

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 116 534**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **20 12010**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 08 B 37/08** (2020.12), A 61 K 31/722, A 61 L 27/34,
A 61 K 8/73, A 61 Q 19/08, A 61 P 17/00, C 08 L 5/08

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 Billes à base de chitosane, préparation, compositions et applications.

②2 Date de dépôt : 23.11.20.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 27.05.22 Bulletin 22/21.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 22.12.23 Bulletin 23/51.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *KiOmed Pharma Société anonyme
belge — BE.*

⑦2 Inventeur(s) : *ROCASALBAS Guillermo, RABEUX
Antoine, CHAUSSON Mickaël, GAUTIER Sandrine et
HERMITTE Laurence.*

⑦3 Titulaire(s) : *KiOmed Pharma Société anonyme
belge.*

⑦4 Mandataire(s) : *Bird & Bird AARPI.*

FR 3 116 534 - B1



Description

Titre de l'invention : Billes à base de chitosane, préparation, compositions et applications

- [0001] La présente invention concerne des billes administrables et en particulier injectables, implantables ou instillables, chez un être humain ou animal, comprenant ou consistant en une matrice d'hydrogel comprenant au moins un carboxyalkyl chitosane réticulé. La présente invention concerne des compositions administrables et en particulier injectables, implantables ou instillables, chez un être humain ou animal, comprenant des billes comprenant ou consistant en une matrice d'hydrogel comprenant au moins un carboxyalkyl chitosane réticulé.
- [0002] La présente invention concerne également une méthode de préparation de ces billes, des compositions, en particulier sous forme de suspension ou dispersion, les comprenant, ainsi que leurs applications en particulier leurs applications par administration chez un être humain ou animal, notamment par injection au travers d'une aiguille pour injection ou d'un système endoscopique, par implantation, par instillation ou par toute autre voie adaptée à l'indication visée.
- [0003] La présente invention concerne notamment des billes administrables chez un être humain ou un animal comprenant ou consistant en une matrice d'hydrogel comprenant au moins un carboxyalkyl chitosane réticulé par des liaisons covalentes, des compositions les comprenant, leur procédé de fabrication et leurs différentes applications, en particulier dans le domaine thérapeutique, rhumatologique, orthopédique, ophtalmologique, médecine esthétique, chirurgie plastique, chirurgie interne, dermatologique, gynécologique, ou cosmétique.

État de la technique

- [0004] Des produits administrables chez l'être humain ou l'animal constitués de particules de polymères biorésorbables sont déjà commercialisés, notamment pour des indications de volumisation des tissus cutanés à visée esthétique et des indications de délivrance de médicaments, par injection. Cependant ces produits demandent à être améliorés, notamment en termes de tolérance, biointégration et effet volumisant.
- [0005] Il est désormais reconnu que la réponse du corps face aux systèmes particuliers administrés dans un tissu dépend de plusieurs paramètres, notamment composition, forme, taille, biodégradabilité, surface.
- [0006] Ainsi, il existe des produits commerciaux à base de billes biorésorbables qui ne sont pas sous forme d'hydrogel, mais ils présentent des risques d'induire des réactions à corps étranger et des granulomes. Ils sont donc limités à un usage localisé à des couches tissulaires profondes, et par exemple, on ne peut pas les administrer dans le

derme. De telles microsphères peuvent être injectées par voie intra-oculaire (Sustained treatment of retinal vascular diseases with self-aggregating sunitinib microparticles, Nature Comm 11, 694, 2020).

- [0007] En outre, les billes selon l'invention doivent convenir pour un usage chez l'être humain ou animal, notamment en termes de cohésion, d'innocuité, d'immunocompatibilité, de biorésorbabilité, de propriétés biomécaniques, de facilité d'administration et de durée de vie ou d'activité. Or les compositions de l'état de la technique ne présentent pas toutes de manière satisfaisante de telles propriétés et ne seraient donc pas conformes à la présente invention.
- [0008] Il existe des produits de comblement particuliers obtenus par extrusion de d'hydrogel formé par une matrice d'acide hyaluronique (HA) réticulé. Cependant, la forme obtenue par extrusion est asphérique et irrégulière, ce qui entraîne un risque de réaction à corps étranger et de granulome en général plus élevé qu'avec une forme sphérique, comme décrit entre autres par Lemperle (Biocompatibility of injectable microspheres, Biomed J Sci Tech Res 2, 1, 2018). Il est également connu que les billes d'hydrogel obtenues par extrusion requièrent une force plus importante pour l'injection au travers d'une aiguille fine que des billes d'hydrogel sphériques. Il est ainsi recommandé d'utiliser des billes d'hydrogel de forme sphérique pour favoriser une bonne tolérance à court et long terme et une facilité d'injection au travers d'aiguilles fines.
- [0009] Il existe dans la littérature, et notamment des demandes de brevets concernant des billes d'hydrogel sphériques de polymère(s) biorésorbables formées par réticulation via des liaisons non-covalentes. Par exemple, la demande internationale WO 2011089173 (Biopharmex) décrit une composition injectable destinée au comblement tissulaire des tissus mous. En particulier, cette demande décrit une suspension de microsphères avec un diamètre moyen en volume compris entre 5 et 50 micromètres, lesdites microsphères comprenant de 50 à 90 % en masse d'au moins un polysaccharide biorésorbable par rapport à la masse totale des microsphères, lesdites microsphères induisant un deuxième remplissage par induction tissulaire et contenant au moins un deuxième polymère biorésorbable. Ces microsphères d'hydrogel sont peu stables étant donné l'absence de liaisons covalentes ; leur intégrité sous leur forme et taille initiales sera donc écourtée après injection ou implantation. Leur stabilité au stockage en suspension sera également de courte durée.
- [0010] Il existe d'autres documents décrivant la préparation de billes d'hydrogel de polymères biorésorbables obtenues par réticulation par des liaisons covalentes, comme par exemple la publication de Luo et al. qui concerne des carboxyméthyl chitosanes sous forme de billes déshydratées (Development of carboxymethyl chitosan hydrogel beads in alcohol-aqueous binary solvent for nutrient delivery applications, Food Hy-

drocolloids 31, 332, 2013). Cependant, Luo et al. ont utilisé l'agent de réticulation glutaraldéhyde, qui n'est pas acceptable pour une injection chez l'être humain ou animal. Notamment, Luo et al. ne décrivent aucune des propriétés suivantes : résistance mécanique, élasticité, volumisation, immunocompatibilité, injectabilité via une aiguille, capacité à éliminer les résidus (sel et agent de réticulation) par l'étape de lavage sans abimer les billes. Mais surtout, les présents inventeurs ont découverts que cette méthode ne convient pas pour la préparation de billes d'hydrogel au départ de dérivés de chitosane fortement substitué et/ou acétylé. En outre, le dérivé de chitosane utilisé par Luo et al. présente un degré d'acétylation et un degré de substitution qui ne permettent pas de fournir une immunoréactivité acceptable. Il n'est donc pas possible pour l'homme du métier de tirer un enseignement satisfaisant de ce document pour développer les billes selon la présente invention.

[0011] Ainsi, il n'existe pas de billes injectables répondant de manière suffisamment satisfaisante aux buts que s'étaient fixés les inventeurs. Le domaine de la préparation de billes d'hydrogel à base de polymères biorésorbables, sphériques, facilement administrables notamment par injection et parfaitement bien tolérées est d'ailleurs complexe et les recherches sont encore peu développées à ce sujet. Les inventeurs ont donc cherché à développer ce pan de technologie encore peu exploré.

Buts de l'invention

[0012] La présente invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir des billes injectables présentant une bonne tolérance pour les indications visées après administration chez l'être humain ou l'animal, notamment par injection ou implantation, en particulier dans les domaines thérapeutiques, chirurgicaux et esthétiques.

[0013] La présente invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir de telles billes injectables pour des indications de volumisation (par exemple, effet volumisant/remodelage des contours du visage/du corps en médecine esthétique ou pour traiter les lipoatrophies) ou de délivrance de médicaments.

[0014] L'invention a notamment pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir des billes biorésorbables, adaptées à une utilisation en contact avec un tissu d'un être humain ou animal, acceptables en termes de propriétés biomécaniques, de durée de vie ou d'activité *in situ*, de recherche d'une bonne sécurité sanitaire, y compris une réaction immunologique et/ou réaction à corps étranger à court et long-terme acceptables, et présentant des effets bénéfiques, en particulier dans le contexte de la médecine régénérative ou de la médecine anti-âge, par exemple dans le domaine thérapeutique, rhumatologique, orthopédique, gynécologique, ophtalmologique, médecine esthétique, chirurgie plastique, chirurgie interne, dermatologique, ou cosmétique.

[0015] La présente invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à

fournir de telles billes injectables présentant une stabilité satisfaisante durant leur stockage et appropriée à l'indication visée.

[0016] La présente invention a notamment pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir de telles billes injectables présentant une tolérance, des propriétés physicochimiques, et un effet volumisant satisfaisants et pendant une durée suffisante après implantation sous-cutanée.

[0017] L'invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir des billes de propriétés modulables selon l'indication visée.

[0018] L'invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir des billes qui résistent à des étapes de purification par lavage en milieu aqueux afin d'éliminer les résidus indésirables du procédé et à équilibrer le pH et l'osmolalité des billes avec ceux d'un milieu physiologique.

[0019] La présente invention a également pour but de résoudre le problème technique consistant en la fourniture de billes injectables biorésorbables présentant un effet prolongé dans le temps, en particulier en termes d'effet volumisant et/ou de délivrance d'au moins un composé d'intérêt pour l'indication visée (principe actif thérapeutique, nutriment, etc.)

[0020] La présente invention a également pour but de résoudre le problème technique consistant en la fourniture de billes (injectables) présentant une forme essentiellement sphérique et une surface lisse, non rugueuse.

[0021] La présente invention a notamment pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir de telles billes présentant une facilité d'injection satisfaisante lorsqu'elles sont destinées à l'administration par injection, sans affecter l'intégrité des billes à la sortie du système d'injection.

[0022] La présente invention a également pour but de résoudre le problème technique consistant en la fourniture de billes pouvant être mises en suspension dans une phase aqueuse et restant intègres durant leur stockage dans une telle suspension.

[0023] La présente invention a également pour but de résoudre le problème technique consistant en la fourniture de billes pouvant être mises en suspension dans une phase aqueuse et restant intègres durant leur stérilisation dans une telle suspension, en particulier par un procédé de stérilisation à la chaleur humide.

[0024] La présente invention a pour but de résoudre les problèmes techniques énoncés ci-dessus en fournissant des billes de dérivés de chitosane.

Description de l'invention

[0025] Pour fournir des billes injectables dans le corps humain ou animal, il faut qu'elles soient biocompatibles avec le ou les tissus dans lesquels elles sont injectées ou implantées. De préférence, pour fournir des billes biocompatibles, on préfère qu'elles comprennent une matrice polymère, de préférence biopolymère, qui soit non toxique et

non-immunoréactive. Les polymères de la matrice des billes selon l'invention sont avantageusement biorésorbables et ne sont ni toxiques ni immunoréactifs. On préfère les dérivés de carboxyalkyl chitosane décrits dans les demandes PCT/EP2018/080763 et PCT/EP2018/080767 de KIOMED PHARMA, qui supportent bien que les matrices ne sont pas toxiques, ni immunoréactives. En effet, n'importe quel dérivé de chitosane ne peut pas être utilisé pour former des hydrogels acceptables pour un usage chez l'être humain ou animal, notamment en terme d'immunocompatibilité (ou d'immunoréactivité). Par immunocompatibilité on entend toute substance étrangère au corps humain ou autres organismes vivants qui ne saurait stimuler les cellules ou le système immunitaire résultant en une réponse immunitaire spécifique avec antigène. La demande PCT/EP2020/064159 concerne l'utilisation de matrices d'hydrogel préparées par réticulation de tels dérivés de chitosane. Il a été un temps envisagé d'utiliser une matrice d'un tel dérivé de chitosane réticulé selon cette demande internationale PCT/EP2020/064159 pour préparer des billes répondant aux objectifs de la présente invention. Cependant, pour préparer des billes à partir de ces matrices de dérivés de chitosane réticulés, il est nécessaire par exemple d'extruder ou de broyer l'hydrogel. Or, les inventeurs ont constaté que de telles billes n'étaient pas satisfaisantes car leur forme est asphérique, non régulière (c'est-à-dire avec des parties anguleuses, une certaine rugosité de surface, une distribution de taille peu contrôlée), ce qui augmente le risque de réaction à corps étranger une fois injectées ou implantées dans un tissu d'un être humain animal (Lemperle 2018, Biocompatibility of injectable microspheres, Biomed J Sci Tech Res 2, 1, 2018)). De même, elles sont peu faciles à injecter étant donné leur forme irrégulière.

[0026] Partant de ce constat, les inventeurs ont bâti un programme de recherche. Ils ont notamment envisagé de préparer les billes d'hydrogel sphériques à base du carboxyalkyl chitosane selon PCT/EP2018/080763 et PCT/EP2018/080767, en suivant les diverses méthodes décrites dans la littérature pour les dérivés carboxyalkylés du chitosane.

[0027] Ainsi, les méthodes de réticulation ionique ou de formation de complexes polyélectroniques décrites par exemple par Anitha et al. (Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles, Carbohydrate Polymers 78, 672, 2009), Anitha et al. (Curcumin-loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for cancer drug delivery, J Biomater Sci 23, 1381, 2012), Lin and Lin (Preparation of N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an insulin carrier, 2009), Kalliola et al. (The pH-sensitive properties of carboxymethyl chitosan nanoparticles cross-linked with calcium ions, Colloids Surfaces B, 153, 229, 2017) et Feng et al. (Chitosan/O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer

drug delivery, Int J Pharma 457, 158, 2013) n'ont pas donné de résultats satisfaisants. En effet, la plupart du temps, des billes d'hydrogel ne sont pas formées, c'est-à-dire que le polymère précipite sous forme sphérique mais n'est pas stabilisé et n'est pas viscoélastique et hydraté comme le sont des billes d'hydrogel, ou bien si elles se forment, elles ne restent pas intègres une fois incorporées dans une phase continue, elles ne sont pas stables.

[0028] Il a été découvert de manière surprenante et suite aux nombreux développements réalisés par les inventeurs que la présente invention permet de fournir des billes satisfaisantes et répondant aux buts de la présente invention.

[0029] L'invention concerne en particulier une composition comprenant une phase aqueuse comprenant une pluralité de billes, les billes comprenant ou consistant en une matrice d'hydrogel comprenant au moins un carboxyalkyl chitosane présentant des unités glucosamine, des unités N-acétyl-glucosamine et des unités glucosamine substituées par un groupe carboxyalkyl, le carboxyalkyl chitosane étant réticulé par liaisons covalentes entre les chaînes de carboxyalkyl chitosane et/ou co-réticulé par liaisons covalentes avec un ou plusieurs autres polymères.

[0030] L'invention concerne également une ou des billes injectables chez un être humain ou animal, les billes comprenant ou consistant en une matrice d'hydrogel comprenant au moins un carboxyalkyl chitosane présentant des unités glucosamine, des unités N-acétyl-glucosamine et des unités glucosamine substituées par un groupe carboxyalkyl, ledit carboxyalkyl chitosane présentant un degré d'acétylation supérieur à 30% et jusqu'à 80%, exprimé en nombre de mole de groupes N-acétyl par rapport au nombre de mole d'unités glucosamines totales, ledit carboxyalkyl chitosane étant réticulé par liaisons covalentes entre les chaînes de carboxyalkyl chitosane et/ou co-réticulé par liaisons covalentes avec un ou plusieurs autres polymères.

Carboxyalkyl chitosane

[0031] Il est connu des dérivés de chitosanes avantageux comme des carboxyalkyl chitosanes décrit dans les demandes de brevet de Kiomed Pharma déposées sous les numéros PCT/EP2018/080763 et PCT/EP2018/080767 et leur famille dont leur contenu sont cités dans la présente invention par référence. En outre la demande internationale de Kiomed Pharma, PCT/EP2020/064159, dont le contenu est cité dans la présente invention par référence, décrit des carboxyalkyl chitosanes réticulés, seuls ou co-réticulés avec un autre polymère, comme par exemple un hyaluronane.

[0032] Une matrice selon la présente invention peut être caractérisée par le carboxyalkyl chitosane de départ, qui est réticulé et/ou co-réticulé avec un ou plusieurs autres polymères pour former une matrice selon l'invention.

[0033] Selon un premier aspect, on utilise un carboxyalkyl chitosane (d'origine fongique) présentant des unités glucosamine, des unités N-acétyl-glucosamine et des unités glu-

cosamine substituées par un groupe carboxyalkyl, ledit carboxyalkyl chitosane présentant de préférence un degré de substitution par un groupe carboxyalkyl supérieur à 20%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales.

[0034] On parle également de dérivé de chitosane ou de chitosane substitué.

[0035] Le carboxyalkyl chitosane est préparé par substitution de chitosane. Typiquement, un carboxyalkyl chitosane est préparé selon les demandes de brevet de Kiomed Pharma déposées sous les numéros PCT/EP2018/080763 et sa famille (notamment FR 17 61314 et EP 18799772.1) et PCT/EP2018/080767 et sa famille (notamment FR 17 61323 et EP 18799773.9), et PCT/EP2020/064159 et sa famille (notamment FR 19 05504) qui sont citées ici par référence en particulier pour illustrer la préparation d'un carboxyalkyl chitosane.

[0036] Le chitosane est par exemple référencé sous le numéro CAS 9012-76-4.

[0037] Le chitosane utilisé pour l'invention est avantageusement d'origine fongique, et de préférence issu du mycélium d'un champignon du type *Ascomycète*, et en particulier d'*Aspergillus niger*, et/ou d'un champignon *Basidiomycète*, et en particulier *Lentinula edodes* (shiitake) et/ou *Agaricus bisporus* (champignon de Paris). De préférence, le chitosane est issu d'*Agaricus bisporus*. Le chitosane est de préférence très pur, c'est-à-dire contenant peu d'impuretés issues de son origine fongique ou du procédé de fabrication, et d'une qualité microbiologique compatible avec son utilisation comme implant ou composition pharmaceutique. Une méthode de préparation du chitosane est celle décrite dans les brevets WO 03/068824 (EP 1483299 ; US 7 556 946).

[0038] En général, la chitine est mise en suspension aqueuse en présence d'hydroxyde de sodium, puis le milieu est porté à haute température pendant une durée variable selon la masse moléculaire désirée. Le chitosane est ensuite purifié par solubilisation en milieu acide et précipité en milieu alcalin, lavé et séché.

[0039] De préférence, le chitosane est de grade suffisamment pur pour une utilisation pharmaceutique.

[0040] Le chitosane est avantageusement purifié et ensuite de préférence séché. Après purification, le procédé de l'invention peut comprendre une étape de séchage du carboxyalkyl chitosane, puis éventuellement de broyage de celui-ci pour obtenir une poudre. On peut sécher le chitosane par exemple par évaporation de l'eau, par exemple par un procédé de spray-drying (atomisation), de lit fluidisé, ou par séchage à la chaleur sous vide ou à pression atmosphérique, ou encore par lyophilisation.

[0041] On peut ensuite substituer ce chitosane pour produire un carboxyalkyl chitosane comme par exemple décrit dans l'invention.

[0042] Un tel carboxyalkyl chitosane est ensuite mis en œuvre pour préparer les billes selon l'invention.

- [0043] Par simplicité, on exprime les DA et DS en fonction du carboxyalkyl chitosane avant formation des billes.
- [0044] Le degré d'acétylation (DA) du chitosane est déterminé comme par exemple décrit dans les demandes de brevet WO 2017009335 et WO 2017009346 par titrage potentiométrique. Le DA du chitosane et du chitosane carboxyalkylé peut être mesuré par des méthodes connues pour le chitosane, comme la RMN du proton en phase liquide, la RMN du carbone 13 en phase solide, la spectrométrie infra-rouge, la spectrométrie UV-visible.
- [0045] Selon une variante, le carboxyalkyl chitosane présente un degré d'acétylation inférieur à 30%, par exemple allant de 5% à 30%, exprimé en nombre de mole unités N-acétyl- glucosamine par rapport au nombre de mole d'unités totales.
- [0046] Avantagement, le carboxyalkyl chitosane présente un degré d'acétylation compris entre 30 et 80%, exprimé en nombre de mole unités N-acétyl- glucosamine par rapport au nombre de mole d'unités totales. Le degré d'acétylation est exprimé en nombre de groupes N-acétyl (des unités D-glucosamine) par rapport au nombre d'unités totales glucosamines présentes dans le chitosane (N-acétyl-D-glucosamine, N-acétyl-D-glucosamine substituée, D-glucosamine et D-glucosamine substituée).
- [0047] Avantagement, le carboxyalkyl chitosane présente un degré d'acétylation compris entre 30 et 75%, exprimé en nombre de groupes N-acétyl par rapport au nombre d'unités totales glucosamines.
- [0048] Selon une variante, le degré d'acétylation va de 35 à 50%.
- [0049] Selon une variante, le degré d'acétylation va de 40 à 60%.
- [0050] Selon une variante, le degré d'acétylation va de 50 à 75%.
- [0051] Le degré d'acétylation du carboxyalkyl chitosane peut être déterminé par RMN du carbone 13 en phase solide ou par RMN du proton en phase liquide. Le carboxyalkyl chitosane présente avantagement un degré d'acétylation contrôlé. Par les termes « chitosane ayant un degré d'acétylation contrôlé » on entend un produit dont le degré d'acétylation, c'est-à-dire la proportion des unités N-acétyl-glucosamine, peut être ajusté de manière contrôlée, notamment par une réaction d'acétylation.
- [0052] De préférence, le carboxyalkyl chitosane est réacétylé.
- [0053] Selon une variante, le procédé de préparation du carboxyalkyl chitosane selon l'invention comprend la préparation d'un chitosane d'origine fongique, la réacétylation du chitosane et la carboxyalkylation du chitosane réacétylé. Ainsi, l'invention concerne un carboxyalkyl chitosane réacétylé. En particulier, l'invention concerne un carboxyalkyl chitosane anionique.
- [0054] Selon un mode de réalisation, on peut ainsi dissoudre du chitosane dans un milieu aqueux, de préférence légèrement acidifié (pH 6 par exemple). On peut ajouter de l'anhydride acétique à la solution de chitosane en une ou plusieurs fois. On ajoute

ensuite un agent basique comme par exemple de la soude et/ou de l'urée. On ajoute ensuite un agent alkylant comme par exemple du monochloroacétate de sodium (c'est-à-dire le sel de sodium de l'acide chloroacétique) ou l'acide chloroacétique. Ensuite le chitosane substitué est purifié, récupéré et séché.

- [0055] Selon une variante, le procédé de préparation du carboxyalkyl chitosane selon l'invention comprend la préparation d'un chitosane, la carboxyalkylation du chitosane, puis la réacétylation du chitosane carboxyalkylé. Avantageusement, une telle méthode permet un contrôle précis du degré d'acétylation du carboxyalkyl chitosane final, et en particulier d'obtenir un degré d'acétylation élevé, par exemple au-dessus de 40%. Ainsi, l'invention concerne un chitosane réacétylé puis carboxyalkylé ou un carboxyalkyl chitosane réacétylé.
- [0056] Selon une variante, le procédé de préparation du carboxyalkyl chitosane selon l'invention comprend la préparation d'une chitine d'origine fongique, la carboxyalkylation de la chitine, et éventuellement la réacétylation de la chitine carboxyalkylé pour obtenir le carboxyalkyl chitosane selon l'invention.
- [0057] Selon une variante, le procédé de préparation du chitosane carboxyalkylé selon l'invention comprend la préparation d'une chitine d'origine fongique, une déacétylation de la chitine, la carboxyalkylation de la chitine, et éventuellement la réacétylation de la chitine carboxyalkylée pour obtenir le carboxyalkyl chitosane selon l'invention.
- [0058] Selon une variante, le carboxyalkyl chitosane présente une masse moléculaire moyenne inférieure à 500 000.
- [0059] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente, de préférence une masse moléculaire moyenne de 50 000 à 400 000.
- [0060] La masse moléculaire moyenne est la masse moléculaire du carboxyalkyl chitosane avant formation des billes et réticulation. De préférence ici, la masse moléculaire moyenne est la masse moléculaire moyenne en viscosité (M_v), calculée à partir de la viscosité inhérente. Cette expression est usuelle pour l'homme du métier. La viscosité inhérente (η) est mesurée par viscosimétrie capillaire, avec un viscosimètre capillaire de type Ubbelohde, selon la méthode de la monographie 2.2.9 de la Pharmacopée Européenne. On mesure le temps d'écoulement de la solution à travers un tube capillaire adapté (Lauda, par exemple le tube capillaire Ubbelohde 510 01 de diamètre 0,53mm) à l'aide d'un viscosimètre automatique I-Visc (Lauda). Pour calculer la masse viscosimétrique moyenne du carboxyalkyl chitosane, on applique ensuite l'équation de Mark-Houwink ($\eta = K * M_v^\alpha$), où :
- M_v est la masse moléculaire moyenne en viscosité du carboxyalkyl chitosane,
 - η est la viscosité intrinsèque du carboxyalkyl chitosane,
 - les constantes K et α ont une valeur 0,0686 et 0,7638, respectivement, telles

que préalablement déterminées pour le chitosane (non substitué) par chromatographie d'exclusion stérique avec un détecteur MALLS.

- [0061] On peut usuellement exprimer la viscosité intrinsèque du carboxylakyl chitosane pour qualifier sa masse moléculaire moyenne.
- [0062] Il est possible d'hydrolyser le chitosane afin de diminuer sa masse moléculaire.
- [0063] Typiquement, dans le carboxylakyl chitosane non réticulé les unités glucosamine sont des unités D-glucosamine (unités D-glucosamine, unités N-acétyl-D-glucosamine, et au moins l'une des unités D-glucosamine et des unités N-acétyl-D-glucosamine étant substituées).
- [0064] Selon une variante, un chitosane substitué présente une substitution des unités D-glucosamine uniquement.
- [0065] Selon une autre variante, un chitosane substitué présente une substitution des unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine simultanément, et dans lequel le groupe carboxylakyl est lié de manière covalente, selon une variante aux groupes amine du chitosane uniquement, ou selon une autre variante aux groupes amine et hydroxyle du chitosane simultanément.
- [0066] La substitution est en général seulement partielle, toutes les unités ne sont pas nécessairement substituées.
- [0067] Selon un mode de réalisation, le degré de substitution des unités D-glucosamine exprimé en nombre de moles d'unités D-glucosamine par rapport au nombre de moles d'unités totales (unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, substituées ou non) du chitosane substitué, va de 30% à 250%.
- [0068] Selon un mode de réalisation, ledit carboxylakyl chitosane présente un degré de substitution par un groupe carboxylakyl supérieur à 20%, par exemple supérieur à 50%, par exemple inférieur à 200%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales.
- [0069] Selon un mode de réalisation, le degré de substitution par un groupe carboxylakyl supérieur à 50%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales.
- [0070] Selon un mode de réalisation, le degré de substitution des unités D-glucosamine exprimé en nombre de moles d'unités D-glucosamine par rapport au nombre de moles d'unités totales (unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, substituées ou non) du chitosane substitué, va de 50% à 200%, et encore de préférence supérieur à 70%.
- [0071] Selon un mode de réalisation, le degré de substitution par un groupe carboxylakyl inférieur à 80%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales.
- [0072] Typiquement, la substitution se réalise par liaison covalente.
- [0073] Selon une variante, le carboxylakyl chitosane est un N,O-carboxylakyl chitosane. La

proportion d'unités substituées par un groupe carboxyalkyl en position O (O3 et/ou O6 des unités glucosamine et/ou N-acétyl-glucosamine) et/ou en position N (des unités glucosamines) varie. Le degré de substitution peut donc être supérieur à 100%.

[0074] Avantagement, le degré de substitution (DS) et le degré d'acétylation (DA) du carboxyalkyl chitosane sont mesurés par spectrométrie de résonance magnétique (RMN) du carbone 13 en phase solide, à l'aide d'un Spectromètre Bruker (Avance III HD 400MHz, équipé d'une sonde PH MAS VTN 400SB BL4 N-P/H). Par exemple, le spectre est enregistré à température ambiante, un temps de relaxation compris entre 1 et 8 secondes, un nombre de scans compris entre 64 et 512. Les aires des signaux des carbones sont déterminées après déconvolution. Les carbones considérés sont les suivants : « CH3 acétyle » (carbone du méthyl du groupe acétyle des unités N-acétyl-glucosamine, substituées ou non), « Cx » (carbone en position x des unités glucosamine et N-acétyl-glucosamine, x allant de 1 à 6) et « C=O » (carbone du carbonyle du substituent carboxyalkyl et carbone du carbonyle C=O du groupe acétyle des unités N-acétyl-glucosamine, substituées ou non). Pour déterminer le DS d'un carboxyalkyl chitosan donné, il faut également enregistrer le spectre RMN du carbone 13 du chitosane précurseur de ce carboxyalkyl chitosan. A partir du spectre du chitosan précurseur, on calcule le « ratio CSU », c'est-à-dire le rapport entre l'aire du signal du groupe « CH3 acétyle » (carbone du méthyl du groupe acétyle des unités N-acétyl-glucosamine) et l'aire du signal du « C=O » (carbone carbonyle du groupe acétyle des unités N-acétyl-D-glucosamine). Le DA du carboxyalkyle chitosane est calculé selon la Formule 1, et le DS selon la Formule 2, où I représente l'aire du signal du carbone considéré.

[0075] Formule 1 :

[0076] [Math.1]

$$DA = \frac{I_{CH3\text{ acétyle}}}{\sum I_{C_i} / 6}$$

[0077] Formule 2 :

[0078] [Math.2]

$$DS = \frac{I_{C=O} - I_{C=O\text{ non-acétylé}}}{\sum I_{C_i} / 6}$$

[0079] De préférence, les gammes des degrés de substitution (DS) sont exprimées en relation avec le résultat de l'analyse par RMN du carbone 13 en phase solide dans la présente description, étant donné sa facilité de mise en œuvre.

[0080] On peut également déterminer le DA et le DS à l'aide d'autres méthodes connues pour les carboxyalkyl chitosanes, par exemple par RMN du proton en milieu aqueux, à l'aide d'un spectromètre de résonance magnétique, par exemple selon la méthode décrite par Liu et al. (Carb Polym 137, 600, 2016), par exemple en y ajoutant une

solution d'acide chlorhydrique deutéré.

- [0081] Si une autre méthode RMN est plus avantageuse pour estimer le DA et/ou DS de manière fiable, il convient d'utiliser une telle méthode. Les méthodes ci-dessus doivent être adaptées par l'homme du métier en ce qui concerne la préparation de l'échantillon et les signaux à intégrer, notamment en fonction de la résolution, de la robustesse et de la position des protons des signaux à utiliser pour le calcul du degré de substitution.
- [0082] Le degré de carboxyalkylation du chitosane (DS) peut varier avantageusement de 20 à 250%, de préférence de 50 à 200%, et par exemple de 70 à 170%, exprimé en nombre de moles de carboxyalkyle par rapport au nombre de moles d'unités totales.
- [0083] Selon une variante, le degré de carboxyalkylation (DS) du chitosane peut varier avantageusement de 40 à 130%, et par exemple de 70 à 130%, exprimé en nombre de moles de carboxyalkyle par rapport au nombre de moles d'unités totales.
- [0084] Le degré de substitution du chitosane est typiquement corrélé à la quantité des réactifs par rapport au chitosane au départ de la réaction. Comme agents carboxyalkylants, on peut citer les chlorures d'acide (ou leurs sels, par exemple le monochloroacétate de sodium), comme par exemple ceux portant un ou plusieurs groupe carboxyméthyle, carboxyéthyle, carboxypropyle, carboxybutyle, etc.
- [0085] Selon une variante, la présente invention concerne un carboxyalkyle chitosane où la partie alkyl du carboxyalkyl est en C1-C5, linéaire ou ramifiée.
- [0086] Selon une variante, la présente invention concerne un carboxyméthyle chitosane.
- [0087] Selon cette variante, le chitosane substitué est un chitosane N-carboxyalkylé.
- [0088] Selon cette variante, le chitosane substitué est un chitosane O-carboxyalkylé.
- [0089] Selon cette variante, le chitosane substitué est un chitosane N-carboxyalkylé et O-carboxyalkylé.
- [0090] La présente invention concerne selon un deuxième aspect un dérivé de chitosane présentant des unités glucosamine, des unités N-acétyl-glucosamine et des unités glucosamine substituées par un groupe carboxyalkyl, ledit carboxyalkyl chitosane présentant un potentiel zeta, mesuré à pH 7,5, inférieur ou égal à -10 mV, et de préférence inférieur ou égal à -15 mV. Notamment, un tel dérivé de chitosane permet de limiter la réponse immunitaire d'un sujet à qui on a administré, typiquement par ins-tillation, injection ou implantation, le dérivé de chitosane ou une composition en comprenant.
- [0091] Avantageusement, le potentiel zeta, mesuré à pH 7,5, est inférieur ou égal à -18 mV.
- [0092] Avantageusement, le carboxyalkyl chitosane présente un potentiel zeta, mesuré à pH 7,5, inférieur ou égal à -22 mV, et de préférence inférieur ou égal à -24 mV.
- [0093] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente un degré de substitution (DS) allant de 20 à 80%, et de préférence de 40 à 60%, et un degré d'acétylation (DA) de 30 à 80%, et de préférence de 30 à 75%.

- [0094] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente un degré de substitution allant de 50 à 200%, et de préférence de 70 à 200%, et un degré d'acétylation de 30 à 80%, et de préférence de 30 à 75%.
- [0095] Selon une autre variante spécifique, le chitosane substitué présente un degré de substitution allant de 90 à 200%, et de préférence de 90 à 150%, et un degré d'acétylation de 30 à 80%.
- [0096] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente un degré de substitution allant de 90 à 200%, et de préférence de 90 à 150%, et un degré d'acétylation de 30 à 60.
- [0097] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente un degré de substitution allant de 90 à 200%, et de préférence de 90 à 150%, et un degré d'acétylation de 40 à 75%.
- [0098] En substituant le chitosane, il a été possible de préparer une solution d'un carboxyalkyle chitosane soluble dans une solution aqueuse dont le pH varie dans une large gamme, alors que le chitosane non substitué n'est soluble qu'à pH en dessous de pH environ 6. Le carboxyalkyle chitosane présente ainsi une capacité à être solubilisé à différents pH grâce à la présence de groupes carboxyalkyle qui modifient son profil de solubilité, et en particulier au pH physiologique ou à d'autres pH lorsque les fluides physiologiques sont modifiés par une pathologie, par exemple une pathologie inflammatoire.
- [0099] Par « soluble dans l'eau », on entend que le carboxyalkyle chitosane ne présente pas de trouble visible à l'œil nu lorsqu'il est mis en solution aqueuse. Plus spécifiquement, on peut confirmer la solubilité, c'est-à-dire l'absence de trouble, d'une solution de carboxyalkyl chitosane à une concentration par exemple de 1% (m/m) dans l'eau ou un tampon, par exemple un tampon phosphate, par une densité optique inférieure à 0,5, et de préférence inférieure à 0,2, mesurée par spectrométrie UV-visible à la longueur d'onde de 500nm en référence à une cuve de référence ne comprenant que le solvant aqueux utilisé pour l'échantillon mesuré, mais en l'absence du chitosane substitué. Une autre méthode consiste en une inspection visuelle selon la monographie 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne. Lorsque le chitosane n'est pas suffisamment substitué, la composition n'est pas soluble dans une gamme de pH satisfaisante, par exemple allant de pH 5,5 à pH 8,5, à température ambiante.
- [0100] Selon une variante, le carboxyalkyl chitosane est stérile.
- [0101] On entend notamment par « réticulé par liaisons covalentes entre les chaînes de carboxyalkyl chitosane » que la chaîne principale du chitosane (appelée aussi squelette du chitosane ou en anglais de « chitosan backbone ») est liée de manière covalente à une ou plusieurs chaînes principales du chitosane. On obtient ainsi avantageusement un réseau tridimensionnel des molécules de chitosanes. L'invention n'est pas limitée à une

méthode de réticulation covalente particulière, mais on préfère une méthode utilisant une molécule chimique servant d'agent de réticulation, dit aussi agent réticulant. La notion de « réticulé par liaisons covalentes entre les chaînes de carboxyalkyl chitosane » s'entend en particulier par liaisons covalentes faisant intervenir des agents de réticulation liant des molécules de carboxyalkyl chitosane. Il s'agit donc de liaisons covalentes entre des chaînes de carboxyalkyl chitosane par l'intermédiaire de chaînes d'atomes (typiquement, la partie de l'agent de réticulation qui se situe entre ses fonctions réactives).

[0102] Selon l'invention, le carboxyalkyl chitosane est réticulé.

Billes

[0103] Avantageusement, les billes selon l'invention comprennent ou sont constituées d'une matrice hydratée et sous forme d'un hydrogel.

[0104] Par hydrogel, on entend le sens classique de ce terme, et notamment à savoir un réseau tridimensionnel (3D) d'au moins un polymère hydrophile qui peut gonfler dans l'eau et en retenir une quantité significative d'eau tout en conservant sa structure en raison de la réticulation des chaînes individuelles du/des polymères. On entend par bille d'hydrogel une bille hydratée qui contient au moins 70% d'eau en masse par rapport à sa masse totale humide. Typiquement, une bille d'hydrogel est capable de retenir cette masse d'eau dans des conditions ambiantes ou après administration dans un tissu.

[0105] Selon une variante, la matrice comprend au moins un polymère, par exemple au moins un hyaluronane, éventuellement réticulé sur lui-même par liaisons covalentes et/ou co-réticulé par liaisons covalentes avec le carboxyalkyl chitosane.

[0106] On entend par « réticulé sur lui-même » ou « sur eux-mêmes » que les molécules peuvent comprendre des liaisons covalentes de réticulation intra et/ou inter-chaînes moléculaires.

[0107] Avantageusement, la matrice selon l'invention hydrogel comprend ou est constituée d'un ou plusieurs polymères biorésorbables dont au moins un carboxyalkyl chitosane.

[0108] Selon une variante, la matrice selon l'invention formant un hydrogel est constituée d'un carboxyalkyl chitosane.

[0109] Selon une variante, la matrice selon l'invention formant un hydrogel comprend ou est constituée d'un carboxyalkyl chitosane réticulé sur lui-même et/ou co-réticulé avec un autre polymère, et d'un ou plusieurs autres biopolymères, éventuellement réticulé ou co-réticulé avec le carboxyalkyl chitosane.

[0110] L'invention comprend donc plusieurs variantes, dont notamment :

[0111] Une variante dans laquelle la matrice d'hydrogel comprend ou est constituée d'un carboxyalkyl chitosane réticulé sur lui-même et sans autre polymère dans la matrice d'hydrogel.

- [0112] Une variante dans laquelle la matrice d'hydrogel comprend ou est constituée d'un carboxyalkyl chitosane réticulé sur lui-même et d'un ou plusieurs autres polymères, réticulés ou non sur eux-mêmes, dans la matrice d'hydrogel.
- [0113] Une variante dans laquelle la matrice d'hydrogel comprend ou est constituée d'un carboxyalkyl chitosane co-réticulé avec d'un ou plusieurs autres polymères, et dans laquelle le carboxyalkyl chitosane et/ou le ou les autres polymères sont éventuellement réticulés sur-eux-mêmes.
- [0114] Ainsi, selon une variante, ledit carboxyalkyl chitosane est co-réticulé avec un autre polymère.
- [0115] Selon une variante, les polymères biorésorbables selon l'invention sont des biopolymères d'origine naturelle, et par exemple existant naturellement dans un tissu humain ou animal, par exemple il s'agit de polysaccharides, protéines, et tout autre polymère présent au niveau tissulaire, cellulaire. Selon un mode de réalisation le biopolymère autre que le carboxyalkyl chitosane est choisi parmi des polysaccharides ou des protéines, et de préférence choisis parmi les biopolymères suivants ou l'une quelconque de leurs combinaisons : élastine, hyaluronane, chondroïtine, fibrine, collagène, dextrane, cellulose, carboxyalkyl cellulose, lubricine, mucine, soie, albumine, et l'un quelconque de leurs dérivés.
- [0116] Un biopolymère peut être natif ou présenter une structure native modifiée.
- [0117] Selon une variante, l'autre biopolymère est choisi parmi un polysaccharide, oxydé ou non, réticulé par des liaisons covalentes ou non, par exemple un glycosaminoglycane, et en particulier un hyaluronane, comme par exemple l'acide hyaluronique, le hyaluronate de sodium ou l'un quelconque de leurs sels ou dérivés.
- [0118] Selon une variante, les polymères biorésorbables sont des polymères de synthèse.
- [0119] Selon une variante, la matrice selon l'invention constituant les billes d'hydrogel comprend ou est constituée d'un carboxyalkyl chitosane et d'un hyaluronane, le carboxyalkyl chitosane étant réticulé sur lui-même et/ou co-réticulé avec le hyaluronane. Ces deux polymères sont avantageusement réticulés sur eux-mêmes et/ou co-réticulés entre eux.
- [0120] C'est un des objets préférés de l'invention que d'associer ces deux polymères pour pouvoir adapter les propriétés recherchées des billes, par exemple pour moduler la teneur en eau des billes, leurs propriétés biomécaniques et/ou la cinétique de biorésorbabilité.
- [0121] Selon une variante, le hyaluronane utilisé pour la préparation des billes présente une masse moléculaire moyenne inférieure à 5 000 000 telle que déterminée par viscosimétrie capillaire ou chromatographie d'exclusion stérique. On exprime parfois la masse moléculaire du hyaluronane via sa viscosité intrinsèque mesurée par viscosimétrie capillaire, bien corrélée à la masse moléculaire via la relation de Mark Houwink. Ainsi,

le hyaluronane utilisé pour la préparation des billes peut présenter une viscosité intrinsèque dite « élevée » selon une variante (de environ 3 à 4,25 m³/kg), « moyenne » (de 1,5 à 3 m³/kg) selon une autre variante, ou encore « faible » (de 0,1 à 1,5 m³/kg) selon une autre variante, selon les propriétés recherchées pour les billes.

- [0122] Selon une variante, le hyaluronane est obtenu par fermentation, par exemple avec *Streptococcus equii*. Selon une autre variante, il est produit par extraction au départ de crêtes de coq.
- [0123] Selon une variante, la matrice comprend au moins un hyaluronane réticulé par liaisons covalentes.
- [0124] Ainsi, le hyaluronane réticulé comprend des liaisons covalentes entre différentes chaînes de hyaluronane.
- [0125] Différents types de hyaluronane peuvent être réticulés entre eux, comme des hyaluronane avec différentes masses moléculaires ou différents sels de hyaluronane.
- [0126] L'invention concerne ainsi un hydrogel sous forme de billes comprenant ou constituées d'une matrice comprenant au moins un hyaluronane co-réticulé par liaisons covalentes avec le carboxyalkyl chitosane.
- [0127] De préférence, les billes selon l'invention présentent un contenu en eau supérieur à 80%, de préférence supérieur ou égal à 85%, par exemple supérieur ou égal à 90%, en masse par rapport à la masse totale de la bille.
- [0128] Avantageusement, les billes selon l'invention ne sont pas toxiques chez l'être humain ou animal ; c'est-à-dire sans composant toxique ou se dégradant en composant toxique, tel que vérifié selon les normes en vigueur pour le produit et l'indication qui sont visés, selon qu'il soit un dispositif médical, un médicament ou un produit vétérinaire, par exemple à l'aide un modèle de cytotoxicité in vitro et/ou d'un modèle animal, par exemple pour vérifier l'absence de toxicité chronique après administration orale ou systémique.
- [0129] Avantageusement, les billes sont biocompatibles et ne présentent pas de problème de tolérance locale, ni d'immunoréactivité non acceptable pour l'indication visée, pour le tissu dans ou sur lequel elles sont administrées.
- [0130] Selon une variante avantageuse, les billes selon l'invention ne comprennent pas de composant d'origine animale.
- [0131] Selon une variante avantageuse, les billes selon l'invention ne comprennent pas d'alginate, de gélatine, de carraghénane, ou de chitosane natif, c'est-à-dire qui n'est pas un dérivé de chitosane.
- [0132] Selon une variante avantageuse, les billes selon l'invention comprennent au moins un carboxyalkyl chitosane et éventuellement un hyaluronane. La dénomination hyaluronane inclut l'acide hyaluronique et ses sels.
- [0133] Avantageusement, les billes selon l'invention sont biorésorbables, de préférence avec

une durée de résidence longue ou adaptable à l'indication visée. On entend par « biorésorbable », un polymère qui est dégradé/absorbé progressivement par des phénomènes biologiques/physiologiques naturels, et typiquement sur plusieurs jours, de préférence sur plusieurs semaines ou mois (durée maximum en fonction de l'indication visée), en composants de faible masse moléculaire, éliminables par des processus naturels lorsqu'il est injecté par voie sous-cutanée ou intradermique, dans le corps d'un animal à sang chaud, ou d'un être humain.

[0134] Avantageusement, les billes selon l'invention sont stérilisables, de préférence par stérilisation à la chaleur humide. Avantageusement, les billes selon l'invention conservent essentiellement leurs caractéristiques et propriétés après stérilisation, notamment à la chaleur humide ou par filtration. Les billes sont de préférence stérilisées une fois en suspension dans une phase finale.

[0135] Avantageusement, les billes selon l'invention sont injectables au travers d'une aiguille adaptée à l'indication, c'est-à-dire que la force appliquée pour les injecter doit être acceptable, que l'acte d'injection ne doit pas entraîner d'à-coups, et qu'il ne doit pas causer d'altération des billes éjectées. La force d'injection permet de garantir un acte médical simple, précis et bien maîtrisé. L'injection doit se passer de manière régulière, sans à-coup ; on préfère ainsi une injection « facile » des billes ou compositions selon l'invention. Par injection « facile », on entend de préférence que la force à exercer sur une seringue, est inférieure à 50 Newton, de préférence inférieure à 40 Newton, pour faire écouler une composition selon l'invention au travers d'une aiguille définie pour l'application visée et avec une vitesse d'éjection du piston appropriée (par exemple à une vitesse de 10mm/min). Par exemple, pour des applications en dermatologie, on préfère des billes injectables au travers d'une aiguille dans une gamme de diamètre allant de 25G à 34G. Par exemple, pour des applications en ophtalmologie, on préfère des billes facilement injectables au travers d'une aiguille dans une gamme de 27G à 34G. Par exemple, pour des applications en rhumatologie, on préfère des billes facilement injectables au travers d'une aiguille dans une gamme de 18G à 25G.

[0136] Avantageusement, les billes selon l'invention présentent les caractéristiques recherchées après injection, implantation ou instillation via le dispositif d'administration employé.

[0137] Selon une variante, les billes d'hydrogel selon l'invention présentent un diamètre moyen en volume de 20 μm à 450 μm sous leur forme hydratée. Le diamètre moyen des billes est mesuré selon une méthode d'analyse granulométrique, par exemple par diffractométrie laser (diamètre moyen en volume), ou encore par analyse d'images enregistrées par une technique de microscopie (diamètre moyen en nombre), par exemple optique, électronique à balayage, à force atomique ou encore confocal à balayage. On

peut également mesurer le diamètre des billes sous leur forme déshydratée par ces techniques.

- [0138] Selon une variante, les billes selon l'invention présentent un diamètre moyen en volume de 25 μm à 250 μm sous leur forme hydratée, notamment pour minimiser la réponse à corps étranger et éviter que les billes migrent dans les tissus.
- [0139] Selon une variante, les billes selon l'invention présentent un diamètre moyen en volume comprise entre 1 μm et 20 μm sous leur forme hydratée.
- [0140] Selon une variante, les billes selon l'invention présentent un diamètre moyen en volume inférieur à 1000 nm, et de préférence inférieur à 500 nm. On parle de nanobilles, nanoparticules d'hydrogel ou de nanogel.
- [0141] Typiquement, la distribution de taille des billes est fonction de l'application visée.
- [0142] Les billes sont sphériques pour minimiser les réactions à corps étranger après injection ou implantation et de manière adaptée à l'indication visée.
- [0143] Avantageusement, les billes selon l'invention présentent une morphologie de surface peu rugueuse, et de préférence lisse, sous leur forme hydratée.
- [0144] Avantageusement, une surface lisse ou peu rugueuse minimise la réaction à corps étranger.
- [0145] Avantageusement, les billes selon l'invention présentent une charge de surface négative ou neutre, notamment par mesure du potentiel zeta. Avantageusement, une charge de surface négative ou neutre minimise la réaction à corps étranger.
- [0146] On préfère pour de nombreuses applications des billes d'un hydrogel homogène, c'est-à-dire non fragmenté et sans composant solide au cœur ou en surface des billes.
- [0147] Avantageusement, les billes sont transparentes.
- [0148] On préfère également pour de nombreuses applications des billes d'un hydrogel qui restent sensiblement intègres et homogènes lorsqu'on les incorpore dans leur phase (milieu) finale, par exemple une phase aqueuse, et leur conditionnement final, par exemple une seringue, ainsi que pendant toute leur durée de stockage. On parle de billes « intègres » et « homogènes ».

Propriétés mécaniques

- [0149] Avantageusement, les billes selon l'invention sont flexibles sous leur forme hydratée, c'est-à-dire que leur forme peut être modifiée quand elles sont soumises à une certaine force de déformation (par exemple compression ou cisaillement), sans se casser et sont capables de reprendre leur forme initiale une fois que la bille est libérée de la force de déformation.
- [0150] Avantageusement, les billes selon l'invention présentent une bonne résistance aux contraintes mécaniques imposées par le site d'implantation.
- [0151] Avantageusement, ainsi les billes selon l'invention présentent une bonne capacité à augmenter, combler et/ou remodeler un tissu dans lequel elles sont injectées ou im-

plantées.

Propriétés physiologiques

[0152] Avantageusement, les billes selon l'invention conviennent pour un usage chez l'être humain ou animal, notamment en termes d'innocuité, d'immunocompatibilité, de biorésorbabilité, de propriétés biomécaniques et de durée de vie ou d'activité. Or les compositions de l'état de la technique ne présentent pas toutes de manière satisfaisante de telles propriétés et ne seraient donc pas conformes à la présente invention.

Procédé de préparation

[0153] La présente invention concerne également un procédé de préparation des billes selon l'invention.

[0154] La présente invention concerne en particulier un procédé de préparation d'une pluralité de billes telles que définies selon l'invention, ledit procédé comprenant :

[0155] la préparation d'une solution aqueuse d'un carboxyalkyl chitosane, en présence ou non d'au moins un autre polymère, avec au moins un agent de réticulation, de préférence réalisée à pH alcalin;

[0156] la formation de gouttelettes de cette solution sous forme d'une pluralité de billes;

[0157] la réticulation par l'agent de réticulation du carboxyalkyl chitosane, et éventuellement d'au moins l'autre polymère si présent ; et

[0158] l'obtention d'une pluralité de billes telles que définies selon l'invention.

[0159] En particulier, le procédé selon l'invention comprend la formation de gouttelettes à base du/des polymères biorésorbables puis leur stabilisation par réticulation covalente du/des polymères.

[0160] Typiquement, un procédé selon l'invention comprend la dissolution d'un carboxyalkyl chitosane et éventuellement d'autres polymères et la formation de gouttelettes de cette solution, puis la réticulation covalente sous forme de billes d'hydrogel, éventuellement leur classification pour sélectionner les dimensions de billes souhaitées.

[0161] Selon une variante préférée, les billes sont incorporées dans une phase aqueuse, éventuellement comprenant un ou plusieurs autres polymères.

Dissolution

[0162] Selon un mode de réalisation préféré, un carboxyalkyl chitosane, et éventuellement un ou plusieurs autres polymères, sont dissous dans une solution aqueuse contenant l'agent de réticulation, de préférence à pH alcalin. Avantageusement, la solution aqueuse comprend également un ou plusieurs agents de réticulation.

[0163] L'agent alcalin typiquement de la soude, par exemple à une concentration massique comprise entre 0,1 et 5%.

[0164] Selon un mode de réalisation, on peut à cette étape de dissolution mélanger le car-

boxyalkyl chitosane à d'autres polymères hydrosolubles, par exemple un biopolymère, par exemple un polysaccharide, par exemple le hyaluronane.

Formation des gouttelettes

- [0165] Selon un mode de réalisation, les gouttelettes sont mises en présence d'une phase aqueuse comprenant éventuellement un solvant organique, par exemple un alcool, par exemple l'éthanol.
- [0166] Selon un mode de réalisation, le procédé comprend la coagulation des gouttelettes, en présence d'au moins un agent de coagulation, sous forme d'une pluralité de billes avant leur réticulation.
- [0167] Avantagusement, le procédé comprend la formation de gouttelettes de carboxyalkyl chitosane et éventuellement un ou plusieurs autres polymères si présents, suivi éventuellement de la coagulation des gouttelettes, par exemple par gélation ionique (liaisons non covalentes).
- [0168] On peut utiliser des procédés classiques de formation des gouttelettes de la solution du ou des polymères. On peut former les gouttelettes de polymères par émulsification en milieu hydrolipidique, huile dans eau ou eau dans huile.
- [0169] On peut former des gouttelettes en passant la solution au travers de n'importe quel tube de diamètre adapté au diamètre de billes recherché, à un débit adéquat.
- [0170] On peut également procéder à l'aide d'un atomiseur (dit aussi nébulisateur) de diamètre donné, par exemple à l'aide d'une buse binaire, en contrôlant le débit et/ou la pression. A titre d'illustration, pour obtenir des billes de diamètre majoritairement inférieur à 400µm (D0.9), on utilise une buse binaire de diamètre 2,8mm (Büchi). Pour changer le diamètre des gouttelettes, on adapte le système de formation des gouttelettes, par exemple le diamètre interne de la buse. Selon une variante, on adapte le système de formation des gouttelettes ou ses paramètres en fonction de la viscosité de la solution de polymère. Il existe également d'autres procédés, par exemple électromagnétique à jet laminaire (par exemple avec l'équipement en continu VAR-D commercialisé par Nisco), ou électrostatique, à flux d'air coaxial, à flux d'air dynamique, par ultra-sons ou encore par extrusion en continu en coupant le jet de solution à l'aide d'un outil rotatif (par exemple le Jetcutter, Genialab).
- [0171] Selon un mode de réalisation, on effectue une coagulation des gouttelettes dans une solution dénommée « bain de coagulation » comprenant un agent de coagulation. Selon une variante, l'agent est un chlorure de métal alcalino-terreux, typiquement le chlorure de calcium, qui induit une gélation par interactions ioniques avec le carboxyalkyl chitosane.
- [0172] Selon un mode de réalisation, le bain de coagulation est une solution aqueuse en présence d'un solvant de type alcool, par exemple l'éthanol.
- [0173] De préférence, le bain de coagulation est constitué d'un ratio volumique eau/solvant

de 90/10 à 10/90, typiquement de 30/70, 20/80 ou 80/20 .

- [0174] De préférence, la concentration de chlorure de calcium dans le bain de coagulation est de 10 à 200 mg/mL.
- [0175] De préférence, la coagulation est réalisée à température ambiante, c'est-à-dire sans chauffage, de préférence à une température de 20 à 25°C.
- [0176] Selon un mode de réalisation, comprend une étape de classification des billes coagulées pour contrôler leur distribution.

Réticulation

- [0177] Selon une variante, la pluralité de billes obtenue après réticulation est soumise à des étapes de purification par lavage et d'équilibrage du pH et de l'osmolalité dans un milieu physiologiquement acceptable.
- [0178] Avantagusement, le procédé comprend la réticulation du/des polymères mis sous forme de gouttelettes, éventuellement coagulées, de préférence via un agent de réticulation présent dans la solution de polymère dès la première étape.
- [0179] Selon une variante, les réticulations sont formées par un agent réticulant formant lesdites liaisons covalentes.
- [0180] Ainsi plusieurs chaînes de chitosane peuvent être réticulées, par exemple par réaction avec un ou plusieurs agents réticulant(s), comme par exemple choisis parmi les agents réticulants utilisés pour la réticulation des biopolymères, notamment des polysaccharides, comme par exemple 1,4 butanediol diglycidyl ether, 1-bromo-3,4-epoxybutane, 1-bromo-4,5-epoxypentane, 1-chloro-2,3-epithio- propane, 1-bromo-2,3-epithiopropane, I-bromo-3,4-epithio- butane, 1-bromo-4,5-epithiopentane, 2,3-dibromopropanol, 2,4-dibromobutanol, 2,5-dibromopentanol, 2,3-dibromopro- panethiol, 2,4-dibromobutanethiol, and 2,5-dibromopentane- thiol epichlorohydrin, 2,3-dibromopropanol, 1-chloro-2,3-epithiopropane, dimethylaminopropylcarbodiimide, acide gallique, gallate d'épigallocatechine, curcumin, acide tannique, génipine, ou encore des composés diisocyanate tel que diisocyanate d'hexaméthylène ou diisocyanate de toluène, ou encore la divinyl sulfone.
- [0181] La génipine est un agent de réticulation d'origine naturelle utilisé pour réticuler des polysaccharides, notamment le carboxyméthyl chitosane (Yang et al. Ophthalmic drug-loaded N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels, Acta Pharmacol Sin 31, 1625, 2010). La génipine colore l'hydrogel d'une couleur bleu foncé à noire, ce qui peut être un avantage dans certaines indications.
- [0182] De préférence, l'agent de réticulation est un agent de type polyépoxyde, par exemple difonctionnel. De préférence, on utilise comme agent réticulant le 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) ou l'éthylène glycol diglycidyl ether (EGDE), car ils sont déjà utilisés pour la préparation de biomatériaux appliqués chez l'homme, notamment des

hydrogels de hyaluronane pour l'administration intradermique, intra-articulaire ou intra-oculaire. Selon une variante, l'agent de réticulation est la divinyl sulfone.

- [0183] Typiquement, la réticulation a lieu au pH approprié, selon l'agent de réticulation et les types de liaisons considérées.
- [0184] Selon une variante, la réticulation est réalisée en phase aqueuse alcaline, par exemple en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH). Avantageusement, la concentration en carboxyalkyl chitosane présent initialement dans la phase aqueuse est dans la gamme de 1 à 30 %, et de préférence de 5 à 20% (m/v) en masse de carboxyalkyl chitosane par rapport au volume de phase aqueuse alcaline.
- [0185] Avantageusement, la quantité d'agent réticulant est de 0,001 mol à 0,1 mol de BDDE par gramme du ou des polymères.
- [0186] De préférence, la quantité d'agent réticulant est de 0,005 à 0,02 moles par gramme de polymères lorsque l'on utilise du BDDE.
- [0187] Typiquement, la réticulation a lieu à une température et une durée à adapter au cas par cas, en fonction de l'agent de réticulation, des polymères et des propriétés biomécaniques visées.
- [0188] En général, la réticulation est suivie de la neutralisation du milieu, par exemple par ajout d'un acide, et par exemple par ajout d'acide acétique ou d'un acide chlorhydrique.

Purification

- [0189] Avantageusement, le procédé comprend une purification des billes réticulées. La purification permet d'une part d'éliminer sensiblement l'excès d'agent de coagulation et d'agent de réticulation n'ayant pas réagi, et d'autre part d'équilibrer l'hydrogel des billes en termes de pH et d'osmolalité avec le milieu sélectionné, par exemple un milieu physiologiquement acceptable, comme par exemple une solution tampon.
- [0190] Selon un mode de réalisation, la purification comprend un ou plusieurs lavages avec une solution comprenant un agent tampon, de préférence un tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS, de l'anglais *phosphate buffered saline*) ou du milieu dans lequel on souhaite inclure les billes selon le produit visé.
- [0191] De préférence, la purification comprend un ou plusieurs lavages avec de l'eau de grade pharmaceutique puis avec une solution physiologique, c'est-à-dire une solution dont le pH et l'osmolalité sont appropriés pour une injection ou une implantation dans un tissu.
- [0192] Avantageusement, la purification se fait par étapes de filtration / lavage successives sur une membrane filtrante ou par dialyse mettant en œuvre la solution sélectionnée et une membrane de dialyse de cut-off approprié.
- [0193] Selon un mode de réalisation, les billes d'hydrogel sont d'abord neutralisées par ajout d'acide chlorhydrique ; puis collectées sur une membrane filtrante sous vide.

Cette opération peut être répétée plusieurs fois. Les billes peuvent ensuite être suspendues dans une solution tampon (de composition, osmolalité et pH choisis selon l'indication), et collectées par filtration selon une technique classique. Cette étape est renouvelée jusqu'à obtenir une suspension de billes d'hydrogel à l'osmolalité et au pH du tampon désiré, et un contenu en résidus dans les billes inférieur aux limites spécifiées au préalable pour le produit visé, en lien avec la quantité administrée et son indication. Ainsi, on vérifie que la teneur en agent de coagulation et la teneur résiduelle en agent de réticulation dans les billes sont inférieures aux limites spécifiées. La teneur en agent de coagulation est déterminée selon la méthode des cendres totales de la Pharmacopée Européenne dans le cas du chlorure de calcium. La teneur en agent de réticulation est déterminée par LC-MS dans le cas du BDDE, selon une méthode telle que décrite par Fidalgo et al. (Detection of a new reaction by-product in BDE cross-linked autoclaved hyaluronic acid hydrogels by LC-MS analysis, *Medical Devices: Evidence Res* 11, 367, 2018).

Tri/classification

- [0194] Selon une variante, la pluralité de billes est classifiée pour sélectionner des billes en fonction de leurs dimensions.
- [0195] De manière optionnelle, les billes de petite taille sont éliminées, en laissant décanter les billes de taille plus élevée. Ensuite, on peut par exemple trier les billes d'hydrogel selon leur taille selon des méthodes de tri classique (par « sieving » en anglais), en les plaçant sur un tamis de porosité adéquate agité par ultra-sons, par filtration sous vide avec des filtres de porosité décroissante, ou par toute autre méthode de tri.

Conservation

- [0196] Selon un mode de réalisation, les billes d'hydrogel obtenues sont conservées en les incorporant dans une solution aqueuse, par exemple une solution tamponnée comme le tampon phosphate salin ou toute autre solution aqueuse, jusqu'à leur formulation, stérilisation et conditionnement finaux.
- [0197] Selon un mode de réalisation, les billes d'hydrogel obtenues sont déshydratées, par exemple par lyophilisation ou séchage dans une étuve sous vide, et conservées à sec.
- [0198] Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de préparation des billes selon l'invention comprend :
- la solubilisation d'un mélange de carboxyalkyl chitosane, d'un autre polymère, et de préférence un hyaluronane, et d'au moins un agent de réticulation, en phase alcaline ;
 - la formation de gouttelettes du carboxyalkyl chitosane et de l'autre polymère, et de préférence un hyaluronane, puis éventuellement leur coagulation dans un bain de coagulation comprenant un agent de coagulation, par exemple via

gélation ionique ;

- la réaction de réticulation des gouttelettes ;
- l'obtention de billes d'une matrice co-réticulée de carboxyalkyl chitosane et de l'autre polymère, et de préférence un hyaluronane.

[0199] Ainsi, par exemple un procédé selon la présente invention comprend :

- la préparation d'une solution de carboxyalkyl chitosane (et éventuellement d'un autre polymère, et de préférence un hyaluronane) et de 1,4 butanediol diglycidyl ether (BDDE) dans une solution basique contenant NaOH ; puis
- la solution est dispersée en gouttelettes dans un bain de coagulation comprenant un agent de coagulation, typiquement du chlorure de calcium dans un mélange eau/éthanol, à température ambiante, ce qui entraîne leur coagulation sous forme de billes sphériques ; puis
- la réticulation du carboxyalkyl chitosane (et éventuellement de l'autre polymère) par le BDDE pour fournir des billes d'hydrogel de carboxyalkyl chitosane réticulé ;
- la neutralisation et le lavage des billes d'hydrogel de carboxyalkyl chitosane réticulé, afin d'éliminer l'excès d'agent de coagulation et de BDDE et équilibrer l'hydrogel des billes aux pH et osmolalité souhaités ;
- de manière optionnelle, un tri des billes d'hydrogel selon leur taille.

[0200] On obtient ainsi des billes sous forme d'hydrogel comprenant une matrice selon l'invention.

[0201] Selon une variante, une matrice selon l'invention est stérile.

[0202] Il est avantageux de fournir un hydrogel sous forme de billes à partir d'une matrice selon l'invention selon ce procédé.

Composition

[0203] Avantagement, la composition de l'invention peut comprendre également un autre polymère que le carboxyalkyl chitosane réticulé, notamment dans la phase associée aux billes. Ainsi, si la composition comprend une phase aqueuse, selon une variante, la phase aqueuse et/ou les billes comprennent un ou plusieurs polymères.

[0204] Selon une variante avantageuse, le polymère (de la phase associée et/ou des billes) est un biopolymère, par exemple un polysaccharide, oxydé ou non, réticulé par des liaisons covalentes ou non, par exemple un glycosaminoglycane, et en particulier un hyaluronane comme par exemple le hyaluronate de sodium ou un de ses dérivés. Selon une variante, la phase associée aux billes d'hydrogel comprend aussi un carboxyalkyl chitosane réticulé ou non.

[0205] L'avantage de combiner ou réticuler un carboxyalkyl chitosane avec certains autres polymères est d'ajouter leurs propriétés, voire de créer des synergies.

[0206] Selon une variante, la pluralité de billes est associée à une phase aqueuse, une phase

lipophile, une phase hydrolipidique, ou une phase solide, éventuellement comprenant un ou plusieurs polymères, par exemple un carboxyalkyl chitosane, un hyaluronane, ou l'une quelconque de leurs combinaisons.

- [0207] Selon une variante avantageuse, la phase aqueuse composition et/ou les billes se présentent sous la forme d'un hydrogel à pH et osmolalité en équilibre avec un milieu physiologique.
- [0208] Selon une variante, la phase à laquelle sont associées les billes est propre à l'injection dans un corps humain ou animal.
- [0209] Selon une variante avantageuse, la phase aqueuse et/ou les billes se présentent sous une forme propre à l'injection dans un corps humain ou animal.
- [0210] L'invention concerne également une composition administrable chez l'être humain ou animal, ladite composition comprenant une pluralité de billes telles que définies selon l'invention.
- [0211] Selon une variante préférée, les billes d'hydrogel selon l'invention sont formulées sous forme de dispersion ou suspension dans un milieu aqueux injectable (éventuellement légèrement visqueux) chez l'être humain ou animal. On parle généralement ici de composition selon l'invention.
- [0212] Selon une variante, la composition est formulée comme suspension injectable, apte à l'instillation ou implantable chez l'être humain ou animal.
- [0213] Selon une variante avantageuse, notamment pour des produits destinés à l'injection cutanée, les billes triées ou non sont incorporées dans une solution d'un ou plusieurs biopolymères hydrophiles, de préférence un hyaluronane.
- [0214] Selon une variante la formulation de billes est conditionnée dans un dispositif adapté à l'administration, par exemple une seringue, puis on stérilise de manière appropriée, par exemple par autoclave, en appliquant un cycle destiné à assurer la stérilité. Selon une variante, l'invention concerne ainsi des seringues stériles contenant des formulations de billes d'hydrogel à base de carboxyalkyl chitosane réticulé, prêtes à l'administration par injection.
- [0215] Le ratio massique [carboxyalkyl chitosane/hyaluronane] est par exemple de 5/95 à 95/5, par exemple de 10/90 à 90/10, par exemple de 20/80 à 80/20 et encore par exemple de 30/70 à 70/30. Selon une variante, le ratio massique [carboxyalkyl chitosane/hyaluronane] est de 1/1 (soit 50% de chitosane et 50% de hyaluronane).
- [0216] Le milieu aqueux peut être de l'eau, une solution aqueuse, dont le pH et l'osmolalité sont par exemple ajustés à l'aide d'une solution tampon avec ajout de sels et/ou éventuellement de polyols, par exemple sorbitol, mannitol, glycérol et/ou tréhalose.
- [0217] Selon un mode de réalisation, la composition de la matrice présente une osmolalité de 100 à 700 mosm/kg, de préférence de 120 à 500 mosm/kg.
- [0218] Selon un mode de réalisation, la composition de la matrice présente une osmolalité

de 100 à 500 mosm/kg, de préférence de 120 à 270 mosm/kg.

- [0219] Avantageusement, l'osmolalité de la composition de la matrice est comprise entre 250 et 400 mosm/kg, et de préférence 280 à 350 mOsm/kg.
- [0220] Selon une variante, la composition de la matrice présente une osmolalité appropriée à une articulation.
- [0221] Selon une variante, la composition de la matrice présente une osmolalité compatible avec une surface oculaire ou intraoculaire.
- [0222] Selon une variante, la composition de la matrice présente une osmolalité compatible avec le derme et l'hypoderme.
- [0223] Selon une variante, il est préférable que l'osmolalité de la composition de la matrice soit comprise entre 100 et 400, et plus spécifiquement entre 120 et 350 mosm/kg.
- [0224] Selon une variante, une composition selon l'invention est stérile.
- [0225] Avantageusement, la composition selon l'invention est contenue dans un dispositif d'injection, d'implantation, ou d'instillation comme par exemple une seringue ou un flacon. Avantageusement, le dispositif d'injection, comme par exemple une seringue, peut ensuite subir une stérilisation à la vapeur. Ce dispositif, par exemple une seringue, peut ensuite être emballé, de préférence de manière aseptique ou stérile. Ce peut être également une poche, une flapule, ou un flacon permettant l'instillation de la composition selon l'invention, rempli de façon aseptique après stérilisation de la formulation, ou directement stérilisé après remplissage.
- [0226] Selon une variante, une composition selon l'invention, et en particulier comprenant des billes d'hydrogel selon l'invention, est stérilisée par filtration et/ou par stérilisation à la vapeur, avant remplissage d'un dispositif d'injection, d'implantation ou d'instillation, comme par exemple une seringue ou un flacon.
- [0227] L'homme du métier connaît des techniques de stérilisation d'un hydrogel pour obtenir un hydrogel stérile désiré. Il a à sa disposition plusieurs types d'équipements pour stériliser à la chaleur ou à la vapeur, et peut utiliser plusieurs types de cycle qui élimine la charge microbienne.
- [0228] La présente invention concerne plus particulièrement une composition injectable comprenant des billes d'hydrogel selon l'invention.
- [0229] L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique comprenant au moins des billes d'hydrogel selon l'invention.
- [0230] Selon une variante, la composition selon l'invention est utilisée comme composition pharmaceutique injectable, implantable ou apte à l'instillation, ou dispositif médical injectable ou implantable ou apte à l'instillation.
- [0231] L'invention couvre encore une composition selon l'invention sous une forme sèche, notamment sous une forme lyophilisée. On peut notamment (re)dispenser le produit lyophilisé avant usage.

- [0232] La présente invention concerne plus particulièrement une composition selon l'invention pour une utilisation pour un traitement thérapeutique, par exemple comprenant l'injection par voie sous-cutanée, intradermique, intraoculaire, ou intra-articulaire, intra-mucosale, intra-péritonéal, intra-musculaire de ladite composition, par exemple pour la réparation, la régénération ou le comblement d'au moins un tissu/liquide corporel nécessitant une réparation ou un comblement.
- [0233] Il est avantageux d'utiliser un chitosane présentant un degré de pureté suffisant pour l'application envisagée.
- [0234] Il est avantageux d'utiliser un hyaluronane présentant un degré de pureté suffisant pour l'application envisagée.
- [0235] Les propriétés biomécaniques recherchées par la composition selon l'invention peuvent varier en nature et en amplitude selon l'indication, par exemple selon le tissu dans lequel l'hydrogel doit être intégré, le mécanisme d'action ou l'effet destinés à assurer le bénéfice pour le patient, et la durée de l'effet.
- [0236] Avantageusement, les propriétés de la composition selon l'invention et en particulier des billes d'hydrogel selon l'invention sont adaptées à l'indication. Pour adapter ces propriétés, on joue par exemple sur la concentration finale en polymères (carboxyalkyl chitosane et/ou autres polymères comme un hyaluronane), et/ou le taux de réticulation, notamment via le ratio massique agent réticulant/polymères, et/ou la nature et/ou la quantité des ions, et/ou la masse moléculaire initiale du ou des polymères et/ou le process de préparation des gouttelettes de polymères.
- [0237] Notamment, l'invention concerne des billes d'hydrogel selon l'invention qui sont élastiques, notamment quand il faut assurer une augmentation de volume durable au niveau cutané, hypodermique (sous-cutané) ou périostal. L'invention concerne en particulier des billes mises en suspension dans une phase continue. Cette phase peut elle aussi présenter une viscoélasticité variable, ou d'autres propriétés avantageuses pour le produit visé, par exemple un effet lubrifiant. Notamment pour un produit à usage intra-articulaire, cela permet à la fois l'absorption des chocs et un effet lubrifiant du cartilage. Une composition de l'invention peut présenter un niveau d'élasticité variable, ajusté selon l'indication, et pouvant être caractérisé par la mesure du module d'élasticité par rhéométrie.
- [0238] La présente invention concerne aussi des compositions comprenant une phase comprenant une pluralité de billes hydrogel selon l'invention. On peut dire que les billes sont incorporées dans cette phase.
- [0239] Selon une variante, la phase comprenant les billes est une phase aqueuse.
- [0240] Selon une variante, la phase comprenant les billes est une phase lipophile.
- [0241] Selon une variante, la phase comprenant les billes est une phase hydrolipidique, et en particulier une émulsion, comme par exemple directe, inverse, simple, multiple, etc...

- [0242] Selon une variante, la phase comprenant les billes est une phase solide.
- [0243] Selon une variante spécifique, la phase comprenant les billes est une phase aqueuse continue.
- [0244] La présente invention concerne une composition injectable caractérisée en ce qu'elle comprend des billes hydrogel selon l'invention et une phase dans laquelle les billes sont incorporées.
- [0245] La présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant des billes hydrogel selon l'invention.
- [0246] Selon une variante, la composition est formulée comme composition pharmaceutique ou composition pour la mise en œuvre dans une méthode de traitement thérapeutique.
- [0247] Selon une variante, la composition est utilisée comme composition pharmaceutique injectable, implantable ou apte à l'instillation, ou à l'administration topique, ou à l'administration topique, par exemple pour une utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique, par exemple comprenant l'instillation ou l'administration topique ou l'injection par voie sous-cutanée, intradermique, mucoale, oculaire, intraoculaire, ou intra-articulaire, de ladite composition, par exemple pour la réparation ou le comblement d'au moins un tissu corporel nécessitant une réparation ou un comblement.
- [0248] Selon une variante, la composition selon l'invention est utilisée dans une méthode pour le traitement, la réparation ou le comblement d'au moins un liquide ou tissu corporel nécessitant une réparation ou un comblement, et par exemple dont le tissu corporel est choisi parmi les tissus appartenant aux cordes vocales, muscles, ligaments, tendons, muqueuses, organes sexuels, os, articulations, yeux, derme, ou l'une quelconque de leurs combinaisons, et plus particulièrement le derme, le cartilage, la membrane synoviale, une plaie cutanée ou encore la surface oculaire.
- [0249] La présente invention concerne une composition selon l'invention pour son utilisation dans une méthode de traitement d'une arthrose, ou la réparation d'un défaut de cartilage, par exemple par injection dans un fluide biologique, par exemple le fluide synovial, ou après mélange avec un fluide biologique, par exemple le sang, et implantation dans le cartilage. Par fluide biologique on entend un fluide d'origine corporelle ayant ou non subi un traitement modifiant sa composition.
- [0250] La présente invention concerne un dispositif médical, par exemple implant médical, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en une composition telle que définie selon l'invention.
- [0251] La présente invention concerne notamment une composition selon l'invention pour une utilisation pour un traitement en thérapeutique, en chirurgie, ou cosmétique, incluant en particulier un traitement en rhumatologie, en ophtalmologie, en gy-

nécologie, en médecine esthétique, en chirurgie plastique, en chirurgie interne, chirurgie orthopédique, gynécologique, pour la prévention des adhérences tissulaires post-chirurgicales, en dermatologie.

[0252] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation ophtalmique, par exemple pour un traitement thérapeutique d'un syndrome de l'œil sec, d'une lésion de cornée, ou pour l'administration intraoculaire dans tout autre tissu oculaire.

[0253] La présente invention concerne en outre l'application d'une composition selon l'invention par instillation sur la surface oculaire pour prévenir ou lutter contre une lésion de cornée, ou syndrome de l'œil sec, en particulier dans le but de lubrifier ou régénérer la surface oculaire.

[0254] Ainsi, l'invention concerne également une composition de gouttes ophtalmiques comprenant un carboxyalkyl chitosane défini selon la présente invention.

[0255] Selon une variante, le sujet est affecté par une pathologie inflammatoire des articulations (e.g. ostéoarthrose, arthrite, etc).

[0256] La présente invention concerne plus particulièrement une composition selon l'invention pour le traitement d'une arthrose, d'une arthrite, ou la réparation d'un défaut de cartilage, par exemple par injection dans la cavité synoviale ou par implantation au niveau du défaut de cartilage.

[0257] La présente invention concerne plus particulièrement un dispositif médical, par exemple implant médical, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en une composition selon l'invention.

[0258] Selon une variante préférée, l'invention concerne donc un dispositif médical comprenant une chambre contenant une composition selon l'invention sous une forme sèche, notamment sous une forme lyophilisée, et éventuellement une ou plusieurs autres chambres contenant un ou plusieurs produits actifs, additifs ou excipients.

[0259] La composition selon la présente invention peut également comprendre un ou plusieurs agents actifs pour une indication désirée, et/ou un ou plusieurs additifs ou excipients permettant de moduler les propriétés de la composition selon l'invention.

[0260] Selon une variante, les billes selon l'invention comprennent un ou plusieurs agents actifs pour une indication désirée, et/ou un ou plusieurs additifs ou excipients permettant de moduler les propriétés de la composition selon l'invention. Il peut par exemple s'agir de principes actifs pharmaceutiques ou de nutriments pour la zone d'administration et en particulier pour la zone d'injection, d'instillation ou d'implantation.

[0261] La présente invention concerne également, une composition selon l'invention formulée comme composition pharmaceutique ou composition pour la mise en œuvre dans une méthode de traitement thérapeutique.

- [0262] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique ou d'un dispositif médical.
- [0263] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour son utilisation dans une méthode de traitement d'une arthrose, ou la réparation d'un défaut de cartilage, par exemple par injection dans la poche synoviale ou après mélange avec le sang et implantation dans le cartilage/l'os.
- [0264] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation dans une méthode de traitement ou de soin esthétique par comblement du tissu cutané. Il s'agit notamment par exemple d'injecter une composition selon l'invention en sous-cutané, en intradermique, en intra-mucosal, en intramusculaire.
- [0265] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation dans une méthode de traitement de la peau par injection multiple par voie intradermique, ou d'autres tissus. De telles compositions peuvent être typiquement utilisées en dermatologie, comme traitements à visée esthétique.
- [0266] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation dans une méthode de traitement dans laquelle la composition est un agent de viscosupplémentation. Il s'agit ici par exemple d'injecter au niveau intra-articulaire la composition de l'invention notamment pour limiter les frottements des surfaces de cartilage de l'articulation.
- [0267] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation comme vecteur cellulaire, d'un ou plusieurs types cellulaires, et/ou un ou plusieurs d'agents actifs. Il peut s'agir d'agents actifs d'un point de vue pharmaceutique ou biologique. La composition de l'invention peut en effet être compatible avec la présence de cellules, de préférence de cellules vivantes. Parmi les cellules vivantes d'intérêt, on peut citer par exemple : chondrocytes (cartilage articulaire), fibrochondrocytes (ménisque), fibroblastes de ligament (ligament), fibroblastes de peau (peau), ténocytes (tendons), myofibroblastes (muscle), les cellules souches mésenchymales, les globules rouges (sang) et kératinocytes (peau). La composition de l'invention peut également être visée comme vecteur thérapeutique pour la délivrance ciblée et/ou à libération contrôlée d'au moins un agent thérapeutique.
- [0268] Selon une variante, on ajoute du sang, ou du plasma, ou un lysat plaquettaire, ou du plasma riche en plaquettes, ou tout fluide biologique avec la composition de l'invention permettant par exemple d'augmenter les performances du produit.
- [0269] Selon une variante, la composition selon l'invention est formulée sous une forme solide, par exemple un film, un tube ou une mousse poreuse, qui peut libérer les billes une fois administrée.
- [0270] Selon une variante, la composition est formulée sous une forme d'une composition nébulisable (spray).

- [0271] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation dans une méthode de traitement ou de soin esthétique d'un ou plusieurs tissus ou organes affectés par une température excessive, comme dans le cas d'une brûlure.
- [0272] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation dans une méthode de traitement de réparation du cartilage (par exemple par implantation sur un défaut de cartilage en vue de promouvoir sa régénération).
- [0273] L'invention concerne une composition physiologiquement acceptable, administrée de manière topique, par injection, instillation ou par implantation, destinée à entrer en contact avec un ou plusieurs tissus vivants soumis à un stress oxydant, par exemple :
- [0274] -injection intra-articulaire pour le traitement de l'ostéoarthrose (via supplémentation du liquide synovial, lubrification du cartilage, absorption des chocs au niveau articulaire, régénération de la membrane synoviale) ; implantation intra-articulaire pour favoriser la réparation de défauts du cartilage ;
- [0275] -implantation intra-osseuse pour favoriser la réparation osseuse (ostéoinduction/ostéoconduction) ;
- [0276] -injection hypodermique, sous-cutanée et/ou périostal pour le comblement ou la régénération de la peau ou des follicules pileux, pour l'augmentation des volumes en cas de lipoatrophie, ou pour l'administration de substances actives ;
- [0277] -instillation oculaire pour soulager les symptômes de la surface oculaire ou prévenir les altérations, par exemple pour le traitement de l'œil sec et des lésions de cornée, et l'administration de principes actifs ;
- [0278] -injection intra-oculaire par exemple pour l'optimisation de l'efficacité de la chirurgie du glaucome ou de la vitré-supplémentation, comme adjuvant à des chirurgies ophtalmiques, pour la régénération des tissus oculaires antérieurs ou postérieurs, et/ou pour l'administration intraoculaire de principes actifs ;
- [0279] -administration sur des tissus et organes internes pour prévenir les adhérences post-chirurgicales ;
- [0280] -administration sur des plaies, crevasses, déchirures, cavités... de tissus et d'organes comme la peau, les os, le cartilage, la cornée, les tendons, le ménisque... en vue de favoriser leur réparation ou régénération ;
- [0281] -injection au niveau de la muqueuse vulvaire pour le traitement de vulvodynies.
- [0282] -pour la culture de cellules, comme support ou échaffaudage (« scaffold » en anglais) pour les cellules, notamment en bioréacteur, par exemple pour l'ingénierie ou la reconstruction tissulaire ou pour la production de substances d'intérêt par les cellules.
- [0283] La présente invention concerne également une composition selon l'invention formant un viscosupplément intra-articulaire.
- [0284] En général, les gammes de valeurs d'osmolalité et de pH de la composition sont

adaptées, et en général proches des valeurs d'osmolalité et de pH des tissus en contact avec la composition selon l'invention.

- [0285] Avantageusement, la composition selon la présente invention est stérile. Très avantageusement, la composition selon la présente invention est stérilisée à la chaleur humide.
- [0286] Selon une variante, les compositions de l'invention sont transparentes ou translucides.
- [0287] L'invention concerne en particulier des articles ou packaging, de préférence stériles, comprenant un ou plusieurs dispositifs d'instillation ou d'injection pré-remplis d'une composition selon l'invention, en particulier sous forme d'hydrogel). Il s'agit typiquement de dispositifs permettant d'instiller le produit sous forme de gouttes ou de seringues pré-remplies.
- [0288] Avantageusement, une composition de l'invention peut être stockée, de préférence dans un article ou packaging approprié à son indication, et de préférence pendant plusieurs mois.
- [0289] La composition et les billes selon l'invention peuvent avantageusement être stérilisées. Ainsi, l'invention concerne un carboxyalkyl chitosane réticulé stérilisé. Le carboxyalkyl chitosane réticulé est donc ainsi stérile, notamment pour des applications le nécessitant.
- [0290] Selon une variante, les billes ou la composition de l'invention sont stérilisées à la vapeur, selon une méthode connue de l'homme du métier et/ou recommandée par la pharmacopée européenne.
- [0291] Selon une autre variante, la composition peut être stérilisée par filtration à l'aide de filtres prévus à cet effet, par exemple des filtres de porosité inférieure ou égale à 0,2µm.
- [0292] La présente invention couvre également une méthode de traitement thérapeutique comprenant l'injection d'une composition selon l'invention.
- [0293] La présente invention couvre également l'utilisation d'une composition selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique, en particulier pour un traitement thérapeutique, par exemple comme défini plus spécifiquement par l'invention.
- [0294] La présente invention couvre également une méthode de soin esthétique, en d'autres termes non-thérapeutique, comprenant l'injection d'une composition selon l'invention. Il s'agit par exemple du traitement de lipoatrophie, ou du comblement d'une ou plusieurs zones de tissu visible endommagées, par exemple suite à un accident ou une intervention chirurgicale, dans un but esthétique.
- [0295] Un tissu est un ensemble de cellules semblables et de même origine, regroupées en ensemble fonctionnel, c'est-à-dire concourant à une même fonction. Parmi les tissus on

peut citer : le tissu dermique (par exemple le tissu épithélial), le tissu conjonctif, le tissu musculaire, le tissu adipeux, et le tissu nerveux.

[0296] On entend par « composition selon l'invention » ou des termes équivalents, une composition définie telle que dans la présente invention, y compris selon l'une quelconque des variantes, modes de réalisation particuliers ou spécifiques, indépendamment ou selon l'une quelconque de leurs combinaisons, y compris selon les caractéristiques préférées.

[0297] D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à l'homme de l'art suite à la lecture de la description explicative qui fait référence à des exemples qui sont donnés seulement à titre d'illustration et qui ne sauraient en aucune façon limiter la portée de l'invention.

[0298] Les exemples font partie intégrante de la présente invention et toute caractéristique apparaissant nouvelle par rapport à un état de la technique antérieure quelconque à partir de la description prise dans son ensemble, incluant les exemples, fait partie intégrante de l'invention dans sa fonction et dans sa généralité.

[0299] Ainsi, chaque exemple a une portée générale.

[0300] D'autre part, dans les exemples, tous les pourcentages sont donnés en masse, sauf indication contraire, et la température est exprimée en degré Celsius sauf indication contraire, et la pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire.

Exemple :

[0301] **Force d'éjection via une aiguille fine, et intégrité des billes après éjection**

[0302] Les mesures sont réalisées à l'aide d'un banc de compression (Inston 5566, Mecmesin) équipé d'une cellule de charge (Instron 500N, Mecmesin) et d'un porte-échantillon adapté aux seringues. Une seringue en verre BD de 1 mL contenant la formulation à tester est mise à température ambiante. Une aiguille de 27G (longueur ½ ", TSK) est connectée à la seringue et la seringue est placée dans le porte-échantillon. La cellule de compression est descendue à une vitesse de 10 mm/min pendant une durée de 1 minute et le mélange gel/phase homogène est collecté sur un verre de montre. La force d'éjection est déterminée comme étant la valeur moyenne du plateau de la courbe force-déplacement à vitesse constante. On vérifie ensuite l'intégrité des billes après éjection par microscopie optique (forme, surface).

[0303] **Microscopie optique (taille, sphéricité et inspection visuelle)**

[0304] Des images des billes sont enregistrées à l'aide du microscope Olympus CKX-41 équipé d'une caméra Olympus SC-50 et un logiciel de capture d'image Olympus Stream image, puis traitées à l'aide du logiciel CellSens Dimension Desktop. Pour cela, une ou deux gouttes d'une suspension des billes sont placées sur une lame de verre en borosilicate, et recouvertes avec un couvercle d'objet. La lame est tout de suite placée sur le plateau du microscope.

- [0305] Afin de déterminer les dimensions et la sphéricité des billes, une magnification de 4x est choisie pour visualiser au minimum 20 billes par image. Dix images sont enregistrées, puis analysées avec le logiciel CellSens pour déterminer les dimensions des billes (largeur, longueur, diamètre).
- [0306] La sphéricité d'une bille est égale au quotient carré de sa largeur sur sa longueur. La valeur finale rapporté est la moyenne des mesures pour chaque échantillon après analyse de 10 images (minimum de 200 billes au total). Une bille parfaitement sphérique a une sphéricité égale à 1.
- [0307] Afin de réaliser une inspection visuelle visant à vérifier l'absence d'espèces insolubles indésirables au cœur ou en surface des billes, on place une à deux gouttes de suspension de billes sur deux lames, et on observe les billes aux magnifications de 4x, 10x et 40x.

Contenu en eau

- [0308] Une quantité d'environ 500mg de billes hydratées est placé sur un papier pour éliminer l'excès d'eau non liée. Les billes sont posées sur le plateau d'une balance d'humidité Moisture Analyzer MA37 (Sartorius) et séchée, selon la méthode de la Pharmacopée Européenne 2.2.32. Le contenu en eau est calculé par différence de la masse humide et de la masse sèche.

Contenu en cendres

- [0309] Le contenu en cendres reflète la capacité à éliminer l'excès de substances minérales durant les étapes de lavage, principalement le chlorure de calcium durant l'étape de coagulation. La mesure est réalisée par calcination à 600°C, selon la méthode Pharmacopée Européenne 2.4.16 (Cendres totales), sur les billes préalablement déshydratées dans une étude sous vide et dont on a préalablement mesuré le contenu en eau. Le contenu en cendres est rapporté à la masse de billes sèche.

Contenu en BDDE et sous-produit du BDDE résiduels

- [0310] L'agent de réticulation BDDE qui n'a pas réagi est susceptible de se retrouver sous sa forme native ou bien sous forme d'un sous-produit. La concentration de BDDE ou de son sous-produit résiduel sont déterminées par LC-MS selon une méthode adaptée de celle de Fidalgo et al. (Detection of a new reaction by-production BDDE cross-linked autoclaved hyaluronic acid hydrogels by LC-MS analysis, Medical Devices: Evidence Res 11, 367, 2018). Pour un produit à base de billes d'hydrogel de CC destiné à l'injection cutanée, on impose une limite maximale de 2ppm de BDDE et de son sous-produit (teneur cumulée) (De Boulle et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers, Dermatol Surg 39, 1758, 2013).
- [0311] **Détermination de la taille (diamètre) des billes par diffractométrie laser**

[0312] Les mesures de diffractométrie laser sont effectuées à l'aide d'un Mastersizer 2000 (Malvern) équipé d'une « hydro-unité » (Hydro 2000SM). Un volume de la suspension de billes à tester est introduit dans l'hydro-unité contenant de l'eau de grade pharmaceutique à l'aide d'une pipette, jusqu'à obtenir un niveau d'obscurcissement entre 3% et 10%, un titrage d'obscurcissement étant effectué auparavant afin de déterminer le niveau d'obscurcissement optimal. L'hydro-unité est agitée à une vitesse garantissant une dispersion homogène de l'échantillon et l'absence de bulles dans le système. Les paramètres optiques (indice de réfraction) utilisés sont 1,52 pour l'échantillon (suspension de billes) et 1,33 pour l'eau. Chaque mesure est réalisée en triplicate. La distribution de taille des billes (en diamètre) est calculée et fournie par l'équipement (moyenne des 3 mesures). L'équipement calcule la distribution de taille des billes et on paramètre le logiciel pour obtenir les données suivantes : diamètre moyen en volume, diamètre à 10% (D0,1), 50% (D0,5) et 90% (D0,9) de la distribution en volume.

[0313] **Propriétés biomécaniques (module d'élasticité) par rhéométrie**

[0314] Le profil biomécanique des suspensions de billes dans leur phase continue est caractérisé à l'aide d'un rhéomètre DHR-2 Hydrid Rheometer (TA Instrument) équipé d'une géométrie plane de 20 mm espacé de 700 μ m avec un Peltier, à une température de 37°C, une fréquence de 0.7 Hz et une amplitude de déformation allant de 0,1 à 1000%. L'équipement fournit les valeurs du module d'élasticité (G'). Chaque mesure étant réalisée en triplicate, on calcule la valeur moyenne du G' des 3 mesures.

[0315] **Rugosité de la surface des billes par microscopie confocale à balayage laser**

[0316] Un support a été spécialement conçu pour pouvoir immobiliser la suspension de billes pendant l'analyse par microscopie confocale à balayage laser. Il s'agit d'un disque à base d'un biomatériau de type polyacrylate hydraté (tel que décrit dans le brevet WO 2006063994), comportant un puit dans lequel les billes sont déposées. Les billes sont analysées en suspension en tampon phosphate salin. Une à deux gouttes de la suspension des billes sont placées, puis les mesures sont réalisées à l'aide du microscope confocal à balayage laser VK-X (Keyence), à une magnification de 20. Pour qualifier la rugosité relative des billes, les images des billes sont comparées avec une image de la surface d'une lame de polyacrylate 'polie miroir' prise comme contrôle « très lisse » et avec une image de billes lyophilisées prise comme contrôle « très rugueux ».

[0317] **Evaluation qualitative de la résistance des billes à la compression**

[0318] On dispose 3 billes à plat et en triangle, on les recouvre d'une lame en verre, sur laquelle on pose des poids de masse croissante jusqu'à 10g puis 50g. Si les billes résistent à la masse de 10g, on qualifie la résistance mécanique à la compression comme étant « bonne » ; et si elles résistent à 50g, « très bonne ». En dessous de 10g, on considère que la résistance n'est pas acceptable.

[0319] **Méthode de préparation du carboxyalkyl chitosane** (conforme à la demande internationale déposée sous le numéro PCT/EP2020/064159)

[0320] Pour les carboxyméthyl chitosanes (CC) de références CC1, CC2 et CC3 des exemples, la réaction de carboxyméthylation du chitosane est menée selon la méthode suivante. Une masse de 30g de chitosane d'origine *Agaricus bisporus* est dispersée dans 600mL d'isopropanol, 41mL d'eau et 163mL d'hydroxyde de sodium à 50% (m/v). Une masse de 135g d'acide monochloroacétique (MCA) est solubilisée dans l'isopropanol, et la solution est ajoutée à la suspension de chitosane. Après réaction, le polymère est récupéré par précipitation dans l'éthanol, puis purifié par des cycles de solubilisation dans l'eau et précipitation dans l'éthanol. On collecte le CC après séchage.

[0321] Pour les CC de références CC1 et CC2, on ajoute une étape selon la méthode suivante. Une masse de 21g de CC de l'étape 1 est dispersée dans 570mL d'eau, et le pH de la solution est ajusté à pH d'environ 8. Un volume de 10mL d'anhydride acétique est ajouté, et la solution est agitée à température ambiante. Le pH de la solution est ajusté puis un volume de 10mL d'anhydride acide est ajouté. Le pH est ajusté à environ 7,0 - 7,5. On collecte le CC après séchage.

[0322] Pour les exemples 1 à 5, on utilise les polymères des Tableaux 1 et 2.

[0323] [Tableaux1]

Tableau 1 – Caractéristiques des carboxyméthyl chitosanes (CC) ^a			
Référence	CC1	CC2	CC3
Masse moléculaire par viscosimétrie capillaire			
Mv du chitosane de départ (k)	230k	222k	225k
Viscosité intrinsèque du CC	1086 mL/g	1029 mL/g	ND
Mv estimée du CC (k) ^b	315k	293k	ND
Structure moléculaire par RMN du carbone 13 en phase solide			
DA (degré d'acétylation) mol%	ND	56%	27% ^c
DS (degré de substitution) mol%	ND	82%	87% ^d

[0324] a) origine : fongique (*Agaricus bisporus*) ; fabricant : KiOmed Pharma ; b) masse moléculaire moyenne du CC estimée à partir de la viscosité intrinsèque, via la formule de Mark-Houwink $\log Mv = (\log \text{visco} - \log K) / \alpha$, avec $K=0,0686$ et $\alpha=0,7638$ (constantes déterminées pour le chitosane natif) ; c) valeur de DA estimée à partir du DA du chitosane de départ (mesurée par titrage potentiométrique) ; d) valeur de DS estimée à partir du DS du carboxyméthyl chitosan obtenu par acétylation de CC3.

[0325] [Tableaux2]

Tableau 2 – Caractéristiques des hyaluronanes (HA) ^a			
Référence	HA1	HA2	HA3
Fournisseur	Contipro	HTL-Javenech	HTL-Javenech
Viscosité intrinsèque ^c	2,49 m ³ /kg	3,07 m ³ /kg	3,00 m ³ /kg
Masse moléculaire moyenne (k)	1840k ^b	3300k ^c	3200k ^c

[0326] a) valeurs données par le fournisseur ; b) selon la méthode de chromatographie d'exclusion stérique avec détection MALLS du fournisseur ; c) selon la méthode par viscosimétrie capillaire du fournisseur.

[0327] **Exemple 1 – Préparation de billes formées par gélation ionique puis réticulation covalente avec le BDDE**

[0328] Dans cet exemple, on cherche à former des billes de CC à l'aide d'un procédé consistant à d'abord coaguler des gouttes du polymère par du chlorure de calcium, par gélation ionique, puis à les stabiliser par réticulation covalente en ajoutant un agent réticulant, le 1,4 butanediol diglycidyl ether (BDDE, Alfa Aesar, CAS [2425-79-8]). On juge de la réussite du procédé en évaluant la capacité des billes à résister aux étapes de lavage en milieu aqueux puis, si elles résistent au lavage, leur capacité à résister à une légère compression manuelle.

[0329] On prépare 3 solutions de CC de référence CC2 (Tableau 1) dans l'eau, à une concentration de 40mg/mL. On ajuste le pH des solutions à 3, 6 ou 13 en ajoutant soit de l'acide chlorhydrique 1N et/ou l'hydroxyde de sodium 1N jusqu'au pH désiré, on les dilue à 30mg/mL en ajoutant de l'eau et on les remplit dans une seringue de 1mL. En parallèle, on prépare une solution de chlorure de calcium de concentration de 30mg/mL dans un mélange éthanol/eau 30/70 (v/v).

[0330] Pour chacune des solutions de CC, on forme des gouttes en éjectant lentement la solution de CC au travers d'une aiguille de 27G (2mL). Les gouttes tombent dans la solution de chlorure de calcium (10mL), ce qui les coagule sous forme de billes gélifiées. On laisse les billes en suspension dans la solution de chlorure de calcium pendant 1 heure, puis on ajoute 80µL de BDDE (ratio BDDE/CC de 1,33µL/mg). On laisse sous agitation pendant 1 heure, puis on collecte les billes sur une membrane filtrante. On lave les billes en les re-suspendant dans l'eau et en les filtrant, pour éliminer l'excès de chlorure de calcium et de BDDE n'ayant pas réagi. On répète cette étape 3 fois de plus, puis on laisse les billes en suspension dans l'eau pendant 1 heure.

[0331] On constate bien la formation de billes gélifiées dans la solution de chlorure de calcium et pendant les étapes de réticulation et de lavage. Cependant, après 15 minutes

dans la dernière solution aqueuse (après 4 étapes de lavage), la totalité des billes se sont solubilisées, quel que soit le pH de la solution de départ. Ceci révèle que la réticulation covalente des chaînes de CC le BDDE n'a pas eu lieu.

[0332] **Exemple 2 - Billes d'hydrogel à base de carboxyméthyl chitosane (CC)**

[0333] L'objectif de cet exemple a été de fournir des billes d'hydrogel de CC réticulé selon l'invention, qui soient sphériques (sphéricité supérieure à 0,70), lisses, résistantes à la compression, de diamètre compris entre environ 20 μ m et 400 μ m et dont la teneur massique en eau est supérieure à 85%. On évalue si on peut laver les billes en milieu aqueux pour les purifier et les équilibrer en termes de pH et osmolalité. On cherche également à trier les billes selon leur diamètre.

[0334] Les billes sont produites selon la méthode générale suivante, avec les conditions et paramètres particuliers rapportés au Tableau 3. Ensuite, les billes peuvent être dispersées dans une phase continue, et le mélange est conditionné et éventuellement stérilisé selon le cahier des charges du produit visé, par exemple comme décrit à l'Exemple 3. Les billes peuvent alternativement être séchées, par exemple par lyophilisation ou toute autre méthode de séchage appropriée, et conditionnées sous forme sèche.

[0335] Dans cet exemple, on prépare une solution de CC1 (Tableau 1) (30mg/mL) dans une solution de NaOH à 1% et on y ajoute le BDDE dans une proportion de 3 μ L (0,0162mmol) par mg de CC. Cette solution est dispersée en gouttelettes à l'aide d'un nébulisateur (mini-Büchi) via une buse binaire de diamètre 2,8mm, à une pression de l'air 0,3 bar. Les gouttelettes tombent dans un bain de coagulation à base de chlorure de calcium (50mg/mL) dans un mélange eau/éthanol 30/70 (v/v), à température ambiante, ce qui entraîne leur coagulation sous forme de billes sphériques. On procède ensuite à l'étape de réticulation du CC par le BDDE, en contrôlant la température et la durée.

[0336] Puis on neutralise la suspension par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1N, on collecte les billes sur une membrane filtrante sous vide, on les suspend de nouveau dans l'acide chlorhydrique puis on les collecte sur la membrane filtrante. On les suspend dans le tampon phosphate salin, on les collecte par filtration, puis on renouvelle cette étape jusqu'à obtenir une suspension de billes de gel à l'osmolalité et au pH du tampon.

[0337] On élimine les billes de petite taille en laissant décanter les billes de taille plus élevée. Enfin, on procède au tri des billes de gel selon leur taille en les plaçant sur un tamis de porosité 400 μ m puis par filtration sous vide avec des filtres de porosité décroissante. On obtient ainsi 3 fractions de billes d'hydrogel de références SB2-A, B et C, que l'on conserve en suspension dans un tampon phosphate salin.

[0338] [Tableaux3]

Tableau 3 – Préparation des billes d’hydrogel de CC de référence SB2- A, B et C		
Etape	Paramètres	
Etape 1	Solution de CC et BDDE : Volume : 1 litre [NaOH] = 1% [CC1] = 30mg/mL [BDDE] = 3 μ L (0,016mmol) par mg polymère	Buse : binaire (diamètre 2,8mm, Buchi) Débit : environ 156 mL/h Pression de l’air : 0,3 bar
	Bain de coagulation : Volume : 5 litres [CaCl ₂] = 50mg/mL Eau/éthanol 30/70 v/v	Température : ambiante Agitation : 30 minutes
Etape 2	Réticulation	Température et durée : 131°C (5 minutes) puis 20°C pendant 48 heures
Etape 3	Neutralisation de la suspension : [HCl] = 1N	Séparation : membrane filtrante Nombre : 2
	Suspension des billes Tampon : phosphate – pH 7,4	Séparation : membrane filtrante Nombre : jusqu’à pH et osmolalité du tampon
	Elimination des billes de faible diamètre par décantation	Elimination du surnageant, collecte du décantat
Etape 4	Fractionnement par taille a) Collecte des billes de diamètre inférieur à 400 μ m* par tamisage	Tamisage par ultra-sons Tamis : inox R60.106.000400 (Retsch) Porosité : 400 μ m Agitation : ultra-sons
	b) Filtration des billes issues de l’étape 4a – collecte de la fraction >200 μ m* (référence SB2-C)	Filtration sous vide Filtre : nylon 200 μ m (148147, Spectrum Labs)
	c) Filtration des billes issues de l’étape 4b <400 μ m – collecte de la fraction 100-200 μ m* (référence SB)	Filtration sous vide Filtre : nylon 100 μ m (148145, Spectrum Labs)

	2-B)	
	d) Filtration des billes issues de l'étape 4c – collecte de la fraction 30-100 μm^* (référence SB2-A)	Filtration sous vide Filtre : nylon 30 μm (148136, Spectrum Labs)
Etape 5	Suspension en tampon phosphate (pH et osmolalité du tampon : 7,4 et 275 mOsm/kg)	Température : 2 – 8°C

[0339] *diamètre théorique correspondant à la porosité annoncée des filtres

[0340] On obtient bien des billes stables au terme des étapes de lavage, triage et mises en suspension. Les 3 fractions de billes sont caractérisées selon les méthodes telles que détaillées dans la description : distribution de taille par diffractométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern) ; contenu en eau à l'aide d'une balance d'humidité (Moisture Analyzer MA37, Sartorius) ; résistance à la compression par une méthode qualitative (avec un poids de masse 50g) ; sphéricité et inspection visuelle par microscopie optique ; rugosité de la surface par microscopie confocale à balayage. Les résultats sont rapportés au Tableau 4.

[0341] [Tableaux4]

Tableau 4 – Caractéristiques des billes d’hydrogel de CC de référence SB2- A, B et C			
Référence	SB2-A	SB2-B	SB2-C
Distribution de taille (diamètre)	Dmoyen=91µm D(0,1)=23µm D(0,5)=87µm D(0,9)=175µm	Dmoyen=197µm D(0,1)=97µm D(0,5)=194µm D(0,9)=310µm	Dmoyen=373µm D(0,1)= 219µm D(0,5)=363µm D(0,9)=561µm
Contenu en eau % masse humide	90%	90%	90%
Inspection visuelle	Hydrogel homogène	Hydrogel homogène	Hydrogel homogène
Contenu en cendres (% masse sèche)	ND	ND	17%
Résistance à la compression	Oui	Oui	Oui
Sphéricité	0,88	0,88	ND*
Rugosité	Lisse	Lisse	Lisse
Insolubles	Absence	Absence	Absence

[0342] *ND : non mesuré

[0343] Cette méthode de préparation de billes permet bien d’obtenir des billes d’hydrogel de CC conformes aux caractéristiques recherchées pour l’invention. De plus, ces billes d’hydrogel résistent à des étapes de lavage en milieu aqueux, ce qui permettra d’éliminer les substances en excès, notamment le chlorure de calcium et le BDDE, et à équilibrer leur milieu en termes de pH et osmolalité, comme vérifié à partir des formulations de ces billes à l’Exemple 3.

[0344] **Exemple 3 – Préparation de formulations stériles à base de billes d’hydrogel de CC**

[0345] Les fractions de billes d’hydrogel de CC de référence SB2-A ou SB2-B de l’Exemple 2 sont collectées puis mélangées avec une solution de hyaluronate de sodium (référence HA2 du Tableau 2) à 2% (m/m) dans un tampon phosphate salin, dans une proportion massique de 70/30, afin d’obtenir deux formulations séparées. On vise un pH final de $7,2 \pm 0,2$ et une osmolalité finale de 315 ± 35 mOsm/kg.

[0346] Les formulations sont agitées doucement pendant environ 12 heures à température ambiante. Ensuite, on les conditionne dans des seringues en verre de 1mL (Hypak,

BD), que l'on ferme avec bouchon (Hypak, BD). On place les seringues dans un autoclave (Systec, DX65). On obtient ainsi des seringues stériles des deux formulations de billes d'hydrogel de CC prêtes à l'administration par injection (références FSB1-A et FSB1-B).

- [0347] On caractérise les formulations finales (pH, osmolalité, teneur en BDDE résiduel, module d'élasticité G' , facilité d'éjection de la composition au travers d'une aiguille fine de 27G (TSK, ½''). On collecte ensuite les billes pour vérifier qu'elles ne sont pas altérées par le procédé (forme, surface, résistance à la compression).
- [0348] Les caractéristiques des billes et des compositions sont données au Tableau 5. Pour information, on rapporte également les caractéristiques de deux produits commerciaux dans l'indication de volumisation cutanée à visée esthétique : Restylane LYFT (Galderma) et Ellansé-M (Sinclair Pharma).

[0349] [Tableaux5]

Tableau 5 – Caractérisation des formulations stériles à base de billes d’hydrogel de CC et de deux produits commerciaux dans l’indication de volumisation cutanée				
Référence	FSB2-A	FSB2-B	Restylane LYFT	Ellansé-M
Billes (diamètre moyen en volume)	SB1-A (90µm)	SB1-B (200µm)	environ 750-1000µm*	environ 25-50µm*
Teneur en BDDE et sous-produit du BDDE par LC-MS	< 2ppm	< 2ppm	NA	NA
pH	7,15	7,25	ND	ND
Osmolalité mOsm/kg	320	316	ND	ND
Inspection visuelle	Homogènes	Homogènes	ND	ND
Forme des billes (microscopie optique)	Sphérique	Sphérique	Non sphériques	Sphériques
Rugosité de surface	Lisse	Lisse	Rugueuse	Lisse
Résistance manuelle des billes	Résistantes	Résistantes	NA	NA
Module d’élasticité G’	6,2 kPa	7,0 kPa	0,7 kPa	1,1 kPa
Force d’éjection moyenne via une aiguille de 27G (N)	9 N	11 N	10 N	14 N
Inspection visuelle des billes après éjection via aiguille de 27G (par microscopie optique)	Intègres	Intègres	NA	Intègres

[0350] ND : non mesuré ; NA : non applicable ; *selon la littérature.

[0351] On conclut de cet exemple que les billes d’hydrogel de CC selon l’invention peuvent

être formulées dans une solution de HA puis conditionnées et stérilisées dans une seringue de 1mL sans être altérées, car elles gardent leur homogénéité, leur forme sphérique, leur surface lisse et leur résistance à la compression.

[0352] Les deux formulations FSB2-A et B sont conformes en termes d'équilibre du pH et de l'osmolalité avec la phase aqueuse utilisée. Elles sont conformes en termes de contenu résiduel en BDDE et sous-produit du BDDE (<2ppm).

[0353] Les formulations sont facilement injectables via une aiguille de 27G, nécessitant une force de 9 à 10N pour leur éjection dans l'air, tout à fait satisfaisante notamment en vue d'une injection hypodermique. Les billes conservent leur intégrité après éjection, comme vérifié par inspection visuelle par microscopie optique. Les formulations seraient donc adaptées à une indication de volumisation cutané à visée esthétique, notamment par injection dans l'hypoderme.

[0354] Le module d'élasticité de ces deux formulations de billes SB2-a et B est significativement plus élevé que celui des produits commerciaux de référence, et ce grâce aux billes elles-mêmes et non pas à la phase dans laquelle est sont suspendues, En effet, il est connu qu'une solution de HA non réticulé sans billes présente une valeur de G' significativement plus faible. Cette élasticité élevée des billes est avantageuse pour des indications de volumisation tissulaire, car elles pourront se déformer lors des mouvements du tissu sans s'écraser ni perdre leur capacité volumisante.

[0355] **Exemple 4 – Billes d'hydrogel de CC et HA de composition variable**

[0356] Dans cet exemple, on cherche à moduler les propriétés des billes d'hydrogel de CC tout en conservant leur résistance à la compression manuelle, leur surface lisse et leur sphéricité. Pour cela, on ajoute du hyaluronane, sous la forme hyaluronate de sodium, (référence HA1 du Tableau 2) à une solution de CC (référence CC2 du Tableau 1) et de BDDE. On utilise deux ratio massiques CC/HA différents (50/50 et 75/25), pour la même concentration totale en polymère de 40mg/mL. On cherche à former des billes de diamètre entre 10µm et 400µm, approximativement. On applique la même méthode générale qu'à l'Exemple 2, avec des paramètres ajustés comme décrit au Tableau 6.

[0357] [Tableaux6]

Tableau 6 – Paramètres pour la préparation de billes d'hydrogel de CC et HA de référence SB4-A et B		
Etape	Paramètres	
Etape 1	Solution de polymères et BDDE : [CC2] + [HA1] = 40mg/mL Réf SB4-A : CC2/HA1 = 50/50 (m/m) Réf SB4-B : CC2/HA1 = 75/25 (m/m) [NaOH] = 1% [BDDE] = 3µL (0,016mmol) par mg de polymères	Buse : binaire (diamètre 1,5mm, Büchi) Pression au niveau de la solution : 1 bar Pression de l'air : 1 bar
	Bain de coagulation : Volume : 4 litres [CaCl2] = 50mg/mL Eau/éthanol 30/70 v/v	Température : ambiante Agitation : 30 minutes
Etape 2	Réticulation	Température : ambiante Durée : 72h
Etape 3	Neutralisation de la suspension : [HCl] = 1N	Séparation : membrane filtrante
	Purification : lavage par tampon phosphate salin (pH 7,4, osmolalité 275mOs/kg) et filtration sous vide jusqu'à pH et osmolalité du tampon	Membrane filtrante de 30µm
Etape 4	Collecte de la fraction >30µm	Membrane filtrante de 30µm
Etape 5	Suspension dans une solution de HA (référence HA3 du Tableau 2) à 2% m/m en tampon phosphate salin, à un ratio bille/solution de 70/30 (m/m). Remplissage dans une seringue de 1mL et stérilisation par autoclave.	

[0358] On obtient bien des billes résistantes à l'issue des étapes de purification, de formulation et de stérilisation. Les caractéristiques des billes ainsi que des formulations stériles finales sont données au Tableau 7.

[0359] [Tableaux7]

Tableau 7 – Caractéristiques des billes d’hydrogel de CC et HA et des formulations des billes		
Billes	SB4-A	SB4-B
Ratio CC/HA (m/m)	50:50	75:25
Distribution de taille * (diamètre)	Dmoyen = 212 µm D(0,1) = 10µm D(0,5) = 198µm D(0,9) = 440µm	ND (l’observation au microscope optique indique une distribution de taille similaire à celle de SB2-A)
Teneur en eau % (m/m)	97%	93%
Teneur en cendres (% masse sèche)	16%	ND
Inspection visuelle	Homogènes	Homogènes
Sphéricité	ND (l’observation au microscope optique confirme que les billes sont bien rondes)	ND (l’observation au microscope optique confirme que les billes sont bien rondes)
Rugosité	Lisse	Lisse
Résistance manuelle	Résistantes (les billes sont plus déformables, de manière réversible et plus collantes que les billes de l’Exemple 2)	Résistantes (les billes sont plus déformables, de manière réversible, et plus collantes que les billes de l’Exemple 2)
Formulations	FSB4-A	FSB4-B
Module d’élasticité G’	0,27 kPa	0,64 kPa
Force d’éjection via une aiguille de 27G	3 N	4 N
Intégrité des billes après éjection	Oui	Oui

[0360] *mesure de taille par microscopie optique (sur 3 images à magnification 4) ;

[0361] ND : non déterminé

- [0362] On a obtenu des billes de CC et HA, dont la teneur en eau est augmentée (93% et 97%) par rapport aux billes de CC seul de l'Exemple 1 (90%). Elles sont plus déformables, plus élastiques et plus collantes que les billes de l'Exemple 1.
- [0363] On conclut que l'on peut moduler les caractéristiques des billes d'hydrogel de CC en modifiant la composition de la solution de polymères, par exemple en ajoutant du HA dans des proportions variables. La même méthode générale a pu être appliquée, avec une adaptation de certains paramètres.
- [0364] **Exemple 5 – Billes d'hydrogel à base de CC de structure moléculaire variable**
- [0365] Dans cet exemple, on cherche à former des billes d'hydrogel à partir d'un CC d'origine *Agaricus bisporus* dont le DA est inférieur à 30% (référence CC3 du Tableau 1), selon la même méthode générale qu'à l'Exemple 2 en ajustant les paramètres (Tableau 8).
- [0366] Par facilité, on forme les gouttelettes par passage de la solution polymère au travers d'une aiguille de 30G à la place du procédé d'atomisation des Exemples 2 à 3. Par conséquent, les billes auront un diamètre plus élevé que celles des Exemples 1 à 3 (de l'ordre du mm). Néanmoins, ce procédé permet de juger de la conformité des billes en termes de sphéricité, surface lisse et bonne résistance à la compression manuelle après les étapes de lavage.

[0367] [Tableaux8]

Tableau 8 – Préparation de billes d'hydrogel de CC de DA inférieur à 30%		
Etape	Paramètres	
Etape 1	Solution de polymère et BDDE : Volume : 2mL [NaOH] = 1% [CC3] = 20mg/mL [BDDE] = 1 μ L (0,0054mmol) par mg de polymère	Formation des gouttelettes : Aiguille 30G (1/2, TSK) Vitesse d'éjection : environ 1mL/min
	Bain de coagulation : Volume : 100mL [CaCl2] = 50mg/mL Eau/éthanol = 80/20 v/v	Température : ambiante Agitation : 30 minutes
Etape 2	Réticulation	Température et durée : température ambiante pendant 30 minutes
Etape 3	Neutralisation de la suspension : [HCl] = 1N Lavage : eau Filtration sous vide Collecte de la fraction >30 μ m	Séparation : membrane filtrante de 30 μ m Nombre : jusqu'à pH et osmolalité du tampon
Etape 4	Suspension des billes dans l'eau	

[0368] On obtient bien des billes ayant résisté aux étapes de lavage et de suspension en solution tampon. Leurs caractéristiques sont données au Tableau 9.

[0369] [Tableaux9]

Tableau 9 – Caractéristiques des billes d’hydrogel de CC de DA inférieur à 30%	
Référence	SB5
DA et DS du CC (mol%)	DA estimé à 27% ; DS estimé à 131%
Inspection visuelle	ND (l’observation à l’œil nu confirme que les billes sont bien homogènes)
Sphéricité	ND (l’observation à l’œil nu confirme que les billes sont bien rondes)
Rugosité	Lisse (observation à l’œil nu)
Résistance à la compression	Résistante

[0370] ND : non déterminé

[0371] On conclut que l’on peut bien former des billes sphériques, lisses et résistantes à la compression manuelle à partir d’un carboxyméthyl chitosane de DA inférieur à 30%, selon la même méthode générale.

[0372] **Exemple 6 - Billes d’hydrogel de CC pour la volumisation des tissus cutanés chez le rat**

[0373] Dans cet exemple, on évalue la tolérance locale et la capacité volumisante de billes d’hydrogel de CC après injection dans l’hypoderme (sous-cutanée) chez le rat, pendant une période de 3 mois. On utilise les deux formulations à base de billes d’hydrogel de CC de l’Exemple 3, prêtes à l’injection : FSB2-A (diamètre moyen en volume 90µm) et FSB2-B (diamètre moyen en volume 200µm).

[0374] Pour comparaison, on étudie simultanément deux produits injectables commerciaux destinés à la volumisation cutanée à visée esthétique : Ellansé-M (Sinclair Pharma), à base de microsphères solides et non hydratées de polycaprolactone dans un gel de carboxyméthyl cellulose ; Restylane® LYFT (Galderma), hydrogel d’acide hyaluronique réticulé et extrudé sous forme de particules non sphériques.

[0375] Le terme générique « particules » est utilisé dans cet exemple pour désigner à la fois les billes d’hydrogel de CC, les microsphères solides de polycaprolactone et les particules d’acide hyaluronique réticulées extrudées.

[0376] **Protocole.** Six rates femelles Wistar reçoivent chacune une injection sous-cutanée de 200µL de chaque produit (au total 4 sites d’injection par animal, 2 sur le flanc gauche et 2 sur le flanc droit), à l’aide d’une aiguille de taille 27G. De manière régulière pendant une période de 3 mois, on évalue les signes éventuels de réaction ou

d'irritation de la peau (érythème, œdème) qui seraient attribuables aux produits testés et on leur attribue un score. A chaque délai, on mesure les dimensions du relief créé au niveau du tissu cutané à chaque site d'implantation, et on en déduit le volume (hauteur x largeur x longueur, en mm³). Pour chaque produit et à chaque délai, on calcule la moyenne du volume des 6 sites d'implantation. Le Tableau 10 rapporte le volume moyen à des délais représentatifs des court, moyen et long termes de l'étude.

[0377] **Evaluation de la tolérance locale.** Les scores d'érythème et d'œdème sont nuls tout au long de la première semaine pour les 4 produits testés. Ils restent nuls tout au long de la période d'observation de 3 mois. On n'observe donc aucun signe clinique de réaction d'irritation cutanée pour aucun des 4 produits testés, et leur tolérance locale est jugée excellente.

[0378] **Evaluation de l'effet volumisant.** L'injection des 2 produits à base de billes d'hydrogel de CC entraîne la présence d'un relief cutané immédiat, dont le volume augmente légèrement durant les premiers jours. Le volume se stabilise à partir du jour 7, se maintenant autour d'un niveau stable pendant la période de suivi d'environ 3 mois (jour 85). Ces produits agissent donc bien comme attendu pour un volumisant cutané. On ne constate pas de différence de volume ni d'évolution entre les 2 produits.

[0379] L'effet volumisant du produit commercial Ellansé-M est caractérisé par un relief de volume élevé pendant les deux premières semaines, qui se stabilise ensuite au même niveau que celui des 2 produits à base de billes d'hydrogel de CC jusqu'à la fin de l'étude.

[0380] Le volume moyen du relief créé par le produit commercial Restylane® LYFT est initialement du même ordre de grandeur que les autres produits durant les 2 premières semaines. Ensuite, il est significativement inférieur à tous les délais en raison de sa diminution progressive à partir du jour 14 et jusqu'à la fin de l'étude (jour 85).

[0381] [Tableaux10]

Tableau 10 – Volume du relief créé par l’injection sous-cutanée des produits à base de particules chez le rat (moyenne de 6 sites par délai et écart-type, en mm³)						
Référence	Jour 2	Jour 7	Jour 14	Jour 29	Jour 57	Jour 85
FSB2-A	1340 ± 374	1657 ± 132	1571 ± 322	1740 ± 468	1559 ± 416	1770 ± 537
FSB2-B	1265 ± 125	1701 ± 138	1717 ± 191	1809 ± 418	1753 ± 346	1679 ± 382
Ellansé-M	1394 ± 218	1794 ± 404	1980 ± 327	1742 ± 345	1573 ± 210	1624 ± 155
Restylane® LYFT	926 ± 212	1437 ± 138	1723 ± 255	1508 ± 255	1205 ± 81	1103 ± 192

[0382] On conclut de cet exemple que les deux produits à base de billes d’hydrogel de CC de diamètre moyen en volume 90µm et 200µm sont facilement injectés en sous-cutané et bien tolérés, n’entraînant pas de réaction d’irritation ou d’inflammation cliniquement visible durant la période de 3 mois de l’étude, comme attendu pour une indication de volumisation cutanée à visée esthétique. Leur injection sous-cutanée permet la création d’un relief du tissu cutané de manière localisée, constante et prolongée, comme recherché.

[0383] A volume injecté équivalent, le relief créé présente un relief de volume stable dans le temps, et de niveau similaire à celui créé par le produit Ellansé-M. Il est plus élevé que celui créé par le produit Restylane® LYFT, qui diminue progressivement dans le temps. Les billes d’hydrogel de CC confirment ainsi leur sécurité et efficacité en tant que produit de volumisation tissulaire, en particulier cutané.

[0384] **Exemple 7 – Evaluation de la réaction locale après injection de billes d’hydrogel de CC chez le rat : analyse histopathologique à 1 et 3 mois**

[0385] Dans cet exemple, on caractérise la réaction locale, y compris inflammatoire et à corps étranger, des deux formulations FSB2-A et B par analyse histopathologique du tissu cutané au niveau des sites d’injection de l’étude de l’Exemple 6, aux délais de 1 mois et 3 mois après injection. On procède de la même manière pour les tissus des sites d’injection des deux produits commerciaux de référence.

[0386] Par observation microscopique des sections de tissu montées sur plaque de verre et colorées à l’hématoxyline, on évalue différents aspects de la réaction locale selon le système d’évaluation semi-quantitatif décrit dans la norme ISO 10993 - Partie 6 (2016). On donne un score de réponse à chaque site pour chaque paramètre, puis on calcule le score moyen sur la totalité des sites. Le Tableau 11 rapporte les résultats

obtenus aux deux délais de 1 et 3 mois.

[0387] [Tableaux11]

Tableau 11 – Evaluation semi-quantitative de la réponse locale après injection sous-cutanée chez le rat (score selon ISO 10993-6 ; N = 6 sites par produit / délai)				
	FSB2-A 30-100µm	FSB2-B 100-200µm	Ellansé-M	Restylane® LYFT
1 mois				
Cellules				
-Polymorphonucléaires	0	0	0	0
-Lymphocytes	0,4 ± 0,5	0	0,7 ± 0,5	0
-Cellules plasmatiques	0	0	0	0
-Macrophages	1 ± 0	1 ± 0	2,8 ± 0,4	1 ± 0
-Cellules géantes	1 ± 0	1 ± 0	1,8 ± 0,4	0
Nécrose	0	0	0,3 ± 0,8	0
Fibrose	1 ± 0	1 ± 0	2,0 ± 0,0	1
Néovascularisation	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1
Encapsulation	0	0	0,3 ± 0,8	1,2 ± 0,4
Invasion de cellules/fibres dans le matériau implanté	Fibres de collagène	Fibres de collagène	Aucune	Aucune
3 mois				
Cellules				
-Polymorphonucléaires	0	0,2 ± 0,4	0	0
-Lymphocytes	0,2 ± 0,4	0	0,7 ± 0,5	0
-Cellules plasmatiques	0	0	0	0
-Macrophages	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	2,2 ± 0,4	1,0 ± 0,0
-Cellules géantes	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,4	0
Nécrose	0	0	0	0
Fibrose	1	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,4	1,0 ± 0,0
Néovascularisation	1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Encapsulation	0	0	0	1,0 ± 0,0
Invasion de cellules/fibres dans le matériau implanté	Fibres de collagène	Fibres de collagène	Aucune	Aucune

- [0388] Scores : 0 = réponse nulle ; 1 = faible ; 2 = modérée ; 3 = marquée
- [0389] A 1 mois, la réaction locale se déroule de manière adéquate pour les produits à base de particules d'hydrogel (billes de CC et Restylane® LYFT), avec des réponses de score « nul à faible » pour tous les paramètres. A 3 mois, la réponse cellulaire n'a pas évolué ou a diminué, et on observe une invasion de tissu au sein des billes d'hydrogel de CC (mais pas des particules de Restylane). Pour le produit Ellansé-M, on note une réaction cellulaire plus importante à 1 mois, avec un score « modéré à marqué » pour les macrophages et des scores plus élevés que les autres produits pour les lymphocytes et les cellules géantes. La présence d'une nécrose est observée pour l'un des sites. La réaction reste importante à 3 mois, signe d'une réponse inflammatoire récurrente caractérisée par la persistance de lymphocytes, macrophages (score « modéré à marqué ») et cellules géantes, à des scores toujours plus importants que pour les autres produits.
- [0390] On conclut de cet exemple que les deux produits à base de billes d'hydrogel de CC selon l'invention entraînent une réaction locale appropriée à 1 et 3 mois après injection sous-cutanée. On n'observe pas ou peu d'encapsulation des billes par les cellules ou par un tissu fibreux, mais au contraire la présence de fibres de collagène dans le matériau, signe d'une bonne biointégration et d'un risque minime de granulome à long terme, comme recherché par l'invention.
- [0391] **Exemple 8 - Incorporation d'acide ascorbique dans des billes d'hydrogel de CC**
- [0392] Dans cet exemple, on incorpore une molécule modèle, l'acide ascorbique, dans les billes d'hydrogel de CC préformées afin de démontrer leur capacité à agir comme réservoir pour des substances, par exemple des principes actifs, nutriments, etc. On utilise les billes de référence SB2-C (diamètre moyen en volume 373µm) de l'Exemple 2, préalablement collectées sous leur forme hydratée. Les billes sont mises en suspension dans une solution d'acide ascorbique de concentration 50mg/ml dans du tampon phosphate salin, puis on applique une légère agitation pendant 12 heures à température ambiante. Les billes sont ensuite séparées de la solution par filtration sous vide sur une membrane, et mises en suspension dans le tampon phosphate salin pendant 7 jours. On caractérise une fraction des billes par FTIR, après les avoir rincées par lavage avec le tampon et déshydratées par lyophilisation.
- [0393] On fait subir le même procédé aux billes SB2-C mises en suspension dans le même tampon mais sans acide ascorbique, et on enregistre leur spectre FTIR. Les spectres FTIR des billes mise en suspension dans la solution d'acide ascorbique présentent deux bandes supplémentaires à 862cm⁻¹ et 530cm⁻¹ par rapport aux spectres des billes mises en suspension dans le tampon seul, ce qui confirme la présence d'acide ascorbique dans les billes de CC.
- [0394] On conclut de cet exemple que les billes d'hydrogel de CC sont capables d'agir

comme réservoir pour l'acide ascorbique, en les incorporant via un procédé de simple diffusion de l'acide ascorbique vers les billes préformées. Le fait que l'acide ascorbique soit toujours présent après 7 jours en tampon phosphate et lavage confirme que l'incorporation se produit bien au cœur des billes, et non pas seulement en surface.

Revendications

- [Revendication 1] Bille injectable chez un être humain ou animal, ladite bille comprenant ou consistant en une matrice d'hydrogel comprenant au moins un carboxyalkyl chitosane présentant des unités glucosamine, des unités N-acétyl- glucosamine et des unités glucosamine substituées par un groupe carboxyalkyl, ledit carboxyalkyl chitosane présentant un degré d'acétylation supérieur à 30% et jusqu'à 80%, exprimé en nombre de mole de groupes N-acétyl par rapport au nombre de mole d'unités glucosamines totales, ledit carboxyalkyl chitosane présente un degré de substitution par un groupe carboxyalkyl supérieur à 50%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales, ledit carboxyalkyl chitosane étant réticulé par liaisons covalentes entre les chaînes de carboxyalkyl chitosane et/ou co-réticulé par liaisons covalentes avec un ou plusieurs autres polymères.
- [Revendication 2] Bille injectable chez un être humain ou animal, ladite bille comprenant ou consistant en une matrice d'hydrogel comprenant au moins un carboxyalkyl chitosane présentant des unités glucosamine, des unités N-acétyl- glucosamine et des unités glucosamine substituées par un groupe carboxyalkyl, ledit carboxyalkyl chitosane présente un degré de substitution par un groupe carboxyalkyl supérieur à 50%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales, ledit carboxyalkyl chitosane étant réticulé par liaisons covalentes entre les chaînes de carboxyalkyl chitosane et/ou co-réticulé par liaisons covalentes avec un ou plusieurs autres polymères, ladite bille restant intègre en suspension aqueuse.
- [Revendication 3] Bille, selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que ledit carboxyalkyl chitosane présente un degré de substitution par un groupe carboxyalkyl inférieur à 200%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales.
- [Revendication 4] Bille, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la matrice comprend au moins un polymère, par exemple au moins un hyaluronane, éventuellement réticulé sur lui-même par liaisons covalentes ou co-réticulé par liaisons covalentes avec le carboxyalkyl chitosane.
- [Revendication 5] Bille, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les réticulations sont formées par un agent réticulant formant lesdites liaisons covalentes.

- [Revendication 6] Bille, selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'agent réticulant est choisi parmi les agents réticulant utilisés pour la réticulation des biopolymères, notamment des polysaccharides, comme par exemple 1,4 butanediol diglycidyl ether, 1-bromo-3,4-epoxybutane, 1-bromo-4,5-epoxypentane, 1-chloro-2,3-epithio- propane, 1-bromo-2,3-epithiopropane, 1-bromo-3,4-epithio- butane, 1-bromo-4,5-epithiopentane, 2,3-dibromopropanol, 2,4-dibromobutanol, 2,5-dibromopentanol, 2,3-dibromopropanethiol, 2,4-dibromobutanethiol, and 2,5-dibromopentane- thiol epichlorohydrin, 2,3-dibromopropanol, 1-chloro-2,3-epithiopropane, dimethylaminopropylcarbodiimide, acide gallique, gallate d'épigallocatechine, curcumin, acide tannique, génipine, ou encore des composés diisocyanate tel que diisocyanate d'hexaméthylène ou diisocyanate de toluène, ou encore la divinyl sulfone.
- [Revendication 7] Composition comprenant une phase aqueuse comprenant une pluralité de billes, lesdites billes étant caractérisées en ce qu'elles sont telles que définies selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
- [Revendication 8] Composition, selon la revendication 7, caractérisé en ce que la phase aqueuse comprend un ou plusieurs polymères.
- [Revendication 9] Composition, selon l'une quelconque des revendications 7 à 8, caractérisé en ce que dans les billes ledit carboxyalkyl chitosane est co-réticulé avec un autre polymère.
- [Revendication 10] Composition, selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que la phase aqueuse et/ou les billes se présentent sous la forme d'un hydrogel à pH et osmolalité en équilibre avec un milieu physiologique.
- [Revendication 11] Composition, selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que la phase aqueuse et/ou les billes se présentent sous une forme propre à l'injection dans un corps humain ou animal.
- [Revendication 12] Composition administrable chez l'être humain ou animal, ladite composition comprenant une pluralité de billes telles que définies selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
- [Revendication 13] Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisée en ce qu'elle est formulée comme suspension injectable, apte à l'instillation ou implantable chez l'être humain ou animal.
- [Revendication 14] Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 12 caractérisée en ce qu'elle est formulée comme composition pharmaceutique ou composition pour la mise en œuvre dans une méthode de

- traitement thérapeutique.
- [Revendication 15] Composition, selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, pour son utilisation comme composition pharmaceutique injectable, implantable ou apte à l'instillation, ou à l'administration topique, ou comme dispositif médical injectable ou implantable ou apte à l'instillation, ou à l'administration topique, par exemple pour une utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique, par exemple comprenant l'instillation ou l'administration topique ou l'injection par voie sous-cutanée, intradermique, mucoale, oculaire, intraoculaire, ou intra-articulaire, de ladite composition, par exemple pour la réparation ou le comblement d'au moins un tissu corporel nécessitant une réparation ou un comblement.
- [Revendication 16] Composition, selon la revendication 15, pour son utilisation dans une méthode pour le traitement, la réparation ou le comblement d'au moins un tissu corporel nécessitant une réparation ou un comblement, et par exemple dont le tissu corporel est choisi parmi les tissus appartenant aux cordes vocales, muscles, ligaments, tendons, muqueuses, organes sexuels, os, articulations, yeux, derme, ou l'une quelconque de leurs combinaisons, et plus particulièrement le derme, le cartilage, la membrane synoviale, une plaie cutanée ou encore la surface oculaire.
- [Revendication 17] Composition selon la revendication 15 ou 16, pour son utilisation dans une méthode de traitement d'une arthrose, ou la réparation d'un défaut de cartilage, par exemple par injection dans un fluide biologique, par exemple le fluide synovial, ou après mélange avec un fluide biologique, par exemple le sang, et implantation dans le cartilage.
- [Revendication 18] Dispositif médical, par exemple implant médical, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en une composition telle que définie à l'une quelconque des revendications 12 à 17.
- [Revendication 19] Procédé de préparation d'une pluralité de billes telles que définies selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, ledit procédé comprenant : la préparation d'une solution aqueuse d'un carboxyalkyl chitosane, en présence ou non d'au moins un autre polymère et en présence d'au moins un agent de réticulation, de préférence réalisée à pH alcalin; la formation de gouttelettes de cette solution sous forme d'une pluralité de billes; la réticulation par l'agent de réticulation du carboxyalkyl chitosane, et éventuellement d'au moins l'autre polymère si présent ; et l'obtention d'une pluralité de billes telles que définies selon l'une

- quelconque des revendications 1 à 18.
- [Revendication 20] Procédé, selon la revendication 19, caractérisé en ce que les gouttelettes sont mises en présence d'une phase aqueuse comprenant éventuellement un solvant organique, par exemple un alcool, par exemple l'éthanol.
- [Revendication 21] Procédé, selon l'une quelconque des revendications 19 à 20, caractérisé en ce que le procédé comprend la coagulation des gouttelettes, en présence d'au moins un agent de coagulation, sous forme d'une pluralité de billes avant leur réticulation.
- [Revendication 22] Procédé, selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisé en ce que la pluralité de billes obtenue après réticulation est soumise à des étapes de purification par lavage et d'équilibrage du pH et de l'osmolalité dans un milieu physiologiquement acceptable.
- [Revendication 23] Procédé, selon l'une quelconque des revendications 19 à 22, caractérisé en ce que la pluralité de billes est classifiée pour sélectionner des billes en fonction de leurs dimensions.
- [Revendication 24] Procédé, selon l'une quelconque des revendications 19 à 23, caractérisé en ce que la pluralité de billes est associée à une phase aqueuse, une phase lipophile, une phase hydrolipidique, ou une phase solide, éventuellement comprenant un ou plusieurs polymères, par exemple un carboxyalkyl chitosane, un hyaluronane, ou l'une quelconque de leurs combinaisons.
- [Revendication 25] Procédé, selon la revendication 24, caractérisé en ce que la phase est propre à l'injection dans un corps humain ou animal.

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

MA LEI ET AL: "Synthesis and characterization of injectable self-healing hydrogels based on oxidized alginate-hybrid-hydroxyapatite nanoparticles and carboxymethyl chitosan", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 165, 7 octobre 2020 (2020-10-07), pages 1164-1174, XP086386448, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.004 [extrait le 2020-10-07]

LUO YANGCHAO ET AL: "Development of carboxymethyl chitosan hydrogel beads in alcohol-aqueous binary solvent for nutrient delivery applications", FOOD HYDROCOLLOIDS, vol. 31, no. 2, 1 juin 2013 (2013-06-01), pages 332-339, XP055850003, NL ISSN: 0268-005X, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.011

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

CHEN S-C ET AL: "A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 96, no. 2, 28 avril 2004 (2004-04-28), pages 285-300, XP004502177, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2004.02.002

MI F-L ET AL: "In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant", BIOMATERIALS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 23, no. 1, 1 janvier 2002 (2002-01-01), pages 181-191, XP004322634, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00094-1

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT

