

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 février 2005 (10.02.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/012364 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C08B 37/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/002052

(22) Date de dépôt international : 30 juillet 2004 (30.07.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0309401 30 juillet 2003 (30.07.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : AN-
TEIS S.A. [CH/CH]; Chemin des Aulx 18, c/o Fonda-
tion Genevoise pour l'innovation Technolo-
gique FONGIT,
CH-1228 Plan-Les-Ouates, Genève (CH).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : HER-
MITTE, Laurence [FR/FR]; 19, avenue André Chamson,
Résidence St Jean, F-13080 Luynes (FR). BENOIT,
Olivier [FR/FR]; 2bis, rue Paul Guiton, F-74000 Annecy
(FR).

(74) Mandataire : COURNARIE, Michèle; Cabinet Loyer,
78, avenue Raymond Poincaré, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

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

(54) Title: COMPLEX MATRIX FOR BIOMEDICAL USE

(54) Titre : MATRICE COMPLEXE A USAGE BIOMEDICAL

(57) Abstract: The invention concerns a complex matrix consisting of at least one crosslinked biocompatible polymer of natural origin whereon are grafted small chains of molecular weight less than 50000 Da with a grafting rate between 10 and 40 %, as well as a method for preparing a hardly degradable biocompatible matrix consisting of at least one polymer of natural origin, which consists in: grafting small chains of molecular weight less than 10000 Da, with a grafting rate between 10 and 40 %, and in mutually crosslinking the main chains of the polymer, to create a homogeneous matrix.

(57) Abrégé : L'invention concerne une matrice complexe constituée d'au moins un polymère biocompatible d'origine naturelle, réticulée et sur laquelle sont greffées des petites chaînes de poids moléculaire inférieur à 50 000 Da avec un taux de greffage de 10 à 40 %, ainsi qu'un procédé de préparation d'une matrice biocompatible peu dégradabile constituée d'au moins un polymère d'origine naturelle, consistant : d'une part, à greffer de petites chaînes de poids moléculaire inférieur à 10 000 Da, avec un taux de greffage de 10 à 40 %, d'autre part, à réticuler les chaînes principales du polymère entre elles, pour créer une matrice homogène.

WO 2005/012364 A2

MATRICE COMPLEXE A USAGE BIOMEDICAL

La présente invention concerne une matrice biocompatible, constituée d'au moins un polymère d'origine naturelle, fortement fonctionnalisée, permettant le
5 remplacement de fluides biologiques, la séparation des tissus ou une augmentation tissulaire. La matrice de la présente invention se caractérise par une longue rémanence *in vivo*, obtenue en retardant sa dégradation chimique, biologique et mécanique.

La présente invention propose un procédé et des compositions sous forme
10 d'une matrice complexe d'au moins un polymère d'origine naturelle, pour l'obtention de dispositifs médicaux (pharmacologiquement actifs) destinés à l'augmentation, la séparation tissulaire ou la viscosupplémentation, totalement biodégradables mais caractérisés par une longue rémanence *in vivo*.

L'injection d'une solution viscoélastique est souvent envisagée pour
15 remplacer le liquide synovial naturel qui, chez les patients arthrosiques, ne peut plus assurer ses fonctions chondroprotectrices, de lubrification et d'absorption des chocs compte tenu d'une réduction de la quantité et du poids moléculaire des glycosaminoglycanes constitutifs. Mais ces produits sont rapidement éliminés de la poche synoviale.

20 L'augmentation tissulaire est souhaitée à la fois dans le cas d'applications thérapeutiques et dans un but cosmétique.

Dans le cas d'applications thérapeutiques, certains tissus nécessitent d'être élargis pour assurer leur fonction ; cela peut être le cas des cordes vocales, de l'œsophage, du sphincter de l'urètre, d'autres muscles...

25 Les patients peuvent avoir recours à la chirurgie esthétique pour le comblement des rides, le masquage des cicatrices, l'augmentation des lèvres... Mais, en plus du coût élevé associé à cette pratique, les inconvénients sont nombreux, car c'est une procédure invasive et risquée. L'injection de matériaux destinés à l'augmentation tissulaire est une méthode très employée. Les aiguilles
30 hypodermiques utilisées comme dispositif médical ont les avantages d'être faciles d'utilisation, précises, et constituent une méthode non invasive.

Les matériaux injectables disponibles sur le marché sont des produits soit permanents, soit biodégradables.

Produits permanents, non résorbables

Il existe deux approches pour l'élaboration de produits non résorbables :
5 l'injection de silicone ou d'une suspension de particules solides dans une solution vecteur.

L'injection de silicone a été très utilisée. Cependant, compte tenu des effets indésirables à long terme (nodules, ulcères de la peau), cette méthode est peu à peu abandonnée [Edgerton et al. "Indications for and pitfalls of soft tissue augmentation
10 with liquid silicone". Plast.Reconstr.Surg, 58:157-163 (1976)].

L'injection de microparticules solides permet également une augmentation tissulaire permanente.

US-A-5344452 décrit l'utilisation d'un solide pulvérulent, constitué de petites particules, de diamètre compris entre 10 µm et 200 µm, et ayant une surface très
15 lisse. Artecoll® et Arteplast®, produits du commerce, sont constitués d'une suspension de microsphères de polyméthacrylate dans une solution de collagène.

EP-A-1091775 propose une suspension de fragments d'hydrogel de méthacrylate dans une solution de hyaluronate. Les particules de silicone, céramiques, de carbone, ou métalliques (US-A-5451406, US-A-5792478, US-A-
20 2002151466), les fragments de polytétrafluoroéthylène, de verre ou de polymères synthétiques (US-A-2002025340), et les billes de collagène ont également été utilisées mais les résultats ont été décevants compte tenu des réactions secondaires, de la dégradation biologique et de la migration des produits résiduels. En effet, les
25 particules ont au moins l'un de ces inconvénients : un diamètre trop important ou une forme irrégulière qui fait que les particules se collent les unes aux autres, ce qui peut rendre l'injection difficile à travers une fine aiguille, les particules trop fragiles peuvent se briser pendant l'injection, l'injection de particules trop petites induit une rapide digestion par les macrophages et d'autres constituants du système lymphatique, les particules injectées peuvent se déplacer et n'adhèrent pas aux
30 cellules environnantes.

Le caractère permanent de ces produits induit par conséquent des inconvénients majeurs : le risque d'activation des macrophages, la migration des fragments synthétiques constitutifs du produit ou l'apparition de granulomes qui peut nécessiter l'injection de stéroïde, ou même une excision. De plus, ce type de produit
5 ne permet pas de retouche si nécessaire.

Parmi les matériaux biologiquement dégradables, on peut trouver des suspensions de collagène ou d'acide hyaluronique réticulé.

Collagen Corporation a développé une préparation à base de collagène réticulé avec du glutaraldéhyde (US-A-4582640). Ce produit est digéré par voie
10 enzymatique, biochimique, par les macrophages, éliminé par le système lymphatique, donc dégradé rapidement. Des traitements répétés sont par conséquent nécessaires.

US-A-5137875 revendique l'utilisation de suspensions ou solutions aqueuses de collagène contenant de l'acide hyaluronique, mais ce produit ne peut constituer une solution pour un traitement à long terme.

15 EP-A-0466300 propose l'injection d'un gel viscoélastique composé d'une matrice dispersée dans une phase liquide, les deux phases étant composées par du hylan, hyaluronate de haut poids moléculaire d'origine animale, réticulé et extrait.

Les esters d'acide hyaluronique et les dérivés réticulés d'acide hyaluronique ont été développés dans le but d'augmenter les temps d'absorption de ce
20 glycosaminoglycane et donc obtenir un temps de résidence plus important. Parmi de tels produits destinés à l'usage cosmétique, on peut citer le Restylane®, gel biphasique constitué d'une phase fluide (hyaluronate non réticulé), et d'une phase très réticulée. Si les pontages inter ou intramoléculaires de polysaccharides ou d'esters de polysaccharides acides sont utiles pour de nombreuses applications, par exemple la
25 prévention des adhérences post-chirurgicales (EP-A-0850074, US-A-4851521, EP-A-0341745), ces produits ne peuvent constituer un effet longue rémanence compte tenu du haut niveau de dégradation enzymatique et de la faible durée de vie des pontages esters qui, contrairement aux liaisons éther, sont dégradables dans des environnements physiologiques (US-A-4963666).

30 Afin d'augmenter la rémanence de la matrice, on peut observer que la tendance est d'utiliser des polymères de haut poids moléculaire ou d'augmenter le

degré de réticulation. Mais, si la réticulation augmente de façon sensible la durée de vie du produit, la manipulation de ces gels fortement réticulés, donc très contraints, est très délicate car les autres sites du polymère non protégés par la réticulation sont fragilisés mécaniquement et chimiquement et plus susceptibles d'être attaqués.

5 De plus, une forte augmentation du degré de réticulation peut aboutir à des produits plus difficilement injectables.

EP-A-0 749 982 propose de greffer un antioxydant à une matrice avec un taux de greffage faible.

10 Il apparaît donc clairement que les matériaux existants ne proposent pas de solution idéale, et la recherche de nouveaux produits pour l'augmentation tissulaire, la séparation des tissus ou la viscosupplémentation continue, dans le but d'identifier des matériaux fortement biocompatibles, facilement mis en œuvre dans le cadre de leur utilisation clinique, ayant une durée de vie telle que ce produit disparaisse
15 médicaux et chirurgicaux.

Résumé de l'invention

Bien que les conditions pour l'augmentation, la séparation tissulaire et la viscosupplémentation soient connues depuis de longues années et que de nombreuses solutions aient été proposées pour des applications thérapeutiques et cosmétiques, la
20 présente invention fournit un procédé et propose de nouvelles compositions permettant au dispositif médical d'être efficace à plus long terme sans effet secondaire. Ces mêmes compositions peuvent également s'avérer utiles pour constituer des vecteurs de substances pharmacologiquement actives.

25 Le principe de la présente invention est basé sur l'occupation d'un grand nombre de sites des chaînes polymériques pour retarder les attaques chimiques et enzymatiques directement sur la chaîne principale du polymère. Le greffage de petites molécules couplé à une réticulation induit une augmentation de la densité de la matrice, par conséquent le temps nécessaire pour qu'elle soit dégradée, tout en limitant sa fragilisation induite par un degré de réticulation trop important. Le
30 couplage de deux types de fonctionnalisation, réticulation et greffage, permet également d'accroître la facilité d'utilisation d'une matrice destinée à être injectée par

rapport à une matrice qui possède le même nombre de sites occupés sur la chaîne principale du polymère mais dont le degré de réticulation est plus important. L'effet permettant la longue rémanence de la composition peut être amplifié si les molécules greffées possèdent des propriétés anti-oxydantes. Des agents anti-oxydants peuvent également être dispersés dans la matrice. L'utilisation de dérivés cellulosiques ou d'autres polymères naturellement absents chez l'être humain pour la constitution du produit permet également de retarder la dégradation de la matrice compte tenu du manque d'hydrolases spécifiques.

Dans le contexte de la présente invention, le mot site désigne tous les points de la chaîne polymère susceptibles d'être attaqués ; il peut s'agir de groupements fonctionnels pendants comme les groupements hydroxy ou carboxy ou en chaîne comme les ponts éther.

L'effet longue rémanence du dispositif médical permet d'espacer les actes médicaux et par conséquent d'améliorer la qualité de vie des patients.

Un autre objet de la présente invention est de proposer une même composition contenant une ou plusieurs molécules thérapeutiquement active(s).

Description détaillée de l'invention

La présente invention fournit une matrice monophasique complexe biocompatible à longue rémanence, composée d'au moins un polymère d'origine naturelle hautement fonctionnalisé. Par longue rémanence, on entend une durée de vie *in vivo* supérieure à celle d'un produit ayant un degré de fonctionnalisation identique mais obtenu par un autre procédé que celui de la présente invention, caractérisé le plus souvent par une simple réticulation.

La substance destinée à la viscosupplémentation ou l'augmentation tissulaire est composée d'au moins un polymère de poids moléculaire supérieur à 100'000 Da, sélectionné parmi les polysaccharides comme l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, la cellulose et ses dérivés, les xanthanes et les alginates, les protéines, ou les acides nucléiques, ce polymère étant hautement fonctionnalisé par le greffage de petites chaînes et une réticulation permettant la création d'une matrice. Par matrice, on entend donc un

réseau tridimensionnel constitué de polymères d'origine biologique doublement fonctionnalisés, par réticulation et greffage.

L'agent réticulant peut être choisi parmi notamment les époxydes di- ou polyfonctionnels, par exemple le 1,4-butanediol diglycidyl éther (aussi appelé 1,4-bis (2,3-époxypropoxy)butane), le 1-(2,3-époxypropyl)2,3-époxy cyclohexane et le 1,2-éthanediol diglycidyl éther, les épihalohydrines et la divinylsulfone.

Le taux de réticulation, défini comme le rapport entre le nombre de moles du réticulant assurant le pontage des chaînes du polymère et le nombre de moles de motifs du polymère, est compris entre 0,5 et 25 % dans le cas des produits injectables, de 25 à 50 % dans le cas de solides.

Dans le but d'augmenter l'encombrement stérique et la densité de la matrice, et par conséquent le temps nécessaire au produit pour être dégradé par une action chimique et biochimique, de petites chaînes peuvent être greffées par des liaisons ioniques ou de façon covalente, de préférence par éthérisation, sur la matrice. Ces chaînes greffées vont occuper un grand nombre de sites de la matrice, ce qui permettra d'augmenter sensiblement la durée de vie du produit sans modifier le caractère mécanique ou rhéologique du polymère constitutif de la matrice. A la protection mécanique est ajoutée une protection biologique et chimique constituée de "leures".

Les chaînes greffées sur les groupements fonctionnels du type hydroxy ou carboxy protègent vraisemblablement d'une part directement ces groupements fonctionnels ayant réagi et d'autre part indirectement les autres sites sensibles par encombrement stérique.

Les chaînes greffées peuvent être des polymères d'origine naturelle de petite taille comportant des sites attaquables plus disponibles que les sites masqués de la matrice, ou des polymères non reconnus par les enzymes de l'organisme. Dans ce dernier cas, il peut s'agir de dérivés cellulosiques ou de dérivés d'autres biopolymères non naturellement présents chez l'être humain qui ne seront pas dégradés par les enzymes de l'organisme, mais qui seront sensibles à l'attaque par les radicaux libres et d'autres radicaux réactifs. Il peut par exemple s'agir de carboxyméthylcellulose.

Les chaînes greffées peuvent être en outre des chaînes non polymères ayant des propriétés antioxydantes ou des propriétés inhibitrices des réactions de dégradation de la matrice polymère. Il peut par exemple s'agir de vitamines, d'enzymes ou de molécules cycliques.

- 5 Le taux de greffage qui est défini comme le rapport entre le nombre de moles de molécules greffées ou le nombre de moles de motifs du polymère greffé et le nombre de moles de motifs du (des) polymère(s) réticulé(s), est compris entre 10 et 40%.

10 Le greffage de chaînes de petite taille, c'est-à-dire de taille inférieure à 50 000 Da, et de préférence de l'ordre de 10 000 Da ou moins, en de nombreux sites de la matrice polymère, permet de maintenir le caractère injectable du produit final puisque le taux de réticulation n'est pas augmenté, tandis que la présence de ces chaînes greffées empêche l'attaque de la matrice par le milieu environnant et assure une plus longue rémanence au produit après injection.

- 15 Les molécules greffées peuvent être greffées par liaison covalente aux chaînes principales, directement par exemple par estérification ou étherification des groupements hydroxy ou carboxy ou par l'intermédiaire d'une molécule bi ou polyfonctionnelle choisie parmi les époxydes, les épihalohydrines ou la divinylsulfone.

- 20 L'homme de l'art comprendra aisément qu'un tel procédé de fonctionnalisation possède des avantages non négligeables par rapport à une simple réticulation.

Le greffage et la réticulation peuvent avoir lieu en même temps, ou le greffage peut précéder la réticulation, ou vice versa.

- 25 Dans le but de retarder la dégradation par les radicaux libres, une molécule possédant des propriétés anti-oxydantes peut également être dispersée dans la matrice fortement fonctionnalisée.

30 Par exemple, la vitamine C, rare molécule hydrosoluble possédant des propriétés anti-oxydantes peut être utilisée dans le cas de tissus non inflammés pour éviter l'oxydation des macromolécules organiques, pour capter les radicaux libres, mais aussi pour stimuler la synthèse de la matrice extracellulaire, particulièrement de

collagène. Cet effet peut être particulièrement intéressant dans le cas d'applications dermatologiques et cosmétiques, pour améliorer l'élasticité de la peau.

La vitamine A, qui possède de nombreux avantages (action anti-oxydante, influence sur le développement des tissus et participation à l'entretien de la peau) pourrait aussi être dispersée dans cette matrice fortement modifiée qui, par sa densité, permettrait un relargage progressif de l'agent pharmacologiquement actif.

La mélatonine, qui serait relarguée à très faible taux, est un puissant agent anti-oxydant, régénérateur de la peau et défenseur du système immunitaire qui pourrait également être dispersé dans la matrice.

Dans le but de retarder la dégradation enzymatique, l'utilisation de polymères non naturellement disponibles chez l'être humain comme les dérivés celluloses, particulièrement la carboxyméthylcellulose, est recommandée dans la composition de matrices de la présente invention, étant donné l'absence d'hydrolases spécifiques de ces polymères.

Par conséquent, l'effet longue rémanence des produits issus de la présente invention est obtenu en augmentant fortement l'encombrement stérique, en bloquant un très grand nombre de sites "attaquables" biologiquement et chimiquement sans fragiliser les autres sites, grâce à l'utilisation d'un greffage de courtes chaînes et un taux de réticulation qui reste assez faible comparativement à d'autres produits présents sur le marché.

De plus, ce type de fonctionnalisation permet pour un nombre de sites occupés identiques sur les chaînes principales du polymère constitutif de la matrice, une injectabilité facilitée par rapport à celle des gels modifiés par réticulation seulement.

La figure 1 montre la dégradation beaucoup plus lente en fonction du temps de produits injectables selon la présente invention et de deux produits disponibles dans le commerce, Juvéderm® et Restylane® (composition de gel polysaccharide de US 5827937).

L'invention concerne ainsi une matrice complexe constituée d'au moins un polymère biocompatible d'origine naturelle, réticulée et sur laquelle sont greffées des

chaînes de poids moléculaire inférieur à 50 000 Da avec un taux de greffage de 10 à 40 %.

Le polymère biocompatible d'origine naturelle constituant la matrice est avantagement choisi parmi les polysaccharides tels que l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, la cellulose et ses dérivés, les xanthanes et les alginates, les protéines, ou les acides nucléiques.

Selon un mode de réalisation préféré, le polymère biocompatible d'origine naturelle est un polymère non naturellement présent chez l'être humain tel qu'un dérivé cellulosique, un xanthane ou un alginat, qui est réticulé avec au moins un polymère naturellement présent chez l'être humain choisi parmi les polysaccharides tels que l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparate sulfate, les xanthanes et les alginates, les protéines, ou les acides nucléiques.

Avantageusement, le taux de réticulation, défini comme le rapport entre le nombre de moles du réticulant assurant le pontage des chaînes du polymère et le nombre de moles de motifs du polymère, est compris entre 0,5 et 50 %, en particulier entre 0,5 et 25 % dans le cas de produits injectables, et entre 25 à 50 % dans le cas de produits solides. Le réticulant assurant le pontage des chaînes peut provenir d'une molécule bi ou poly-fonctionnelle choisie parmi les époxydes, les épihalohydrines et la divinylsulfone.

La matrice peut contenir des agents anti-oxydants, des vitamines ou d'autres agents pharmacologiquement actifs dispersés.

L'invention concerne aussi l'utilisation de la matrice définie ci-dessus pour remplacer, combler, ou compléter un fluide biologique ou des tissus.

L'invention concerne aussi un procédé pour obtenir une matrice biocompatible peu biodégradable constituée d'au moins un polymère d'origine naturelle, caractérisée en ce qu'il consiste :

- d'une part à greffer de petites chaînes de poids moléculaire inférieur à 50 000 Da avec un taux de greffage de 10 à 40 %,

- d'autre part, à réticuler les chaînes principales du polymère entre elles, pour créer une matrice homogène.

Exemples

- 5 Des exemples sont proposés afin d'illustrer l'invention, mais en aucun cas ils ne limitent la portée de l'invention.

Première série d'exemples (exemples 1 à 3) :

Exemple 1 - (réticulation)

- 10 150 mg de hyaluronate de sodium ($M = 2 \times 10^6$ Da) et 50 mg de carboxyméthylcellulose ($M = 2 \times 10^5$ Da) sont ajoutés à 6 ml de soude 0,5 %. Le tout est homogénéisé dans un mélangeur jusqu'à ce qu'une solution transparente soit obtenue. 10 μ l de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés à la solution et le tout est mélangé pendant 12 h à 20°C. Le pH est réajusté au pH
15 physiologique. La matrice obtenue est ensuite dialysée pendant 24 h (cellulose régénérée, limite de séparation, $M = 12000-14000$) contre une solution de tampon phosphate de pH 7 (gel 1).

Exemple 2 - (réticulation)

- 20 150 mg de hyaluronate de sodium ($M = 2 \times 10^6$ Da) et 50 mg de carboxyméthylcellulose ($M = 2 \times 10^5$ Da) sont ajoutés à 6 ml de soude 0,5 %. Le tout est homogénéisé dans un mélangeur jusqu'à ce qu'une solution transparente soit obtenue. 20 μ l de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés à la solution et le tout est mélangé pendant 12 h à 20°C. Le pH est réajusté au pH
25 physiologique. La matrice obtenue est ensuite dialysée pendant 24 h (cellulose régénérée, limite de séparation, $M = 12000-14000$) contre une solution de tampon phosphate de pH 7 (gel 2).

Exemple 3 - (réticulation et greffage)

150 mg de hyaluronate de sodium ($M = 2 \times 10^6$ Da) et 50 mg de carboxyméthylcellulose ($M = 2 \times 10^5$ Da) sont ajoutés à 6 ml de soude 0,5 %. Le tout est homogénéisé dans un mélangeur jusqu'à ce qu'une solution transparente soit
 5 obtenue. 20 μ l de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés à la solution et le tout est mélangé pendant 8 h à 20°C. 40 mg de hyaluronate de benzyle (estérifié à 75 %, $M = 10^4$ Da) sont ajoutés et mélangés pendant 2 h à 20°C. 10 mg de vitamine C sont alors ajoutés et incorporés dans la matrice visqueuse. Le pH est réajusté au pH physiologique. Le tout est encore mélangé pendant 2 h. La matrice
 10 obtenue est ensuite dialysée pendant 24 h (cellulose régénérée, limite de séparation, $M = 12000-14000$) contre une solution de tampon phosphate de pH 7 (gel 3).

Calcul du taux de greffage :

$$\begin{aligned} \text{Taux de greffage} &= ((m_{\text{vitC}} / M_{\text{vitC}}) + (m_{\text{HAbenzyle}} / M_{\text{HAbenzyle}})) / \\ &((m_{\text{HA}}/M_{\text{HA}}) + (m_{\text{CMC}}/ M_{\text{CMC}})) \\ 15 &= 0,246 \text{ (c'est-à-dire 24,6\%)} \end{aligned}$$

avec : m : masse en g

M : masse moléculaire du motif du polymère en g/mol

Vit C : vitamine C

HA : hyaluronate

20 HAbenzyle : hyaluronate de benzyle

CMC : carboxyméthylcellulose

Le taux de greffage, calculé en supposant que les fonctions carboxyliques sont toutes sous forme de sel de sodium et que la carboxyméthylcellulose a un taux
 25 de substitution de 0,9, est de 24,6%.

Des études rhéologiques ont montré une diminution plus lente de ces propriétés pour le gel issu de l'exemple 2 (gel 2) que pour celui de l'exemple 1 (gel 1) lorsque ces gels sont conservés à 37°C. Bien qu'une étude *in vivo* n'ait pu être réalisée à ce jour, la dégradation du gel 2 est vraisemblablement plus lente que celle

du gel 1, qui lui-même doit être dégradé moins rapidement qu'un gel synthétisé suivant le même procédé mais composé exclusivement de hyaluronate de sodium. Ce résultat est suggéré par les données concernant la durée de vie *in vivo* de la carboxyméthylcellulose non réticulée, comparée à celle du hyaluronate de sodium non réticulé injecté à une même concentration et ayant un poids moléculaire comparable.

Le gel 2 a une durée de vie supérieure à celui issu du premier exemple grâce à un degré de réticulation deux fois plus élevé.

Le nombre de sites occupés dans le gel issu de l'exemple 3 (gel 3) est au moins égal à celui du gel 2 et la diminution de la viscosité du gel 3 au cours du temps est plus lente que celle du gel 2 (lorsque ces gels sont conservés à 37°C).

Deuxième série d'exemples (exemples 4 à 7) :

Exemple 4 - (réticulation)

1g de hyaluronate de sodium ($M = 2 \times 10^6$ Da) est placé dans 10ml d'une solution de soude à 1%. Le tout est homogénéisé grâce à un mélangeur jusqu'à ce que la solution devienne transparente. 100 μ l de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés et le tout est encore mélangé pendant 2h à 50°C. La solution est ramenée au pH physiologique et le volume est réajusté à 50ml grâce à du tampon phosphate. La matrice obtenue est ensuite dialysée pendant 24h (cellulose régénérée, limite de séparation, $M=12000-14000$) contre une solution de tampon phosphate de pH 7 (gel 4).

Exemple 5 - (réticulation)

1g de hyaluronate de sodium ($M = 2 \times 10^6$ Da) est placé dans 10ml d'une solution de soude à 1%. Le tout est homogénéisé grâce à un mélangeur jusqu'à ce que la solution devienne transparente. 130 μ l de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés et le tout est encore mélangé pendant 2h à 50°C. La solution est ramenée au pH physiologique et le volume est réajusté à 50ml grâce à du

tampon phosphate. La matrice obtenue est ensuite dialysée pendant 24h (cellulose régénérée, limite de séparation, M=12000-14000) contre une solution de tampon phosphate de pH 7 (gel 5).

5 **Exemple 6 - (réticulation)**

0.8g de hyaluronate de sodium ($M = 2 \times 10^6$ Da) et 0.2g de carboxyméthylcellulose ($M = 3 \times 10^5$ Da) sont placés dans 10ml d'une solution de soude à 1%. Le tout est homogénéisé grâce à un mélangeur jusqu'à ce que la solution devienne transparente. 130 μ l de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite
10 ajoutés et le tout est encore mélangé pendant 2h à 50°C. La solution est ramenée au pH physiologique et le volume est réajusté à 50ml grâce à du tampon phosphate. La matrice obtenue est ensuite dialysée pendant 24h (cellulose régénérée, limite de séparation, M=12000-14000) contre une solution de tampon phosphate de pH 7 (gel 6).

15

Exemple 7 - (réticulation et greffage)

0.8g de hyaluronate de sodium ($M = 2 \times 10^6$ Da) et 0.2g de carboxyméthylcellulose ($M = 3 \times 10^5$ Da) sont placés dans 10ml d'une solution de soude à 1%. Le tout est homogénéisé grâce à un mélangeur jusqu'à ce que la solution
20 devienne transparente. 130 μ l de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés et le tout est mélangé pendant 1h20 à 50°C. 0.2g d'héparine ($M=3 \times 10^3$ Da) dilué dans 4ml de solution de soude à 0.5% sont alors ajoutés au gel en cours de formation et l'ensemble est encore mis à mélanger. Le mélange est ramené au pH physiologique et le volume est réajusté à 50ml grâce à du tampon phosphate. La
25 matrice obtenue est ensuite dialysée pendant 24h (cellulose régénérée, limite de séparation, M=12000-14000) contre une solution de tampon phosphate de pH 7 (gel 7).

Calcul du taux de greffage :

30 Taux de greffage = $(m_{\text{héparine}} / M_{\text{héparine}}) / ((m_{\text{HA}} / M_{\text{HA}}) + (m_{\text{CMC}} / M_{\text{CMC}})) = 10,3\%$

avec : m : masse en g

M : masse moléculaire du motif du polymère en g/mol

HA : hyaluronate

CMC : carboxyméthylcellulose

5 Le taux de greffage, calculé en supposant que la moitié des fonctions ionisables se trouve sous forme de sel de sodium et que la carboxyméthylcellulose a un taux de substitution de 0,9, est de 10,3%.

Par ailleurs, un procédé a été mis au point pour quantifier l'injectabilité des différents gels obtenus dans les exemples 1 à 7. Ce procédé repose sur la mesure de
 10 la force nécessaire à l'éjection des différents gels obtenus au travers d'une aiguille de type 27G. Chaque gel obtenu est placé dans une seringue de 1ml dont l'embout est muni d'une aiguille de type 27G. La seringue est maintenue verticale grâce à un portoir et une masse vient appuyer sur le piston de la seringue, à une vitesse constante définie par l'utilisateur. Un capteur mesure la force nécessaire pour éjecter
 15 le produit. Dans la première série d'exemples, la vitesse d'éjection est de 75 mm/min et dans la deuxième série d'exemples, la vitesse d'éjection est de 15 mm/min.

Les valeurs de la force d'éjection mesurée pour les gels des exemples 1 à 7 sont données dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous.

Tableau 1

Gels	Force d'éjection V= 75 mm/min
1 (réticulation)	20N+/- 4N
2 (réticulation)	32N+/- 4N
3 (réticulation et greffage)	25N+/- 4N

20

D'après les résultats donnés par le tableau, pour un taux de réticulation équivalent, les gels réticulés et greffés selon l'invention présentent une force d'éjection inférieure (et donc une meilleure injectabilité) à celle des gels réticulés (comparaison des gels de l'exemple 2 et de l'exemple 3).

25

Tableau 2

Gels	Force d'éjection V=15mm/min
4 (réticulation)	14N+/- 4N
5 (réticulation)	23N+/- 4N
6 (réticulation)	26N+/- 4N
7 (réticulation et greffage)	24N+/- 4N

Comme observé précédemment, une augmentation du taux de réticulation induit une augmentation de la force nécessaire pour éjecter le produit (comparaison des gels 4 à 6). A taux de réticulation identique, cette injectabilité est plus difficile pour les gels réticulés HA/CMC. Mais, si l'injectabilité est plus élevée, la rémanence de ces gels doit également être plus longue. Le dernier exemple (comparaison des gels 6 et 7) souligne le fait que le greffage de petites chaînes d'héparine permet de diminuer la force nécessaire à l'éjection tout en protégeant la matrice réticulée, par encombrement stérique et par les propriétés biologiques de ce polymère.

REVENDICATIONS

1. Matrice complexe constituée d'au moins un polymère biocompatible d'origine naturelle, réticulée et sur laquelle sont greffées des chaînes de poids moléculaire inférieur à 50 000 Da avec un taux de greffage, défini comme étant le rapport entre le nombre de moles de molécules greffées et le nombre de moles de motifs du polymère, de 10 à 40 %.

2. Matrice selon la revendication 1, dans laquelle les chaînes greffées sont des polymères d'origine naturelle de petite taille, de préférence des dérivés cellulosiques ou des dérivés d'autres biopolymères non naturellement présents chez l'être humain et/ou des chaînes non polymères ayant des propriétés antioxydantes ou des propriétés inhibitrices des réactions de dégradation de ladite matrice, de préférence des vitamines, des enzymes ou des molécules comportant un ou plusieurs cycles.

3. Matrice selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le polymère biocompatible d'origine naturelle est choisi parmi l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, la cellulose et ses dérivés, les xanthanes et les alginates, les protéines, ou les acides nucléiques.

4. Matrice selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle le polymère biocompatible d'origine naturelle est un polymère non naturellement présent chez l'être humain tel qu'un dérivé cellulosique, un xanthane ou un alginat, qui est réticulé avec au moins un polymère naturellement présent chez l'être humain choisi parmi l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, les xanthanes et les alginates, les protéines, ou les acides nucléiques.

5. Matrice selon l'une des revendications 1 à 4, dans laquelle le taux de réticulation, défini comme le rapport entre le nombre de moles du réticulant assurant le pontage des chaînes du polymère et le nombre de moles de motifs du polymère, est compris entre 0,5 et 50 %, en particulier entre 0,5 et 25 % dans le cas de produits injectables, et entre 25 à 50 % dans le cas de produits solides.

6. Matrice selon la revendication 5, dans laquelle le réticulant assurant le pontage des chaînes provient d'une molécule bi ou poly-fonctionnelle choisie parmi les époxydes, les épihalohydrines et la divinylsulfone.

7. Matrice selon l'une des revendications 1 à 6, contenant des agents anti-
5 oxydants, des vitamines ou d'autres agents pharmacologiquement actifs dispersés.

8. Matrice selon l'une des revendications 1 à 6, contenant des vitamines ou d'autres agents pharmacologiquement actifs dispersés.

9. Utilisation d'une matrice selon l'une des revendications 1 à 8, pour séparer, remplacer, combler, ou compléter un fluide biologique ou des tissus.

10 10. Procédé de préparation d'une matrice biocompatible peu biodégradable constituée d'au moins un polymère d'origine naturelle, caractérisée en ce qu'il consiste :

- d'une part à greffer de petites chaînes de poids moléculaire inférieur à 50 000 Da avec un taux de greffage de 10 à 40 %,

15 - d'autre part à réticuler les chaînes principales du polymère entre elles, pour créer une matrice homogène.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel la ou les molécules sont greffées de façon covalente aux chaînes principales de polymère par l'intermédiaire d'une molécule bi ou poly-fonctionnelle choisie parmi les époxydes, les
20 épihalohydrines, ou la divinylsulfone.

Figure 1

