exemples suivants sont illustratifs et non limitatifs.

EXEMPLE 1 : Préparation du composé de Formule II

a. Méthode de préparation



Une solution de sucrose octasulfate de potassium (1,50 g ; 1,16 mmol, 1,00 equiv, 99%) dans l'eau (20 ml) est placée dans un ballon de 100 ml. La solution est passée à travers une colonne (Φ 40x500 mm) contenant 250 g de résine échangeuse d'ions d'Amberlite IR 120 H à un débit de 2-3 ml/min à 0 °C. La fraction acide (120 ml ; pH = 1,2) est collectée et neutralisée immédiatement par ajout d'hydroxyde de zinc fraîchement préparé (600 mg ; 5,76 mmol ; 5,05 equiv, 95%). Le mélange résultant, trouble à environ pH 6, est laissé sous agitation pendant une nuit (env. 12 h) à température ambiante. Toutes ces étapes ont été réalisées à l'abri de la lumière en enveloppant le milieu réactionnel avec du papier d'aluminium.

Le mélange est ensuite filtré et 360 ml d'acétone sont additionnés au filtrat. Le mélange résultant est laissé au repos pour la nuit. Le surnageant est décanté et le sirop restant est lavé à l'acétone. Un solide blanc de sucrose octasulfate de zinc est obtenu (0,40 g ; 28%).

RMN ^1H (D_2O , ppm): δ : 4,02-4,50 (m, 10 H); 4,53-4,71 (m, 2 H); 5,03 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H); 5,70-5,71 (d, $J = 3,6$ Hz, 1 H).

b. Dosage du sucrose octasulfate

La quantité de sucrose octasulfate est déterminée par un dosage spectrophotométrique à l'anthrone (Brooks, J. ; Griffin, V. K.; Kattan, M. W.; « A Modified Method for Total Carbohydrate Analysis of Glucose Syrups, Maltodextrins, and Other Starch Hydrolysis Products »; *Cereal Chemistry*, 63, 5, 465-466, 1986).

Une solution standard d'anthrone est préparée en dissolvant 50mg d'anthrone dans un mélange de 10ml d'eau distillée et 90ml d'acide sulfurique concentré.

Le sucrose octasulfate de zinc est préalablement déshydraté sous vide (environ 23,5 Pa) à 30°C pendant 6h. Trois échantillons de volume respectif 0,3, 0,6 et 0,7 ml d'une solution aqueuse de sucrose octasulfate de zinc (0,4018 mg/ml) sont dilués avec de l'eau distillée jusqu'à 2ml. 6,0ml de la solution standard d'anthrone sont ajoutés à chaque solution. Les solutions obtenues sont chauffées au bain-marie pendant 10 min. Après retour à température ambiante immédiat, l'absorbance de chaque solution est mesurée à 620nm, en utilisant le sucrose comme référence (Résultats, voir Tableau 1).

Tableau 1 : Dosage du sucrose à l'anthrone

Volume de l'échantillon (ml)	Absorbance	Concentration de l'échantillon dilué (mM) ^a	Concentration en sucrose octasulfate (mM) ^b
0,3	0,167	0,0427	0,285
0,6	0,326	0,0834	0,278
0,7	0,380	0,0927	0,324
^a dilué avec de l'eau distillée jusqu'à 2ml			
^b concentration moyenne : 0,296mM			

La quantité de sucrose octasulfate présente dans le sucrose octasulfate de zinc est de : $0,296 \text{ mM} / 0,4018 \text{ mg/ml} = 0,737 \text{ mmol / g}$.

c. Dosage du zinc

Le zinc a été dosé par une titration à l'EDTA.

Le sucrose octasulfate de zinc (0,2009 g) est dissous dans de l'eau déionisée (250 ml). Le sel est titré par une solution aqueuse d'EDTA (0.0101 M) avec 6 ml d'hexaméthylène tétramine (20%) comme solution tampon et 2 gouttes de xylénol orange (0,2%) comme indicateur coloré (Tableau 2).

Tableau 2 : Dosage du zinc à l'EDTA

	1	2	3	moyenne
$V_{\text{Zn2+SOS-Zn}}$ (ml)	25,00	25,00	25,00	25,00
V_{EDTA} (ml)	5,67	5,70	5,72	5,70
$C_{\text{Zn2+SOS-Zn}}$ (mM)	2,29	2,30	2,31	2,30

La quantité de zinc présente dans le sucrose octasulfate de zinc est de :
 $2,30 \text{ mM} \times 0,250 \text{ l} / 0,2009 \text{ g} = 2,86 \text{ mmol} / \text{g}$.

Le ratio zinc / sucrose octasulfate est de $2,86 / 0,737$, soit de 3,88.

d. Recherche d'impuretés de potassium

L'UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) a été employée pour détecter la présence éventuelle de potassium issu du produit de départ.

Conditions :

Colonne: Merck SeQuant ZIC_HILIC 150x4,6 mm 5 μ m 200 Å

Phase Mobile A : Acétonitrile

Phase Mobile B: 100mM ammonium Acétate pH=5,0

Débit : 0,6ml/min

Température de la Colonne : 35°C

Détecteur: ELSD

Gradient: 15% à 85% B en 11,0 minutes, 85% à 95% B en 8,0 minutes, 95% B pendant 5 minutes

Résultats :

Le sucrose octasulfate de zinc obtenu selon l'exemple 1 et deux témoins ont été analysés par UFLC :

- ZnCl_2 (voir Figure 1)
- $\text{ZnCl}_2 + \text{KCl}$ (voir Figure 2)
- sucrose octasulfate de zinc (Formule II) (voir Figure 3)

L'analyse confirme l'absence de potassium dans le produit synthétisé. Seul le zinc est présent comme cation.

EXEMPLE 2 : Test *in vitro* sur la migration des cellules

La migration des cellules épithéliales est une étape importante du développement et des processus de réparation tissulaire, tels que l'embryogenèse et la cicatrisation.

Les mécanismes d'initiation, de coordination et d'arrêt des mouvements des cellules, ne sont pas complètement élucidés, cependant, le rôle primordial de la migration cellulaire est bien établi (Santoro M.M. and Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing *Exp. Cell. Res.* 304 (1) : 274-286, 2005 ; Werner S. and Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines *Physiol. Rev.* 3(3) : 835-870, 2003 ; Steffensen B, Akkinen L., Lariava H. Proteolytic events of wound healing-coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12(5) : 373-398, 2001).

Lors de la cicatrisation cutanée et dans les affections inflammatoires chroniques dermatologiques, les kératinocytes sont "activés" pour entreprendre le processus de migration. Les cellules voient alors leur phénotype influencé par les interactions avec la matrice extracellulaire d'une part et par les interactions cellules-cellules, d'autre part (McMillan JR, Akiyama M., Shimizu H. Epidermal basement membrane zone component : ultrastructural distribution

and molecular interactions *J. Derm. Sc.* 31 : 169-177, 2003). Les kératinocytes de l'assise basale des berges d'une plaie, migrent sur la plaie et la recouvrent.

En effet, les kératinocytes sont activés au contact de la fibronectine, du collagène dermique interstitiel (type 1), du collagène IV et de la laminine 5 de la lame basale. Ils sont aussi régulés par certains facteurs de croissance polypeptidiques comme le TGF β , le TGF α et l'EGF. De plus, des cytokines (IL1, TNF α) et chémokines (RANTES et l'IL-8) contribuent aussi à augmenter la vitesse de ré-épithélisation d'une plaie, suite à l'activation kératinocytaire (Szabo I., Wetzel M. A., Rogers TJ. Cell-Density-Regulated Chemotactic Responsiveness of Keratinocytes In Vitro *J. Invest. Dermatol.* 117 : 1083-1090, 2001).

Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet du sucrose octasulfate de zinc sur la migration cellulaire de lignées de kératinocytes HaCAT, à l'aide du Kit de migration cellulaire Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies). Cette étude a été réalisée en comparaison avec le sucrose octasulfate de potassium, et le sucrose octasulfate de sodium.

Ainsi, l'effet des 3 sucroses a été testé sur la migration des cellules HaCat.

Matériels et méthodes

a. Matériel biologique

Lignée de kératinocytes humains HaCaT, spontanément immortalisés, fréquemment citée comme modèle de référence dans la littérature.

b. Protocole de migration cellulaire

Le protocole utilisé pour l'étude de la migration cellulaire repose sur l'utilisation d'un kit 96 puits, Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies - TEBU), permettant la miniaturisation et la quantification de ce processus cellulaire. Il est décrit sous le code QRD/TO/154/107.

Le principe de ce test consiste à étudier la migration cellulaire vers le centre du puits de la plaque de 96 puits. Il consiste à placer un stoppeur dans

des puits, afin de créer une zone de détection de 2 mm de diamètre. Puis de retirer les stoppeurs une fois que les cellules ont bien adhéré à la surface autour de ceux-ci, et ainsi, de permettre aux cellules de migrer vers la zone de détection. Les plaques sans les stoppeurs et avec les actifs sont mises à incuber à 37°C pendant 24 heures dans du DMEM 0% SVF. On analyse ensuite la quantité de cellules situées dans la zone où il y avait le stoppeur, afin d'évaluer la migration des cellules. Un cache permet de visualiser et de comptabiliser uniquement les cellules situées dans cette zone. Pour chaque condition, la moyenne de 4 à 8 puits est réalisée.

c. Produits testés

Témoin positif : TGFβ1

Sucrose octasulfate de potassium (SOS-K)

Sucrose octasulfate de sodium (SOS-Na)

Sucrose octasulfate de zinc selon l'exemple 1 (SOS-Zn)

d. Analyse des résultats

Les résultats sont exprimés en DO (proportionnelle à la quantité de cellules qui ont migré).

Le pourcentage d'activité par rapport au témoin négatif est calculé par :

$$\frac{DO \text{ traité}}{DO \text{ témoin négatif}} \times 100$$

Le pourcentage d'activité par rapport au TGFβ est calculé par :

$$\frac{DO \text{ traité} - DO \text{ témoin négatif}}{DO \text{ TGF}\beta - DO \text{ témoin négatif}} \times 100$$

Résultats

L'effet des 3 sucroses à différentes concentrations a été testé sur la migration des cellules HaCat, l'expérience ayant été reproduite 2 fois (Tableaux 3 et 4).

a. Expérience 1

Tableau 3 : résultats de l'expérience 1 – Effet des 3 sucroses sur la migration des kératinocytes

	SOS-Zn 1 μ M	SOS-Na 1 μ M	SOS-K 1 μ M	TGF β 5ng/mL	Témoin négatif
Moyenne DO	306,9	28,6	99,5	258,6	87,7
% activité / témoin négatif	350,0	32,6	113,5	294,9	
% activité / TGF β	128,3	-34,6	6,9		

b. Expérience 2

Tableau 4 : résultats de l'expérience 2 – Effet des 3 sucroses sur la migration des kératinocytes

	SOS-Zn 1 μ M	SOS-Na 1 μ M	SOS-K 1 μ M	TGF β 5ng/mL	Témoin négatif
Moyenne DO	417,8	142,3	321,3	436,3	237,4
% activité / témoin négatif	176,0	59,9	135,3	183,8	
% activité / TGF β	90,7	-47,1	42,2		

Il a été observé que :

- le TGF β à 5 ng/ml, contrôle positif des expériences, induit la migration des kératinocytes de façon reproductible ;

- le sucrose octasulfate de zinc (SOS-Zn) induit aussi la migration cellulaire de façon reproductible à 1 μ M. A cette concentration il est aussi actif que le contrôle positif TGF β ;

- aux concentrations testées, le sucrose octasulfate de potassium (SOS-K) et le sucrose octasulfate de sodium (SOS-Na) n'induisent pas la migration des kératinocytes.

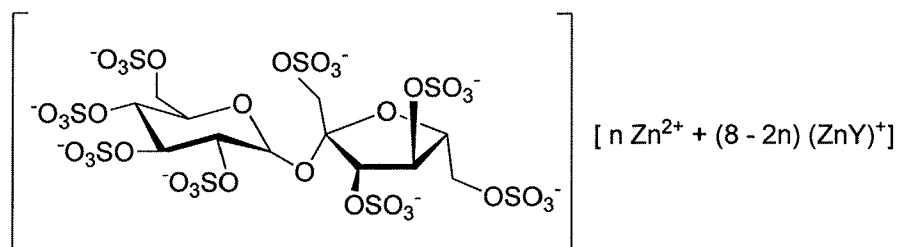
Grâce à ce kit de migration cellulaire, l'effet des 3 sucroses sur la migration des kératinocytes a été étudié.

Nous avons montré que le sucrose octasulfate de zinc induit la migration kératinocytaire. En comparaison, le sucrose octasulfate de potassium et le sucrose octasulfate de sodium n'induisent pas la migration cellulaire.

Contrairement au sucrose octasulfate de potassium et au sucrose octasulfate de sodium, le sucrose octasulfate de zinc apparaît avoir des propriétés très intéressantes sur la migration kératinocytaire et donc pour la cicatrisation cutanée.

REVENDECATIONS

1. Composé de formule générale I



Formule générale I

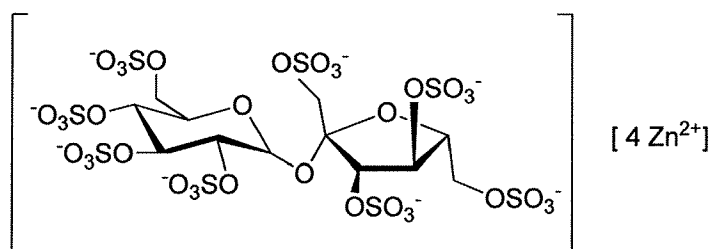
dans laquelle :

$$0 \leq n \leq 4$$

n est un nombre entier

Y représente OH, Cl, Br, I, NO₃, BF₄, C₆H₅O₇, CH₃CO₂, CF₃CO₂ ou -OCH₃.

2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il s'agit du composé de formule II



Formule II

3. Procédé de préparation des composés de formule générale I selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) dissolution dans l'eau d'un sel de sucrose octasulfate ;
- 2) passage sur colonne échangeuse d'ions dudit sel ;
- 3) addition d'un sel de zinc ;
- 4) précipitation du sucrose octasulfate de zinc.

4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que le sel de sucrose octasulfate est le sucrose octasulfate de potassium ou le sucrose octasulfate de sodium.

5. Procédé de préparation des composés de formule générale I caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 1) dissolution dans l'eau de la forme acide du sucrose octasulfate ;
- 2) addition d'un sel de zinc ;
- 3) précipitation du sucrose octasulfate de zinc.

6. Procédé selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que ledit sel de zinc est un sel minéral de zinc, choisi parmi $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnCl_2 , ZnBr_2 , ZnI_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ou $\text{Zn}(\text{BF}_4)_2$, ou un sel organique de zinc, choisi parmi $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Zn}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ou $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{O})_2$.

7. Composition pharmaceutique et/ou cosmétique comprenant au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 2 et un excipient pharmaceutiquement et/ou cosmétologiquement acceptable.

8. Composé selon l'une des revendications 1 à 2, pour son utilisation en tant que médicament.

9. Composé selon la revendication 8, pour le traitement de la peau ou des muqueuses.

10. Composé selon la revendication 9, pour favoriser la cicatrisation.

11. Composé selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il s'agit de la cicatrisation des brûlures et plaies aiguës ou chroniques.

12. Composé selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il s'agit de la cicatrisation des brûlures, des radiodermites, des irritations diverses, des dermites, des écorchures, des éraflures, des égratignures, des coupures, des ulcères de jambes, des escarres, des plaies du diabétique, des ulcères gastriques, des aphtes, des diverses plaies de la sphère buccale, de l'acné cicatriciel, des cicatrices de cryothérapie, des cicatrices post chirurgie ou post acte de dermatologie esthétique, des ampoules, des chéillites, de l'eczéma, des érythèmes fessiers, des dermatoporoses.

13. Procédé de traitement cosmétique de la peau et des muqueuses, caractérisé en ce qu'il implique l'application à titre de principe actif, au moins un composé selon l'une des revendications 1 et 2.

1 / 3

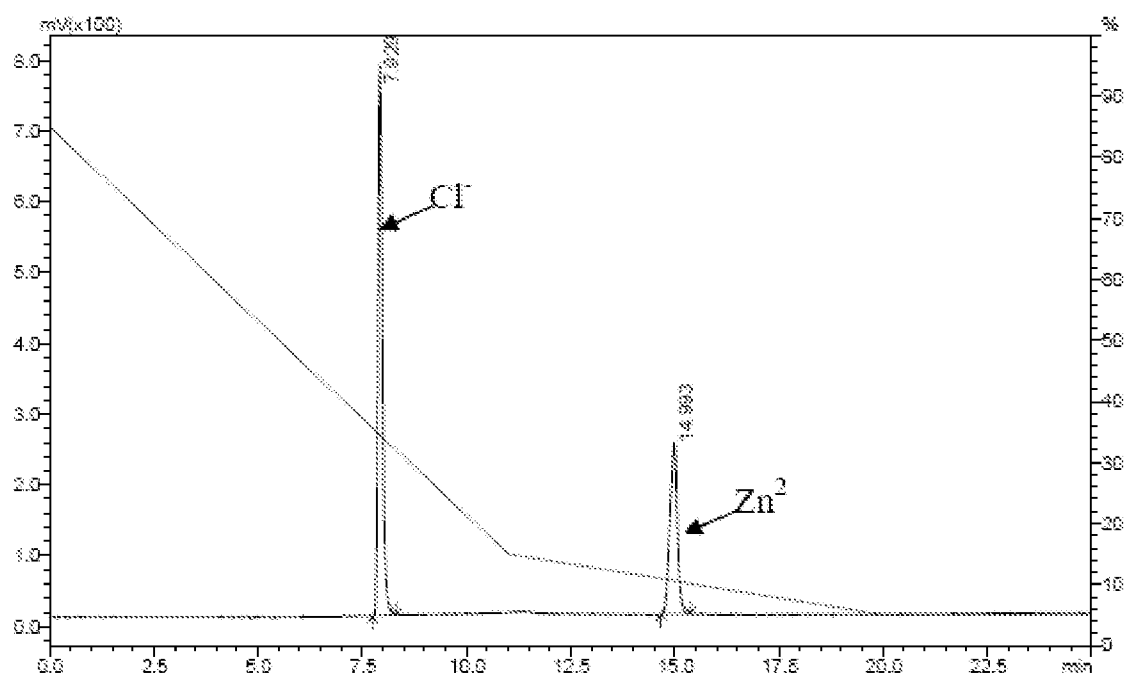


Figure 1

2 / 3

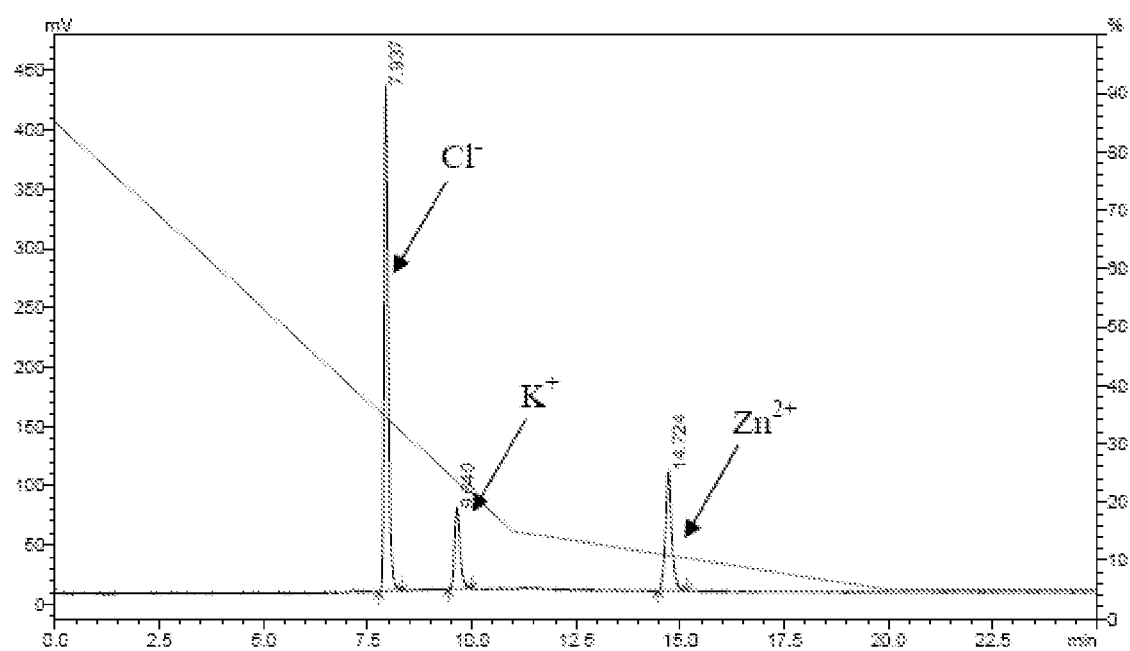
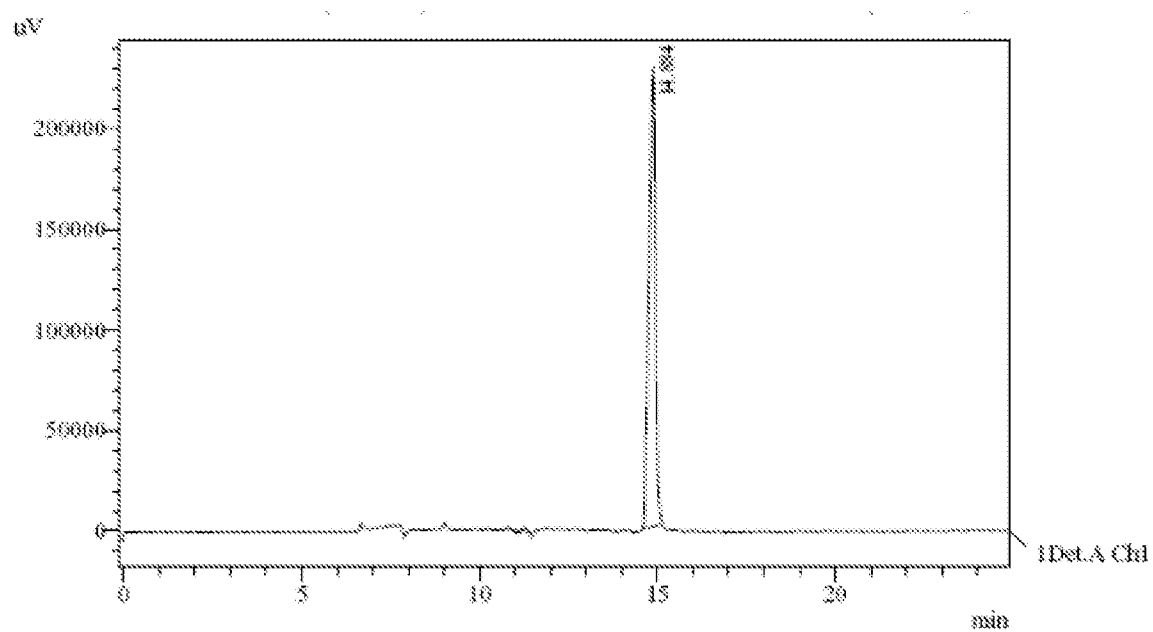


Figure 2

3 / 3**Figure 3**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/068873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07H11/00 A61K31/7024 A61P1/02 A61P43/00 A61Q19/00
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)

C07H A61K A61P A61Q

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/017752 A2 (IVAX CORP [US]; IVAX INST FOR DRUG RES LTD [HU]; KUSZMANN JANOS [HU];) 16 February 2006 (2006-02-16) cited in the application [0016] en combinaison avec la formule IIA -----	1,2,7,8
X	EP 0 640 346 A1 (BUKH MEDITEC [DK] BM RES AS [DK]) 1 March 1995 (1995-03-01) claim 7 -----	1,2,7-13
X	FR 2 916 355 A1 (URGO SOC PAR ACTIONS SIMPLIFIE [FR]) 28 November 2008 (2008-11-28) page 5, column 21 - column 22 ----- -/--	1,2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2011

Date of mailing of the international search report

31/01/2011

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

Klein, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/068873

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 908 836 A (BAR-SHALOM DANIEL [DK] ET AL) 1 June 1999 (1999-06-01) column 7, line 11 - line 20 -----	1,2,7-13
X	US 5 618 798 A (BAR-SHALOM DANIEL [DK] ET AL) 8 April 1997 (1997-04-08) column 3, line 27 - line 50 -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/068873

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006017752 A2	16-02-2006	US 2009215717 A1	27-08-2009
EP 0640346 A1	01-03-1995	NONE	
FR 2916355 A1	28-11-2008	AU 2008259660 A1	11-12-2008
		CA 2687730 A1	11-12-2008
		CN 101678036 A	24-03-2010
		EP 2148686 A2	03-02-2010
		WO 2008149035 A2	11-12-2008
		JP 2010527673 T	19-08-2010
		KR 20100016274 A	12-02-2010
		US 2010204174 A1	12-08-2010
US 5908836 A	01-06-1999	US 5916880 A	29-06-1999
US 5618798 A	08-04-1997	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2010/068873

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07H11/00 A61K31/7024 A61P1/02 A61P43/00 A61Q19/00 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) C07H A61K A61P A61Q		
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, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2006/017752 A2 (IVAX CORP [US]; IVAX INST FOR DRUG RES LTD [HU]; KUSZMANN JANOS [HU];) 16 février 2006 (2006-02-16) cité dans la demande [0016] en combinaison avec la formule IIA -----	1,2,7,8
X	EP 0 640 346 A1 (BUKH MEDITEC [DK] BM RES AS [DK]) 1 mars 1995 (1995-03-01) revendication 7 -----	1,2,7-13
X	FR 2 916 355 A1 (URGO SOC PAR ACTIONS SIMPLIFIE [FR]) 28 novembre 2008 (2008-11-28) page 5, colonne 21 - colonne 22 ----- -/--	1,2
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
24 janvier 2011		31/01/2011
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Klein, Didier

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2010/068873

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 908 836 A (BAR-SHALOM DANIEL [DK] ET AL) 1 juin 1999 (1999-06-01) colonne 7, ligne 11 - ligne 20 -----	1,2,7-13
X	US 5 618 798 A (BAR-SHALOM DANIEL [DK] ET AL) 8 avril 1997 (1997-04-08) colonne 3, ligne 27 - ligne 50 -----	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2010/068873

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2006017752	A2	16-02-2006	US 2009215717 A1	27-08-2009
EP 0640346	A1	01-03-1995	AUCUN	
FR 2916355	A1	28-11-2008	AU 2008259660 A1	11-12-2008
			CA 2687730 A1	11-12-2008
			CN 101678036 A	24-03-2010
			EP 2148686 A2	03-02-2010
			WO 2008149035 A2	11-12-2008
			JP 2010527673 T	19-08-2010
			KR 20100016274 A	12-02-2010
			US 2010204174 A1	12-08-2010
US 5908836	A	01-06-1999	US 5916880 A	29-06-1999
US 5618798	A	08-04-1997	AUCUN	