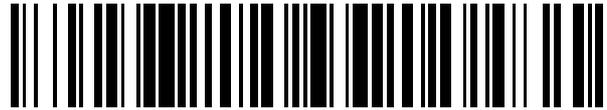


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 952**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2012 PCT/EP2012/061603**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2012 E 12730871 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2721408**

54 Título: **Método de dosificación in vitro por técnica inmunológica**

30 Prioridad:

20.06.2011 FR 1155415

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.03.2018

73 Titular/es:

**BASF BEAUTY CARE SOLUTIONS FRANCE SAS
(100.0%)
32, rue Saint-Jean-de-Dieu
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**BONNET, SÉBASTIEN y
RIVAL, DELPHINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 656 952 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de dosificación in vitro por técnica inmunológica

5 La presente invención se relaciona con un nuevo método de dosificación in vitro de moléculas de la matriz extracelular sintetizadas por células en cultivo y sus utilidades bajo forma de kit de medición in vitro y/o de método de criba de ingredientes cosméticos y/o farmacéuticos.

10 La matriz extracelular (MEC) tiene un papel esencial en la estructura de los tejidos del cuerpo humano y animal, en particular para sus funciones de sostén, adherencia y regulación de los intercambios celulares. La MEC está constituida en gran parte de glicoproteínas, proteínas, y glicosaminoglicanos. Estas moléculas son sintetizadas bajo forma nativa en las células en contacto con la MEC. Del compartimiento intracelular, son excretadas afuera de las células. Después de los fenómenos de maduración, se organizan y se disponen en una red que forma la MEC. Están entonces bajo la forma funcional. Las moléculas de la MEC son particularmente estudiadas en los campos cosmético y farmacéutico en los cuales numerosos ingredientes apuntan a estimular su síntesis y así mejorar el estado general del tejido relacionado.

15 In vitro, las células en cultivo en condiciones apropiadas producen su matriz extracelular y constituyen un modelo de estudios particularmente simple, particularmente para medir la actividad de síntesis por las células de una o varias moléculas que constituyen la MEC y la influencia de ingredientes en esta actividad. En este tipo de modelo de células en cultivo las moléculas de la MEC están presentes, en diferentes compartimientos de cultivo y eventualmente bajo diferentes formas particularmente de precursores: intracelular, en el medio de cultivo, o contenidos en la MEC.

20 Las técnicas de medición clásicas consisten en medir la cantidad de moléculas de la MEC en el medio de cultivo. Así, según la técnica más corriente, se dosifica en el medio de cultivo por la técnica ELISA, moléculas de la MEC tales como colágenos, eventualmente bajo su forma precursora tales como precolágeno. Otra técnica más costosa, más restrictiva y más global, consiste en incluir en el medio de cultivo moléculas radiomarcadas utilizadas por las células para la síntesis de moléculas de la MEC y para medir globalmente la intensidad de la radiactividad así obtenida en la totalidad de los compartimientos. Por ejemplo, la prolina tritiada se utiliza para medir la cantidad de colágeno globalmente producida por las células en cultivo. Estas técnicas permiten advertir la actividad de síntesis de las células en cultivo pero no la funcionalidad de las moléculas así sintetizadas, es decir, la cantidad de moléculas en la MEC.

30 Sólo el análisis inmunohistoquímico permite determinar, y solamente en parte, la funcionalidad de las moléculas de la MEC así sintetizadas. Esta técnica consiste en eliminar el medio de cultivo, marcar con anticuerpos dirigidos contra las moléculas de la MEC estudiadas, luego leer y/o visualizar la fluorescencia. Esta técnica permite cuantificar las moléculas contenidas en el compartimiento intracelular, extracelular y en la MEC y sobretodo visualizar su localización. Esta técnica es no obstante difícil de emplear y necesita equipamiento costoso. La técnica en sí misma no permite además analizar un gran número de ingredientes. Por otro lado es subjetiva y depende del experimentador. Así, antes de la presente invención ninguna medición cuantitativa objetiva permitía determinar la cantidad de moléculas funcionales, es decir, las moléculas realmente integradas en la MEC y en particular las moléculas que constituyen la MEC, de manera suficientemente rápida, fiable, simple y predictiva. Por otra parte ningún método permite la criba de ingredientes de interés cosmético y/o farmacéutico.

Ahora bien, una síntesis importante de moléculas de la MEC por células en cultivo mediciones en el medio intracelular y/o extracelular no se traduce necesariamente por una cantidad más importante de moléculas funcionales, es decir, de moléculas en la MEC.

40 En efecto, la solicitante ha podido constatar que algunos ingredientes activos cosméticos permiten estimular globalmente la síntesis de colágeno de la MEC sin no obstante visualizar una mejora de la funcionalidad del colágeno, es decir, de aumento del contenido de colágeno en la MEC. La solicitante ha constatado igualmente que algunos ingredientes mejoran la funcionalidad del colágeno, es decir, su contenido en la MEC sin no obstante medir el aumento de la síntesis de procolágeno (ejemplos 6 y 7).

45 Las técnicas del arte anterior no son por lo tanto apropiadas para cuantificar la funcionalidad de las moléculas de la MEC, es decir, su contenido en la MEC y porque ellas no son directas ni suficientemente fiables, predictivas, reproducibles, repetibles y específicas. Por otra parte, no permiten la selección o "cribado" de ingredientes cosméticos y/o farmacéuticos susceptibles de mejorar la funcionalidad de las moléculas de la MEC de una manera satisfactoria y de visualizar los efectos en la MEC.

50 La solicitante de la patente GB2438999 se relaciona con un método para analizar la expresión de LOXL en cultivos de células de músculo liso. Esta solicitud describe particularmente una prueba que comprende las etapas de cultivo de células de músculo liso, recolección del medio de cultivo, lisis celular con un regulador de lisis, recolección del lisado celular y de la dosificación de los LOX y LOXL por un método inmunológico.

55 La solicitud de patente WO03/062830 describe un método de cribado de la fibronectina que tiene los dominios EDIIIA+ y EDIIIB+. Esta solicitud describe particularmente la utilización de NH₄OH para la lisis celular.

5 Los artículos Diquelou A. et al, 1995, Relationship between endothelial tissue factor and thrombo genesis under blood conditions, Thrombosis and haemostasis, vol 74, n°2, p778-783 et Ryan J et al, 1992, Tumornecrosis factor-induced endothelial tissue factor is associated with subendothelial matrix vesicles but is not expressed on the apical surface, Blood, vol 80, n°4, p966-974, han descrito la dosificación de TF sintetizada por HUVECS después de 4 u 8 h de cultivo. No obstante, tales duraciones de cultivos son insuficientes para las células en cultivo que sintetizan una MEC y para estudiar la funcionalidad las moléculas constitutivas y/o contenidas en la MEC. Estos experimentos tienen por otro lado una finalidad diferente.

10 Existe por lo tanto una necesidad de disponer de una técnica de dosificación de moléculas de la MEC sintetizadas por células en cultivo que permita dosificar directamente, de manera cuantitativa, de manera fiable, simple, repetible, predictiva y específica la funcionalidad de las moléculas de la MEC, es decir, su contenido en la MEC. Existe por otra parte una necesidad de disponer de una técnica de dosificación no desnaturalizante de la MEC y que permita cuantificar y visualizar la molécula estudiada en el seno de la MEC y de estudiar in situ, particularmente en su forma funcional y en sus interacciones con las otras moléculas de la MEC.

15 La solicitante descubre ahora de manera sorprendente e inesperada que este problema puede ser resuelto efectuando una etapa de lisis específica de las células en cultivo y una dosis directa sobre la MEC de las moléculas de interés. El método según la invención suministra así una solución técnica del arte anterior y presenta la ventaja de ser rápido, miniaturizable, y permite la criba de un gran número de ingredientes para su capacidad de aumentar o disminuir la cantidad de moléculas en la MEC, ventajosamente bajo forma automatizable. El método según la invención tiene igualmente la ventaja de no destruir la MEC y permitir a la vez la cuantificación y la visualización de moléculas de la MEC.

20 La presente invención tiene por objeto un método de dosificación in vitro por técnica inmunológica de al menos una molécula de la matriz extracelular (MEC) sintetizada por células en cultivo que comprenden al menos las etapas:

- a) una etapa de cultivo de células con confluencia durante al menos 24 horas,
- b) una etapa preferencial de pretoma del medio de cultivo,
- 25 c) una etapa de lisis celular por una solución de amina cuaternaria,
- d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación de ADN y/o de la dicha molécula de la MEC en el lisado celular,
- e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC en la matriz extracelular,
- 30 y en la cual las células en cultivo se mantienen en cultivo en estado de confluencia durante una duración que va de 24 a 96 horas antes de la realización de la etapa c).

Este método permite ventajosamente dosificar la molécula de la MEC en los diferentes compartimientos: intracelular, en el medio de cultivo y en la MEC.

35 La presente descripción se relaciona con un método de dosificación in vitro por técnica inmunológica de al menos una molécula de la matriz extracelular sintetizada por células en cultivo que comprende al menos las etapas:

- a) una etapa de cultivo de células y preferiblemente cultivo de células con confluencia durante al menos 24 horas,
- b) una etapa preferencial de pretoma del medio de cultivo,
- c) una etapa de lisis celular por una solución de amina cuaternaria, preferiblemente por una solución de amina cuaternaria con una concentración comprendida entre 100 μ m y 2 M,
- 40 d) una etapa de pretoma del lisado celular,
- e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula en la matriz extracelular.

La presente descripción se relaciona además con un método de dosificación in vitro por técnica inmunológica de al menos una molécula de la matriz extracelular sintetizada por células en cultivo que comprenden al menos las etapas:

- a) una etapa de cultivo de células y preferiblemente cultivo de células con confluencia durante al menos 24 horas,

b) una etapa de pretoma del medio de cultivo y de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC,

c) una etapa de lisis de las células por una solución de amina cuaternaria, preferiblemente por una solución de amina cuaternaria con una concentración comprendida entre 100 μm y 2 M,

5 d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación del ADN y/o de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC,

e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular.

10 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización del método de dosificación según la invención para la criba y/o el estudio in vitro de al menos un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico por sus propiedades para aumentar o disminuir la cantidad de una molécula en la matriz extracelular.

La presente invención tiene igualmente por objeto un método de criba y/o de estudio in vitro de al menos un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico por sus propiedades para aumentar o disminuir la cantidad de una molécula en la matriz extracelular que comprende al menos las etapas:

15 a) una etapa de cultivo de células en presencia del ingrediente,

b) preferiblemente una etapa de pretoma del medio de cultivo y aun preferiblemente de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC en el dicho medio de cultivo así pretomado,

c) una etapa de lisis celular por una solución de amina cuaternaria,

20 d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación del ADN y/o de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC,

e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular,

y en el cual el cultivo de células en el medio de cultivo que contiene el ingrediente cosmético y/o farmacéutico se efectúa durante al menos 24 horas.

25 La presente invención se relaciona igualmente con un método de criba y/o de estudio in vitro de al menos un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico por sus propiedades para aumentar o disminuir la cantidad de una molécula en la matriz extracelular que comprende al menos las etapas:

a) una etapa de puesta en cultivo de células y cultivo de células en presencia del ingrediente, preferiblemente durante al menos 24 horas después de la confluencia,

30 b) preferiblemente una etapa de pretoma del medio de cultivo y aun preferiblemente de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC en el dicho medio de cultivo así pretomado,

c) una etapa de lisis celular mediante una solución de amina cuaternaria, preferiblemente mediante una solución de amina cuaternaria con una concentración comprendida entre 100 μm y 2 M

35 d) una etapa de pretoma del lisado celular preferiblemente de dosificación del ADN y/o de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC,

e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular.

40 Otro objeto de la presente invención es la utilización de un kit de dosificación por método inmunológico en un método de dosificación o de criba según la invención, comprendiendo el dicho kit una solución de amina cuaternaria, preferiblemente una solución de amina cuaternaria con una concentración comprendida entre 100 μm y 2 M, y un anticuerpo dirigido contra la molécula de la MEC, eventualmente acoplada con un anticuerpo secundario:

45 Otro objeto de la presente invención es un procedimiento de selección de una solución de lisis útil en el método de dosificación o en el método de criba según la invención caracterizado porque el método de dosificación según la invención se emplea con una solución de lisis que se va a probar durante al menos preferiblemente 10 min y la relación de resultado de la dosificación de la molécula de la MEC obtenidos en la etapa e) sobre el resultado de dosificación del ADN del lisado celular con la etapa d) es comparada con el obtenido con una solución de lisis de hidróxido de amonio 20 mM aplicado durante el mismo tiempo, preferiblemente 10 minutos.

Según la invención, se entiende por "moléculas de la MEC", las moléculas orgánicas que constituyen y/o están contenidas en la matriz extracelular y que son sintetizadas por células, de origen humano o animal.

Se trata particularmente de proteínas constitutivas de la MEC, en particular seleccionadas entre:

- 5 • La familia de colágenos de la MEC: los colágenos fibrilares particularmente de tipo I, III, V, los colágenos FACITS (Colágeno asociado con fibrilo con hélice triple interrumpida) particularmente de tipo VI, XII, XIV, XVI, los colágenos IV y VII, los colágenos XXII, XXVII y XVIII

• La familia de las fibras elásticas de la MEC: elastina, tropoelastina, proteínas asociadas con la elastina particularmente la fibrilina 1, lisil oxidasas, particularmente LOX y LOXL, EBP (Proteína de enlazamiento a elastina), fibulinas 3 y 5, Emilinas 1 y 2.

- 10 Se trata particularmente de proteoglicanos constitutivos de la MEC, en particular los proteoglicanos secretados seleccionados entre Perlecan, versican, proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs) particularmente decorina, biglicano y lumicano.

Se trata igualmente de glicoproteínas constitutivas de la MEC, particularmente la fibronectina, laminina, SPARC (Proteína secretada rica en cisteína), tenascina, nidogena 1.

- 15 Se trata además de glicosaminoglicanos (GAG) constitutivos de la MEC, en particular ácido hialurónico, sulfato de heparán, sulfato de dermatán, sulfato de condroitina.

Se trata igualmente de factores de crecimiento de la MEC que son proteínas contenidas en la MEC, particularmente VEGF, PDGF, HGF, FGF, y en particular FGF2 y FGF 7.

- 20 La presente invención permite muy ventajosamente dosificar las moléculas constitutivas de la MEC y visualizarlas in situ en el pozo, es decir, sin destrucción de la MEC.

Algunas moléculas de la MEC existen en otros compartimientos diferentes de la MEC bajo la forma de precursores.

"Moléculas de la MEC" designan las moléculas en la MEC o en otros compartimientos particularmente intracelular y extracelular en el medio de cultivo, eventualmente bajo forma de precursores.

- 25 Según la invención, se entiende por "precursor de molécula de la MEC" una forma nativa y/o intermediaria de la molécula de la MEC, sintetizada por la célula, antes de constituir o ser contenida en la MEC. Estas formas sufren fenómenos de maduración antes de estar en la MEC y son así designados a menudo por los prefijos 'Pro-' o 'Tropo-'. Se trata por ejemplo los procolágenos, tropocolágenos, proelastina, tropoelastina.

- 30 Según la invención, se entiende por "célula(s) en cultivo", células humanas o animales capaces de sintetizar una o varias moléculas de la MEC. Estas células en cultivo son cultivadas según el método según la presente invención y la o las moléculas de la MEC que se han sintetizado son dosificadas según la presente invención. Son preferiblemente de tipo diferenciado, particularmente bajo forma de precursores celulares diferenciados o células diferenciadas no precursoras. Pueden ser normales, mutadas o inmortalizadas, cultivadas en monocapa eventualmente en cocultivos con uno o varios de otros tipos celulares capaces o no de sintetizar una o varias moléculas de la MEC. Estas células son particularmente células estromales, preferiblemente fibroblastos, osteoblastos, y/o adipoblastos, preadipocitos, adipocitos, células epiteliales preferiblemente queratinocitos o células endoteliales. Son extraídas de biopsias preferiblemente de piel, o en líneas celulares. Según el modo de realización preferencial, la presente invención es particularmente ventajosa para el estudio de moléculas constitutivas de la MEC sintetizadas por fibroblastos en cultivo. En efecto, una MEC funcional esencial en la estructura de los tejidos cutáneos y el método según la presente invención hace este acceso posible en el pozo de cultivo, después de 2 a 4 días de cultivo de fibroblastos postconfluencia.

- 40 Según la invención, se entiende por 'método inmunológico', las técnicas de dosificación cuantitativa por anticuerpos dirigidas contra proteínas o azúcares.

- 45 Se trata de técnicas de dosificación en enzima-sustrato de tipo EIA (Inmunoensayo Enzimático) particularmente ELISA (Ensayo inmunosorbente enlazado a enzima), de radiomarcación llamado RIA (radio inmunoensayo) y de medición de fluorescencia llamado FIA (Inmunoensayo Fluorescente) en particular por fluorescencia en tiempo retardado llamado TRF (Fluorescencia resuelta en el tiempo).

Según la invención, se entiende por 'ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico', una o varias moléculas naturales y/o de síntesis y/o un extracto vegetal, eventualmente sintetizado y/o modificado por ingeniería biológica, en particular por fermentación por microorganismos, de los cuales las propiedades sobre las moléculas de la MEC son evaluadas por sus capacidades de aumentar o disminuir la cantidad de molécula en la MEC.

Según un aspecto, la invención es un método de dosificación in vitro por técnica inmunológica de al menos una molécula de la matriz extracelular sintetizada por células en cultivo según la reivindicación 1 que comprende al menos las etapas sucesivas:

- etapa de cultivo de células
- 5 • una etapa preferencial de pretoma del medio de cultivo
- etapa de lisis celular por una solución de amina cuaternaria
- etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación de ADN y/o de la dicha molécula de la MEC en el lisado celular
- etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC en la matriz extracelular.

10 El método según la invención permite dosificar al menos una molécula de la MEC y ventajosamente una o dos, aun preferiblemente al menos dos.

15 Según un modo preferencial, las moléculas de la MEC, se seleccionan entre proteínas constitutivas de la MEC, glicoproteínas constitutivas de la MEC, Iglicoaminoglicanos constitutivos de la MEC, proteoglicanos constitutivos de la MEC y factores de crecimiento contenidos en la MEC. Aun preferiblemente, se seleccionan entre los colágenos de tipo I, III, V, VI, XII, XIV, XVI, IV y VII, elastina, tropoelastina, fibrilina 1, LOX, LOXL, PBB (Proteína de enlazamiento a elastina), fibulinas 3 y 5, Emilina 1 y 2, Perlecan, versican, decorina, biglicano, lumicano, fibronectina, laminina, ácido hialurónico, sulfato de heparán, VEGF, PDGF, FGF - 2, FGF-7 y HGF.

Según un modo particularmente ventajoso, las moléculas de la MEC se seleccionan entre los colágenos de tipo I, III, V, XVIII, IV, VII, perlecano, fibronectina, el FGF-2, elastina, ácido hialurónico. Según un modo preferido, las moléculas de la MEC se seleccionan entre los colágenos de tipo I, III, V, XVIII, IV y VII.

20 Las células capaces de sintetizar las moléculas de la MEC son cultivadas in vitro preferiblemente en monocapas según las técnicas habituales en la materia. Son sembradas sobre soporte de cultivo apropiado, preferiblemente una placa de cultivo celular que comprende pozos, y cultivadas en un medio de cultivo apropiado hasta un estado de confluencia, preferiblemente entre 80 y 100% de confluencia, aun preferiblemente entre 90 y 100%, aun preferiblemente 100%.

25 Para la utilización del método de criba en medio en flujo, las placas son ventajosamente placas de 96 o 384 pozos. De manera clásica las placas pueden estar "recubiertas" es decir tratadas para mejorar la adherencia de las células por un revestimiento que puede ser particularmente de moléculas constitutivas de la MEC. De manera preferencial, las placas serán no cubiertas o cubiertas con una molécula diferente de aquella de la cual se efectúa la medición y/o de la cual se estudia su contenido en la MEC. Según un modo preferencial, las células en cultivo se escogen entre fibroblastos, preferiblemente dérmicos y/o queratinocitos y/o adipositos, ventajosamente humanos, y preferiblemente extractos de biopsias, preferiblemente de piel, preferiblemente de células humanas normales, es decir, no mutadas no inmortalizadas. Estudios efectuados han mostrado en efecto que el método según la invención conviene particularmente bien a estos tipos celulares.

30 Es generalmente en el estado de confluencia que las células comienzan a secretar las moléculas de la MEC. Así, por el método de dosificación según la invención, las células se mantienen en cultivo en el estado de confluencia durante una duración que va de 24 a 96 horas, preferiblemente durante 48 horas. Así, por el método de criba según la invención, las células se mantienen en cultivo en el estado de confluencia durante una duración de al menos 24 horas y preferiblemente hasta 6 días, preferiblemente va de 24 a 96 horas, y aun preferiblemente durante 48 horas. Según un modo particularmente ventajoso de los métodos de la invención, el colágeno es la molécula de la MEC dosificada y el cultivo de fibroblastos se mantiene ventajosamente durante aproximadamente 48 horas.

40 Según un modo de realización, en confluencia, un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico se agrega en el medio de cultivo. Puede igualmente tratarse de un ingrediente testigo de estimulación o inhibición de moléculas de la MEC. Preferiblemente, el testigo de estimulación se selecciona entre preferiblemente vitamina C y TGF beta y ventajosamente cuando las células en cultivo son fibroblastos. La vitamina C es seleccionada entonces ventajosamente en una dosis comprendida en una gama que va de 5 µm a 100 µm, aun preferiblemente a 50 µm. El TGF beta es utilizado entonces ventajosamente en una dosis que va de 1 ng/ml a 100 ng/ml, preferiblemente a 10 ng/ml.

De manera preferible para el método de dosificación según la invención, el cultivo de células en confluencia en el medio de cultivo que contiene el ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico se efectúa durante una duración que va de 24 a 96 horas, preferiblemente durante 48 horas.

50 De manera preferencial para el método de criba según la invención, el cultivo de células en confluencia en el medio de cultivo que contiene el ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico se efectúa durante al menos 24 horas, preferiblemente hasta 6 días y preferiblemente de 24 a 96 horas, preferiblemente durante 48 horas.

Una etapa de pretoma del medio de cultivo total o parcial se efectúa entonces preferiblemente. Según un modo ventajoso, la molécula de la MEC estudiada y contenida en el medio de cultivo, eventualmente bajo una forma precursora, es dosificada por método inmunológico, preferiblemente por dosificación tipo ELISA.

- 5 El método según la invención comprende entonces una etapa de lisis celular en cultivo con una solución de amina cuaternaria, preferiblemente una solución acuosa, aun preferiblemente una solución de amonio eventualmente bajo forma de sales. Según un modo preferencial, la solución de amina cuaternaria se selecciona entre una solución de cloruro de amonio, una solución de hidróxido de amonio y sus mezclas.

Según la invención, se entiende por "solución de amina cuaternaria" una solución en la cual la forma cuaternaria de la amina representa al menos 51% de las formas de la amina.

- 10 Según un modo preferencial, la solución de amina cuaternaria contiene solamente la amina cuaternaria en solución acuosa. Según otro modo preferencial, la solución de amina cuaternaria tiene un pH básico, preferiblemente comprendido entre 10 y 13, aun preferiblemente 11.

- 15 Los resultados presentados en el ejemplo 3 ponen en evidencia las ventajas de las soluciones de amina cuaternaria frente a las soluciones clásicas para lisis celular. De manera sorprendente, la solución de amina cuaternaria presenta en efecto las mejores tasas de lisis celular y de dosificación de las moléculas de la MEC.

Durante esta etapa de lisis, la solución de amina cuaternaria se pone en contacto con las células en cultivo, en un estado de confluencia y preferiblemente después del retiro total o parcial del medio de cultivo.

- 20 La solución de amina cuaternaria se aplica en una concentración suficiente para lisar las células. Los estudios efectuados por la solicitante han puesto en evidencia que una concentración suficiente para lisar las células está comprendida generalmente en una gama que va de 100 μ M a 2 M. Según un modo preferencial, la concentración de la solución de amina cuaternaria es de 1 mM a 200 mM, aun preferiblemente de 10 mM a 100 mM aun preferiblemente 20 mM. En el caso particular donde el medio de cultivo no ha sido pretomado o lo ha sido solo parcialmente, el factor de difusión es considerado para ajustar la concentración de la solución de amina cuaternaria.

- 25 Estos estudios efectuados de los cuales una parte está presente en los ejemplos 2 muestran particularmente que el tiempo de lisis preferencial está comprendido entre 5 y 60 minutos. En efecto, los resultados obtenidos con tiempos más largos no son mejores y no justifican los tiempos de lisis más largos.

- 30 Según un modo ventajoso, la solución de amina cuaternaria se selecciona entre una solución de cloruro de amonio con una concentración comprendida en una gama que va de 100 μ M a 2 M, preferiblemente de 1 mM a 200 mM, preferiblemente 10 mM a 100 mM, preferiblemente con una concentración de 20 mM, y entre una solución de hidróxido de amonio con una concentración comprendida en una gama que va de 100 μ M a 2 M, preferiblemente de 1 mM a 200 mM, preferiblemente 10 mM a 100 mM, preferiblemente con una concentración de 20 mM y sus mezclas.

- 35 Según un modo alternativo, la solución de amina cuaternaria se selecciona preferiblemente por comparación a los resultados obtenidos con la solución de hidróxido de amonio 20 mM durante 10 minutos y da en particular, cuando se prueba en las mismas condiciones, la misma relación de molécula de la MEC/ADN con más o menos 16%, y preferiblemente sin diferencia significativa con hidróxido de amonio 20 mM durante 10 minutos.

- 40 Según un modo preferencial, se selecciona la concentración y el tiempo de aplicación de la solución de amina cuaternaria, preferiblemente de amonio por comparación con los resultados obtenidos con una solución de lisis de hidróxido de amonio 20 mM aplicada durante 10 minutos. Así, la relación del resultado de dosificación de la molécula de la MEC obtenida en la etapa e) sobre el resultado de dosificación del ADN en el lisado celular se compara este obtenido con una solución de lisis de hidróxido de amonio 20 mM aplicada durante el mismo tiempo.

Preferiblemente, la comparación se efectúa por una prueba de análisis estadístico de las variancias llamada One Way Anova y la concentración y los tiempos de aplicación se seleccionan de tal manera que la relación de la solución probada no sea significativamente diferente por al menos $p < 0.05$ y preferiblemente $p < 0.001$.

- 45 La etapa de lisis se efectúa preferiblemente a temperatura ambiente, preferiblemente entre 15°C y 25°C, preferiblemente a 20°C. Se efectúa preferiblemente bajo agitación.

El método según la invención comprende a continuación una etapa de pretoma del lisado celular.

- 50 El lisado celular es analizado. Se efectúa una etapa de medición de la cantidad de ADN con el fin de racionalizar los resultados de dosificación de las moléculas de la MEC por cantidad de ADN. Esto hace así posible la comparación de los resultados reportados indirectamente al número de células viables en cultivo. En el caso de una evaluación de un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico en particular, este modo de realización permite así expresar el efecto observado en la molécula de la MEC, por ejemplo una estimulación por célula.

La etapa de medición de la cantidad de ADN en el lisado puede ser efectuada según las técnicas habituales en la materia por ejemplo una dosificación bioquímica con la ayuda de un agente intercalante revelado por fluorescencia.

Según un modo ventajoso, la molécula de la MEC estudiada y contenida en el lisado celular, eventualmente bajo una forma precursora, es dosificada por un método inmunológico, preferiblemente por dosificación tipo ELISA.

- 5 El método según la presente invención comprende a continuación una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular, preferiblemente por método de fluorescencia TRF.

Según un modo preferencial, los resultados de dosificación de molécula de la MEC se racionalizan por la tasa de ADN. La medición de fluorescencia puede ser convertida en la cantidad de molécula de la MEC por medio de una gama escalonada de manera habitual en este tipo de dosificación.

- 10 Según un modo preferencial, el medio de cultivo pretomado en la etapa b) y/o el lisado celular pretomado en la etapa d) son analizados para permitir ventajosamente dosificar la molécula de la MEC en los diferentes compartimientos: intracelular, en el medio de cultivo y en la MEC.

- 15 Según un aspecto, la invención tiene igualmente por objeto un método de dosificación in vitro por técnica inmunológica de al menos una molécula de la matriz extracelular sintetizada por células en cultivo según la reivindicación 1 que comprende al menos las etapas sucesivas:

a) una etapa de cultivo de células

b) una etapa de pretoma del medio de cultivo y de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC.

c) una etapa de lisis de las células por una solución de amina cuaternaria

- 20 d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación del ADN y/o de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC

e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular.

- 25 Los modos preferibles de realización han sido descritos precedentemente. Este método permite ventajosamente dosificar la molécula de la MEC en los diferentes compartimientos: intracelular, en el medio de cultivo y en la MEC.

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización del método de dosificación según la invención para la criba y/o el estudio in vitro de al menos un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico por sus propiedades para aumentar o disminuir la cantidad de una molécula en la matriz extracelular.

- 30 La presente invención tiene igualmente por objeto un método de criba y/o de estudio in vitro de al menos un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico por sus propiedades para aumentar o disminuir la cantidad de una molécula de la matriz extracelular que comprende al menos las etapas:

a) una etapa de cultivo de células y de cultivo de células en presencia del ingrediente

b) preferiblemente una etapa de pretoma del medio de cultivo y aun preferiblemente de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC en el dicho medio de cultivo así pretomado,

- 35 c) una etapa de lisis celular para una solución de amina cuaternaria.

d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación del ADN y/o de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC.

e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular,

- 40 y en el cual el cultivo de células en el medio de cultivo que contiene el ingrediente cosmético y/o farmacéutico se efectúa durante al menos 24 horas y preferiblemente de 24 a 96 horas, preferiblemente durante 48 horas.

Según un modo preferencial, el método comprende además una etapa f) de determinación de las propiedades del ingrediente que va a aumentar o disminuir la cantidad de una molécula de la matriz extracelular.

- 45 La determinación de la capacidad de estimulación o inhibición del ingrediente se efectúa entonces por relación con un experimento realizado sin ingrediente y/o efectuado con un ingrediente llamado testigo positivo. En el caso en el cual

- 5 el colágeno es la molécula de la MEC dosificada, el testigo positivo se selecciona preferiblemente entre la Vitamina C con una concentración que va de 5 μm a 100 μm y preferiblemente 50 μm , la TGF beta preferiblemente en una dosis que va de 1 ng/ml a 100 ng/ml, aun preferiblemente a 10 ng/ml y sus mezclas. El ácido ascórbico y la TGF beta son en efecto ingredientes llamados 'disparadores' del colágeno y los estudios efectuados por la solicitante han demostrado su interés en el método de dosificación según la invención (ejemplo 5).
- El ingrediente se clasifica entonces en función de la relación de dosificación de la molécula de la MEC con la etapa e) racionalizada en el ADN medido en la etapa d) por comparación con la relación de dosificación efectuada sin ingrediente y/o con un testigo positivo racionalizado en el ADN medido en la etapa d). La comparación se efectúa preferiblemente por una prueba de análisis estadístico de las variancias llamado One Way Anova.
- 10 • si la relación obtenida del ingrediente es significativamente superior a la obtenida con el testigo no tratado por al menos $p < 0.05$ y preferiblemente $p < 0.001$, entonces el ingrediente aumenta la funcionalidad de la molécula en la MEC, es decir, su contenido en la MEC
- 15 • si la relación del ingrediente es significativamente superior a la obtenida con el ácido ascórbico y/o el TGF beta por al menos $p < 0.05$ y preferiblemente $p < 0.001$, entonces el ingrediente aumenta la funcionalidad del colágeno en la MEC, es decir, su contenido en la MEC
- si la relación del ingrediente es significativamente inferior a la del testigo no tratado por al menos $p < 0.05$ y preferiblemente $p < 0.001$ entonces el ingrediente disminuye la funcionalidad de la molécula en la MEC, es decir, su contenido en la MEC
- 20 Un ingrediente de interés cosmético que tiene la capacidad de aumentar el contenido en moléculas de la MEC dosificadas en la MEC, en particular para el colágeno de manera superior con el ácido ascórbico a 50 μm puede ser utilizado para el cuidado cosmético, en particular para tratamientos antiedad, en particular para disminuir las arrugas y los signos de envejecimiento cutáneo, y/o para mejorar la firmeza de la piel.
- 25 Un ingrediente de interés farmacéutico que tiene la capacidad de aumentar su contenido en moléculas de la MEC dosificado en la MEC, en particular para el colágeno de manera superior a la vitamina C 50 μm puede ser utilizado para mejorar los procesos de cicatrización, para el tratamiento de la artrosis.
- Un ingrediente de interés farmacéutico que tiene la capacidad de disminuir el contenido de las moléculas de la MEC puede ser utilizado para el tratamiento de fibrosis y de cicatrices hipertróficas.
- 30 La presente invención tiene además por objeto la utilización de un kit de dosificación por método inmunológico en un método de dosificación según la invención y/o en un método de criba de un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico según la invención, comprendiendo el dicho kit una solución de amina cuaternaria y un anticuerpo dirigido contra la molécula de la MEC, eventualmente acoplado con un anticuerpo secundario.
- Las características preferibles y/o ventajosas de la solución de amina cuaternaria han sido descritas precedentemente en el marco del método según la invención.
- 35 El anticuerpo dirigido contra la molécula de la MEC es un anticuerpo monoclonal o policlonal y seleccionado preferiblemente entre un anticuerpo anticolágeno, un anticuerpo antielastina y sus mezclas.
- 40 El anticuerpo puede ser medido, eventualmente por acoplamiento con un anticuerpo secundario mediante las técnicas de dosificación enzima-sustrato de tipo EIA (Ensayo Inmunoenzimático), particularmente ELISA (Ensayo inmunosorbente enlazado a enzima), la radiomarcación llamada RIA (Radioinmunoensayo) y por medición de fluorescencia llamada FIA (Inmunoensayo fluorescente) en particular por la fluorescencia en tiempo retardado, llamada TRF (fluorescencia resuelta en el tiempo).
- Según un modo preferencial, el kit de dosificación comprende además una solución de ácido ascórbico con una concentración preferencial que va de 5 μm a 100 μm y preferiblemente a 50 μm . Según un modo preferencial, el kit de dosificación comprende igualmente un anticuerpo dirigido contra el precursor de la molécula MEC y/o una solución de bisbencimida para la dosificación del ADN en la molécula según la invención.
- 45 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de criba de una solución de lisis útil en el método de dosificación o según el método de criba según la invención, caracterizado porque el método de dosificación según la invención se emplea con una solución de lisis que se va a probar durante al menos 10 min, preferiblemente 10 min, y la relación del resultado de dosificación de la molécula de la MEC obtenido en la etapa e) sobre el resultado de dosificación del ADN en el lisado celular en la etapa d) se compara con el obtenido en una solución de lisis de hidróxido de amonio 20 mM aplicado durante el mismo tiempo, preferiblemente 10 minutos.
- 50

Preferiblemente, la comparación se efectúa por una prueba de análisis estadístico de las variancias llamada One Way Anova se selecciona y la solución de lisis probada si la relación de la solución probada no es significativamente diferente por al menos $p < 0.05$ y preferiblemente $p < 0.001$.

5 La solución de lisis así seleccionada puede ser utilizada en lugar de la solución de amina cuaternaria. La presente descripción se relaciona igualmente con las soluciones de lisis así seleccionadas según el procedimiento de criba según la invención.

Según un modo de realización preferido, los métodos según la invención están constituidos solamente de las etapas a), b), c), d), e) y opcionalmente f).

10 Otros objetivos, características y ventajas de la invención aparecerán claramente para el experto en el arte después de la lectura de la descripción explicativa que hace referencia a los ejemplos que son dados solamente a título de ilustración y que no serán de ninguna manera limitantes del alcance de la invención.

Los ejemplos hacen parte integrante de la presente invención y cualquier característica novedosa que aparezca con respecto a un estado de la técnica anterior cualquiera, a partir de la descripción tomada en su conjunto, incluyendo los ejemplos, hace parte integrante de la invención en su función y en su generalidad.

15 Así, cada ejemplo tiene un alcance general.

De otra parte, en los ejemplos, y salvo indicación contraria, la temperatura se expresa en grados Celsius y la presión es la presión atmosférica, salvo indicación contraria.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Método de dosificación de colágenos tipo I en la MEC según la invención

20 Principio:

La molécula de la MEC dosificada por el método según la invención es el colágeno de tipo I sintetizado por fibroblastos.

Protocolo:

- Etapa a):

25 Se siembran fibroblastos humanos normales obtenidos a partir de biopsias abdominales en placa de 96 pozos y cultivados en un medio definido (FGM) hasta un 100% de confluencia, lo que ha sido obtenido después de 3 días de cultivo.

-Etapa b):

Después de 48 horas de cultivo postconfluencia, el medio de cultivo es pretomado y eliminado.

-Etapa c):

30 Se efectúa una etapa de lisis: 110 μ l de una infusión de hidróxido de amonio 20 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación.

-Etapa d):

El lisado es pretomado y analizado. El ADN de doble cadena contenido en el lisado es dosificado por el método de la bisbencimida (Kit Picogreen Invitrogen).

35 -Etapa e)

La dosificación del colágeno en la MEC se efectúa directamente en la MEC por un anticuerpo anticolágeno I. Se ha utilizado un anticuerpo secundario acoplado a europio con una solución de revelación y se ha medido la fluorescencia (kit Delfia® - Perkin Elmer).

Los resultados de fluorescencia se han comparado con respecto a la tasa de ADNdb medida.

40 El experimento se efectuó sobre 6 pozos ($n = 6$)

Los resultados presentados corresponden a la media (Media) y la diferencia tipo (EC)

Resultados:

ES 2 656 952 T3

Col I (RFU)	Media	104228
	EC	4757
ADN (ng/ml)	Media	303.01
	EC	10.98
RELACIÓN Col I /ADN	Media	343.98
	EC	12.79

Discusiones:

Siendo la cantidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de colágeno medida, la cantidad de colágeno puede ser determinada con la ayuda de una gama escalonada.

- 5 **Ejemplo 2:** Estudio de la influencia del tiempo de lisis en el método de dosificación del colágeno de tipo I en la MEC según la invención

Principio:

La molécula de la MEC dosificada por el método según la invención es el colágeno de tipo I sintetizado por fibroblastos en función del tiempo de lisis.

- 10 Protocolo:

El protocolo descrito en el ejemplo 1 se aplica con diferentes duraciones de la etapa de lisis con la solución de hidróxido de amonio 20 mM que va de 5 minutos a 240 minutos.

El experimento se efectúa por cada duración sobre 6 pozos (n = 6)

- 15 Los resultados presentes corresponden a la media (Media) y la diferencia tipo (EC) y la significatividad determinada por análisis One Way Anova (Dunnett) en frente de la duración óptima de 10 minutos.

NS: no significativo NT: no analizable

*: significativo con $p < 0.05$ **: significativo con $p < 0.01$ ***: significativo con $p < 0.001$

Resultados:

Tabla 2

Tiempo (en min)		2'30	5	7'30	10	15	30	60	120
Col I (RFU)	Media	44319	46031	48762	50351	49301	51632	53188	52667
	EC	2416	2436	1492	1377	2224	3404	3830	4143
	Dunnett	*	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS
ADNdb (ng/mL)	Media	155,11	291,35	363,72	430,25	438,66	412,30	417,94	422,42
	T-test	26,26	46,95	15,16	39,21	28,57	15,85	15,59	17,44

Tiempo (en min)		2'30	5	7'30	10	15	30	60	120
	Dunnett	**	**	**	-	NS	NS	NS	NS
Relación= Col/ ADNdb	Media	295,57	161,88	134,18	117,86	112,87	125,31	127,22	124,89
	EC	70,62	30,23	4,91	11,29	10,11	8,13	7,07	11,68
	Dunnett	*	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS

Conclusión:

5 Se ha observado que a 2,5 minutos, el ADN extraído está en cantidad demasiado baja para ser revelador de la cantidad de células viables. A partir de 5 minutos, la cantidad de colágeno medido y la cantidad de ADNdb son homogéneas en el curso del tiempo. El colágeno no se ha degradado por la solución de hidróxido de amonio en el curso del tiempo y la duración óptima de la lisis está determinada en 10 minutos. Se han efectuado experimentos realizados durante las duraciones de la etapa de lisis que van hasta 48 horas y se han confirmado estas observaciones.

Ejemplo 3: Estudio de la influencia de la naturaleza de la solución de lisis en el método de dosificación del colágeno de tipo V en la MEC según la invención

10 Principio:

La molécula de la MEC dosificada por el método según la invención es el colágeno de tipo V en la MEC según la invención

Protocolo:

El Protocolo descrito en el ejemplo 1 se aplica de la misma manera.

15 Así, los fibroblastos humanos normales obtenidos a partir de biopsias abdominales se siembran en placa de 96 pozos y son cultivados en un medio definido (FGM) hasta 100% de confluencia.

El medio de cultivo es pretomado, después de 48 horas de cultivo postconfluencia a 37°C bajo 0,5% de CO₂.

Las soluciones de lisis probadas son las siguientes:

- solución según la invención NH₄OH: 110 µl de una solución de hidróxido de amonio 20 mM.
- 20 • solución 1: solución que contiene 52.55 g de urea, 15.01 g de tiourea, 964 mg de DTT y 37.2 mg EDTA
- solución 2: solución que contiene Tris 10 mM/Tritón al 0.1%
- solución 3: solución que contiene Hepes 50 mM
- solución 4: solución que contiene Tris HCl a 50 mM pH 7.5), un agente detergente (desoxicolato de sodio a 0.5 mM) y un agente quelante (EGTA 20 mM)
- 25 • solución 5: solución que contiene EDTA 50 mM
- solución 6: solución que contiene NaOH 0.2 N y SDS al 1%

El tiempo de aplicación de la solución de lisis probada es 10 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación.

El lisado es pretomado y analizado. El ADN de doble cadena contenido en el lisado es dosificado por el método de la bisbencimida (Kit Picogreen Invitrogen).

30 La dosificación del colágeno (V) en la MEC se efectúa directamente en la MEC por un anticuerpo anticolágeno V. Se ha utilizado un anticuerpo secundario acoplado a europio con una solución de revelación y se ha medido la fluorescencia. (kit Delfia® - Perkin Elmer).

ES 2 656 952 T3

Se mide la fluorescencia.

Se efectúa el experimento por cada solución de lisis en 6 pozos (n = 6)

Los resultados se presentan en la tabla 3.1

Se repite el experimento y las soluciones de lisis probadas son las siguientes:

- 5
- solución según la invención NH₄OH: 110 µl de una solución de hidróxido de amonio con concentraciones comprendidas entre 200 µM y 2 M.
 - solución de monoetilamina 20 mM
 - solución de dietilamina 20 mM
 - solución de trietilamina 20 mM

10 Los resultados se presentan en la tabla 3.2 y 3.3

Los resultados presentados corresponden a la media (Media) y la desviación tipo (EC) y la significatividad determinada por análisis One Way Anova (Dunnett) con respecto a la solución de lisis NH₄OH.

NS: no significativo NT: no analizable

*: significativo con p < 0.05 **: significativo con p < 0.01 ***: significativo con p < 0.001

15 Resultados:

Tabla 3.1:

Solución		NH ₄ OH	1	2	3	4	5	6
Col V (RFU)	Media	60881	61017	60947	50135	53508	46558	13513
	EC	2948	3703	2166	1768	3063	5972	4489
ADN	Media	316.27	501.08	155.80	23.50	156.22	5.80	0
	EC	21.51	128.84	13.47	7.48	5.68	3.85	0.18
Relación: Col/ ADN	Media	193,13	126,61	388,64	2342	342,76	10447	0
	EC	14,57	30,62	23,07	856	21,40	5080	0
	Anova (dunnett)	-	**	**	NT	**	NT	NT

20

Tabla 3.2:

Solución		NH ₄ OH 20 µM	Monoetilamina	Dietilamina	Trietilamina
Col V (RFU)	Media	104228	67663	46155	54680

ES 2 656 952 T3

Solución		NH ₄ OH 20 µM	Monoetilamina	Dietilamina	Trietilamina
	EC	4757	4044	1849	3176
ADN	Media	303.01	827.11	774.15	752.26
	EC	10.98	185.49	31.20	60.70
Relación: Col/ADN	Media	343.98	81.81	59.62	72.69
	EC	12.79	20	4.31	7.16
	%	100	23,78	17,33	21,13
	Anova (dunnett)	-	***	***	***

Tabla 3.3:

Solución		NH ₄ OH				
		200 µM	2 mM	20 mM	200 mM	2 M
Col V (RFU)	Media	114177	117380	104228	118318	119292
	EC	5889	6187	4757	6504	2839
ADN	Media	282,65	259,39	303,01	397,80	512,48
	EC	21,05	25,23	10,98	41,95	34,27
Relación: Col/ ADN	Media	403,95	452,53	343,98	297,43	232,77
	EC	41,81	77,75	12,79	41,73	17,50
	%	117,43	131,56	100,00	86,47	67,67
	Anova (dunnett)	ns	ns	-	ns	ns

Discusión:

- 5 Las pruebas efectuadas ponen en evidencia que la solución de hidróxido de amonio permite obtener resultados más fiables, repetibles y reproducibles que las soluciones clásicas de lisis celular y que las soluciones de amina primaria, secundaria y terciaria. La solución de hidróxido de amonio permite dosificaciones en condiciones máximas para la lisis celular y la medición de colágeno V a la vez. Las otras soluciones de amina cuaternaria probadas muestran resultados igualmente muy interesantes para la lisis celular y la medición de colágeno V a la vez. Por otra parte, las relaciones colágeno V/ADN obtenidas con diferentes concentraciones de hidróxido de amonio para lisis no son significativamente diferentes de las obtenidas con una solución 20 mM. Esta concentración de solución es óptima debido a su practicidad de utilización.
- 10

Ejemplo 4: Método de dosificación de colágeno tipo I en los tres compartimientos según la invención

Principio:

Los diferentes compartimientos: intracelular (lisado celular), medio de cultivo y MEC son recuperados y se dosifican las diferentes formas de colágeno I.

5 Protocolo:

Se aplica el método descrito en el ejemplo 1 y se analizan los medios de cultivo de lisis pretomados.

10 El experimento se efectúa sin ingrediente activo de una parte y con el ácido ascórbico solubilizado en PBS a diferentes concentraciones de 0.1 a 100 µm. En el medio de cultivo pretomado, se efectúa una dosificación de la cantidad de procolágeno (kit PIPc, TAKARA) (tabla 4.2) por ELISA, para determinar la cantidad de procolágeno extracelular (tabla 4.1).

En el medio de lisis pretomado, se efectúa una determinación de la cantidad de procolágeno (kit PIPc, TAKARA), por ELISA, para determinar la cantidad de procolágeno intracelular (tabla 4.2). Una dosificación de la cantidad de ADN (kit Picogreen, invitrogen) se efectúa igualmente para racionalizar el conjunto de las mediciones en cada pozo con la cantidad de células viables.

15 Se efectúa la dosificación de la cantidad de colágeno 1 en la MEC y se presenta en la tabla 4.3

Las cantidades de colágeno y procolágeno medidos se relacionan con la cantidad de ADN presente en cada pozo.

Se efectúa un análisis estadístico One Way Anova con respecto al testigo.

NS: no significativo NT: no analizable

*: significativo con $p < 0.05$ **: significativo con $p < 0.01$ ***: significativo con $p < 0.001$

20 Resultados:

Tabla 4.1:

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (µM)				
			0.1	1	10	50	100
ProColng/ml	Media	2104	1987	1983	2756	2852	2845
ADN	Media	340	318	303	281	279	291
Relación: ProCol / ADN	Media	6,22	6,26	6,57	9,83	10,25	9,78
Estadística	Media	100,00	100,75	105,74	158,16	164,89	157,30
	EC	7,15	4,74	9,07	12,22	12,01	9,26
	Dunnett	-	ns	ns	**	**	**

ES 2 656 952 T3

Tabla 4.2:

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (μM)				
			0.1	1	10	50	100
ProColng/ml	Media	117	116	108	114	60	66
ADN	Media	340	318	303	281	279	291
Relación: ProCol /ADN	Media	0,34	0,37	0,36	0,41	0,22	0,23
Estadística	Media	100,00	102,85	100,76	108,02	60,83	63,69
	EC	6,05	4,84	9,80	10,65	7,74	8,83
	Dunnett	-	ns	ns	ns	**	**

Tabla 4.3:

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (μM)				
			0.1	1	10	50	100
Col I	Media	75204	74156	74419	78694	79146	79796
ADN	Media	340	318	303	281	279	291
Relación: Col I/ ADN	Media	221,83	233,65	246,46	280,82	284,31	273,96
Estadística	Media	100,00	105,33	111,10	126,59	128,17	123,50
	EC	3,92	3,61	6,19	6,82	7,86	4,72
	Dunnett	-	ns	**	**	**	**

Discusión:

- 5 La cantidad de procolágeno y de colágeno puede ser calculada por comparación con una curva escalonada respectivamente de procolágeno y colágeno humano. El ácido ascórbico o vitamina C es conocido por aumentar la síntesis y la secreción de procolágeno en el medio extracelular lo que se demuestra igualmente. Estos efectos de estimulación se miden igualmente con el método según la invención, comprendido al nivel del contenido en colágeno 1 en la MEC. Este efecto es dependiente de la dosis hasta 50 μm en donde se observa el efecto umbral de la molécula.
- 10 La concentración observada en el medio intracelular bajo el efecto de la vitamina C es inferior al observado con el testigo no tratado en la medición en donde el procolágeno se ha secretado en el medio extracelular de manera más importante.

Ejemplo 5: Utilización del método de dosificación de colágeno tipo I y tipo V como método de criba:

Principio:

ES 2 656 952 T3

Los ingredientes activos de interés cosmético conocidos por su efecto estimulante de la síntesis de colágeno se prueban en cuanto a sus propiedades sobre el colágeno de tipo I en la MEC en el pozo de la MEC con respecto al colágeno de tipo V en la MEC.

Protocolo:

- 5 El experimento se efectúa según el protocolo descrito en el ejemplo 1 a partir de fibroblastos extraídos de una biopsia de un donador de edad de 63 años.

Los ingredientes activos de interés cosmético que han sido probados son:

- se prueba ácido ascórbico 50 μm solubilizado en una solución reguladora en PBS a diferentes concentraciones de 5 a 100 μm .
- 10 • se prueba un hidrolizado de proteína de soja descrito en la solicitud de patente WO2009121422 y comercializado por la solicitante bajo el nombre de Phytokine™ a diferentes concentraciones de 0.5 a 2% v/v

Las células con confluencia se incubaron en presencia de ingredientes activos durante 48 horas a 37°C bajo 0,5% de CO₂ o sin ingrediente activo (testigo) durante 48 horas a 37°C bajo 0,5% de CO₂

- 15 El experimento se efectúa para cada condición en 6 pozos (n = 6). El resultado presentado corresponde a la media (Media) y a la desviación tipo (EC)

Los resultados obtenidos para la dosificación de colágeno de tipo I bajo el efecto de Phytokine™ se presentan en la tabla 5.1 y aquellos para la dosis de colágeno de tipo V en la tabla 5.2.

Los resultados obtenidos para la dosis de colágeno de tipo I bajo el efecto del ácido ascórbico se presentan en la tabla 5.3 y aquellos para la dosis de colágeno de tipo V en la tabla 5.4.

- 20 La significatividad se calcula por la prueba One Way Anova (Dunnett) con respecto al testigo.

NS: no significativo NT: no analizable

*: significativo con $p < 0.05$ **: significativo con $p < 0.01$ ***: significativo con $p < 0.001$

Resultados:

Tabla 5.1:

Ingrediente activo		Testigo	Phytokine™ (% v/v)				
			0.5	1	1.25	1.5	2
Col I (RFU)	Media	78857	86149	81474	84256	82888	85938
	EC	793	1496	1806	3592	2868	2093
ADN	Media	282.67	284.89	271.07	272.17	260.96	254.26
	EC	6.8	7.0	4.8	7.6	6.9	8.0
Relación: Col/ADN	Media	277.54	302.06	300.42	307.51	315.94	341.07
	EC	10.4	1.8	16.2	25.3	19.4	15.6
Versus Testigo	Media	100	108.84	108.25	110.80	112.98	122.89
	EC	2.62	4.09	3.28	6.00	4.23	5.22

ES 2 656 952 T3

Ingrediente activo		Testigo	Phytokine™ (% v/v)				
			0.5	1	1.25	1.5	2
	Dunnett	-	*	*	*	*	*

Tabla 5.2:

Ingrediente activo		Testigo	Phytokine™ (% v/v)				
			0.5	1	1.25	1.5	2
Col V (RFU)	Media	13479	13483	14113	14451	15452	16818
	EC	560	1096	870	593	751	716
ADN	Media	268.68	259.81	250.56	250.72	247.90	222.37
	EC	7.9	5.2	7.7	7.7	5.5	8.6
Relación: Col/ADN	Media	49.9	51.86	56.29	57.80	62.38	72.52
	EC	1.4	5.3	1.5	3.0	2.5	6.7
Versus Testigo	Media	100	103.92	112.80	115.84	125.01	151.34
	EC	6.3	9.84	10.68	7.72	8.75	10.69
	Dunnett	-	NS	NS	*	*	*

Tabla 5.3:

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (µM)				
			5	10	25	50	100
Col I (RFU)	Media	52511	59802	59569	59088	54454	50765
	EC	3160,78	3278,42	2991,90	1412,56	5177,36	5084,09
ADN	Media	242	220	249	232	180	204
	EC	17,34	23,70	9,28	13,62	30,42	25,35
Relación: Col/ADN	Media	217,51	273,40	239,53	254,84	309,87	249,31

ES 2 656 952 T3

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (µM)				
			5	10	25	50	100
	EC	12,52	14,74	7,88	13,00	66,93	9,50
Versus Testigo	Media	100,00	125,69	110,12	117,16	130,66	114,62
	EC	5,36	7,29	3,70	6,44	10,30	4,09
	Dunnett	-	*	*	*	*	*

Tabla 5.4:

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (µM)				
			5	10	25	50	100
Col V (RFU)	Media	12337	12644	14127	16172	16230	17994
	EC	1103,62	734,56	1072,20	971,01	1125,26	460,87
ADN	Media	241	212	241	236	236	246
	EC	11,90	12,22	8,57	3,51	6,75	5,67
Relación: Col/ADN	Media	51,07	59,83	58,76	68,69	68,86	73,12
	EC	2,40	4,56	6,39	5,29	5,32	2,83
Versus Testigo	Media	100,00	117,16	115,06	134,49	134,82	143,17
	EC	6,10	8,17	11,46	9,63	9,32	5,08
	Dunnett	-	*	*	*	*	*

Discusión:

- 5 Los resultados muestran que la Phytokine™ induce una estimulación de síntesis de colágeno I y V con un efecto de dosis y de manera significativa igual que el ácido ascórbico. Para la dosificación del colágeno I la dosis óptima de eficacia del ácido ascórbico es 50 µm.

Ejemplo 6: Utilización del método de dosificación de colágeno tipo I como método de criba

Principio:

- 10 Los ingredientes activos de interés cosmético conocidos por su efecto estimulante de la síntesis de colágeno se prueban en cuanto a sus propiedades sobre el colágeno de tipo I en la MEC.

Protocolo:

El experimento se efectúa según el protocolo descrito en el ejemplo 1 a partir de fibroblastos extraídos de una biopsia de un donador de edad de 63 años.

Los ingredientes activos de interés cosmético que han sido probados son:

- ácido ascórbico 50 µm solubilizado en una solución reguladora PBS
- 5 • extracto vegetal probado a 1% (v/v), el cual es un extracto acuoso de hojas de Davilla rugosa

Las células en confluencia fueron incubadas en presencia de ingredientes activos durante 48 horas a 37°C bajo 0,5% de CO₂ o sin ingrediente activo (testigo) durante 48 horas a 37°C bajo 0,5% de CO₂.

El experimento se efectúa para cada condición en 6 pozos (n = 6). El resultado presentado corresponde a la media (Media) y la desviación tipo (EC).

- 10 La significatividad se calcula por la prueba One Way Anova (Dunnett)

NS: no significativo NT: no analizable

*: significativo con p < 0.05 **: significativo con p < 0.01 ***: significativo con p < 0.001

Resultados:

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (50 µM)	Extracto vegetal 1% (v/v)
Col I (RFU)	Media	153536	169132	263664
	EC	9729	11038	9440
ADN	Media	539,4	497,4	384,6
	EC	22,1	26,4	16,5
Relación: Col/ADN	Media	284,86	340,49	687,29
	EC	18,16	22,11	52,09
Versus Testigo	Media	100,00	119,53	241,27
	EC	6,38	7,76	18,29
	Dunnett	-	**	*

15

Discusión:

Los resultados muestran que el ácido ascórbico 50 µm y el extracto vegetal probado inducen un aumento de la cantidad de colágeno I en la MEC de manera significativa. El extracto vegetal probado es más eficaz que el ácido ascórbico y es por lo tanto un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico utilizable particularmente para el tratamiento cosmético de arrugas para aumentar la firmeza cutánea.

20

Ejemplo 7: Estudio de las propiedades de ingredientes seleccionados con el método según la invención

-Dosificación de procolágeno en el medio de cultivo:

ES 2 656 952 T3

Durante el experimento 6 el procolágeno se dosificó en el medio de cultivo pretomado en la etapa b) conforme con el método descrito en el ejemplo 4.

Los resultados se presentan en la tabla 7.

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (50µM)	Extracto vegetal 1% (v/v)
ProCol (ng/ml)	Media	1175	1983	624
	EC	156	400	18.5
ADN	Media	539	497.3	384.6
	EC	22	26.41	16.5
Relación: ProCol/ADN	Media	2.18	4.01	1.62
	EC	0.33	0.9	0.08
Versus Testigo	Media	100	171.17	74.35
	EC	14.98	31.53	3.5
	Dunnett	-	***	NS

- 5 Conclusión: el extracto vegetal no demuestra aumento de la síntesis de procolágeno en el medio de cultivo pero había demostrado un aumento de la cantidad de colágeno I en la matriz.

-Análisis inmunohistoquímico

Protocolo: se efectúa un análisis inmunohistoquímico según el protocolo siguiente:

- 10 Se sembraron fibroblastos humanos normales, provenientes de una biopsia, en láminas Labtecks de 8 pozos a razón de 40000 células/cm² y se cultivaron en medio de cultivo definido FGM hasta un 100% de confluencia. Los ingredientes evaluados, el extracto vegetal 1% v/v o ácido ascórbico 50 µm, se aplicaron durante 72 horas. Después de 72 h de cultivo postconfluencia, el medio de cultivo se eliminó y se realizó la inmunomarcación. El anticuerpo primario anticolágeno I policlonal se aplicó luego después de la eliminación del medio del anticuerpo secundario acoplado con un fluorocromo Alexa 488.

- 15 La observación de la fluorescencia se realizó con la ayuda de un microscopio confocal LSM700.

Resultados: Los resultados medidos en función de la fluorescencia son los siguientes:

Ingrediente activo		Testigo	Ácido ascórbico (50 µM)	Extracto vegetal 1% (v/v)
Área/células	Media	1871.01	124238.13	217414.26
	EC	8426.84	41013.16	47249.63
	%	100	114.96	201.18

Conclusión:

El estudio de visualización ha permitido confirmar los resultados obtenidos con el método según la invención.

Estos resultados demuestran por otra parte el interés de seleccionar un ingrediente en función de sus propiedades sobre la cantidad de moléculas en el MEC y que justifique el interés del método según la invención.

REIVINDICACIONES

1. Método de dosificación in vitro por técnica inmunológica de al menos una molécula de la matriz extracelular (MEC) sintetizada por células en cultivo que comprenden al menos las etapas:
- a) una etapa de cultivo de células con confluencia durante al menos 24 horas,
 - 5 b) una etapa preferencial de pretoma del medio de cultivo,
 - c) una etapa de lisis celular por una solución de amina cuaternaria,
 - d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación de ADN y/o de la dicha molécula de la MEC en el lisado celular.
 - e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC en la matriz extracelular,
- 10 y en el cual las células en cultivo se mantienen en cultivo en estado de confluencia durante una duración que va de 24 a 96 horas antes de la realización de la etapa c).
2. Método de dosificación según la reivindicación 1 en el cual se efectúa la etapa b) de pretoma del medio de cultivo.
3. Método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes en el cual la molécula de la MEC se escoge entre las proteínas constitutivas de la MEC, glicoproteínas constitutivas de la MEC, glicoaminoglicanos constitutivos de la MEC, proteoglicanos constitutivos de la MEC y los factores de crecimiento contenidos en la MEC, y ventajosamente seleccionados entre colágenos de tipo I, III, V, VI, XII, XIV, XVI, IV y VII, elastina, tropoelastina, fibrilina 1, LOX, LOXL, el EBP (Proteína de enlazamiento a elastina), fibulinas 3 y 5, las emilinas 1 y 2, Perlecan, versican, decorina, biglicano, fibronectina, laminina, ácido hialurónico, sulfato de heparán, el VEGF, PDGF, FGF - 2, FGF-7 y HGF.
- 15
4. Método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes en el cual las células en cultivo son escogidas entre las células estromales, preferiblemente fibroblastos, osteoblastos y/o adipoblastos, epiteliales, preferiblemente los queratinocitos o células endoteliales, y ventajosamente escogidas entre fibroblastos y/o queratinocitos y/o adipositos.
- 20
5. Método de dosificación según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual un ingrediente activo de interés cosmético y/o farmacéutico se agrega en el medio de cultivo y se escoge ventajosamente entre vitamina C, preferiblemente con una dosis que va de 5 µm a 100 µm y TGF beta, preferiblemente con una dosis que va de 1 ng/ml a 100 ng/ml.
- 25
6. Método de dosificación según una de las reivindicaciones 2 a 5 en el cual la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC es dosificado por un método inmunológico en el medio de cultivo pretomado en la etapa b), preferiblemente por dosificación tipo ELISA.
- 30
7. Método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes en el cual la solución de amina cuaternaria es una solución de amonio, eventualmente bajo forma de sales, y ventajosamente escogida entre una solución de cloruro de amonio, una solución de hidróxido de amonio y sus mezclas.
8. Método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes en el cual la solución de amina cuaternaria está a una concentración que va de 10 µm a 200 µm.
- 35
9. Método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes en el cual la solución de amina cuaternaria se aplica en los cultivos durante un tiempo que va de 5 a 60 minutos.
10. Método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes en el cual la etapa e) de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula contenida en la matriz extracelular se efectúa por el método de fluorescencia TRF.
- 40
11. Método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes que comprende al menos las etapas:
- a) una etapa de cultivo de células, y preferiblemente cultivo de células con confluencia durante al menos 24 horas.
 - b) una etapa de pretoma del medio de cultivo y de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC.
 - c) una etapa de lisis celular por una solución de amina cuaternaria,

- d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación del ADN y/o de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC
- e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular.
- 5 12. Utilización del método de dosificación según una de las reivindicaciones precedentes para la criba y/o el estudio in vitro de al menos un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico en cuanto a sus propiedades para aumentar o disminuir la cantidad de una molécula en la matriz extracelular.
- 10 13. Método de criba y/o de estudio in vitro de al menos un ingrediente de interés cosmético y/o farmacéutico para que sus propiedades aumenten o disminuyan la cantidad de una molécula en la matriz extracelular que comprende al menos las etapas:
- a) una etapa de cultivo de las células en presencia del ingrediente,
- b) preferiblemente una etapa de pretoma del medio de cultivo y aun preferiblemente de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC en el dicho medio de cultivo así pretomado,
- c) una etapa de lisis celular por una solución de amina cuaternaria,
- 15 d) una etapa de pretoma del lisado celular y de dosificación del ADN y/o de dosificación de la molécula de la MEC y/o un precursor de la molécula de la MEC,
- e) una etapa de dosificación por técnica inmunológica de la dicha molécula de la MEC contenida en la matriz extracelular,
- 20 y en la cual el cultivo de células en el medio de cultivo que contiene el ingrediente cosmético y/o farmacéutico se efectúa durante al menos 24 horas.
14. Utilización de un kit de dosificación por método inmunológico en un método de dosificación según una de las reivindicaciones 1 a 11 o en un método de criba según la reivindicación 13, comprendiendo el dicho kit una solución de amina cuaternaria y un anticuerpo dirigido contra la molécula de la MEC, eventualmente acoplado con un anticuerpo secundario.
- 25 15. Procedimiento de selección de una solución de lisis útil en el método de dosificación según una de las reivindicaciones 1 a 11 o según el método de criba según la reivindicación 13, caracterizado porque el método de dosificación se emplea con una solución de lisis que se va a probar durante al menos 10 min, preferiblemente 10 min, y la relación del resultado de dosificación de la molécula de la MEC obtenido en la etapa e) en el resultado de dosificación del ADN en el lisado celular en la etapa d) se compara con el obtenido en una solución de lisis de hidróxido de amonio 20 mM aplicada durante el mismo tiempo, preferiblemente 10 minutos.
- 30