

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

①1 N° de publication :

3 096 260

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

②1 N° d'enregistrement national :

19 05504

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 31/722** (2022.01), A 61 P 19/02, C 08 B 37/
08, C 08 L 5/08

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 CHITOSANE ET SES APPLICATIONS.

②2 Date de dépôt : 24.05.19.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 27.11.20 Bulletin 20/48.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 27.05.22 Bulletin 22/21.

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*
— BE.

⑦2 Inventeur(s) : *CHAUSSON Mickaël, HERMITTE
Laurence, HAMERS Vincent, GAUTIER Sandrine et
DOUETTE Pierre.*

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

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

FR 3 096 260 - B1



Description

Titre de l'invention : CHITOSANE ET SES APPLICATIONS

[0001] La présente invention concerne un carboxyalkyl chitosane réticulé, formant une matrice, des compositions le comprenant, son procédé de fabrication et ses différentes applications, en particulier dans le domaine thérapeutique, rhumatologique, ophtalmologique, médecine esthétique, chirurgie plastique, chirurgie interne, dermatologique, gynécologique, ou cosmétique.

Etat de la technique

[0002] Il est connu des dérivés de chitosane, notamment dans les demandes de Kiomed Pharma publiées sous les numéros WO 2016/016463 et WO 2016/016464 et les brevets correspondants. Il est également connu de Kiomed Pharma 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.

[0003] Il serait avantageux selon les présents inventeurs de pouvoir ajuster le comportement biomécanique des compositions de carboxyalkyl chitosane, voire augmenter la durée de vie ou de l'effet du traitement par la présence du carboxyalkyl chitosane. Cependant, il n'est pas évident pour l'homme du métier de proposer de telles compositions aux propriétés biomécaniques améliorées, en particulier quand on désire préparer un hydrogel. Parmi les compositions de biopolymères et notamment les hydrogels de l'état de la technique, l'une des problématiques techniques des compositions à base de biopolymères, connue de l'homme du métier, réside dans le fait que certaines compositions ne se présentent pas sous forme d'hydrogel cohésif, c'est-à-dire que l'hydrogel se désagrège spontanément en parties distinctes en présence d'un milieu aqueux, formant ainsi des particules, des fragments. On parle aussi de gel ou d'hydrogel fragmenté.

[0004] Il est reconnu que de tels hydrogels non cohésifs présentent des risques de formation de nodules inflammatoires ou de réaction granulomateuse à long terme lorsque le produit est implanté dans des tissus d'un être humain ou animal, considérés comme indésirables pour de nombreuses applications médicales (Bergerey-Galley, Aesth Surf J 24, 33, 2004). Il est donc important en termes de sécurité sanitaire du sujet ou patient de pouvoir éviter la formation de fragments distincts et d'obtenir des compositions sous la forme d'hydrogels cohésifs.

[0005] De plus, on souhaite éviter dans certains cas de tels agrégats, pour plusieurs raisons, pour améliorer l'aspect esthétique (visuel et/ou au toucher) des tissus faisant l'objet d'un comblement par une telle composition, bien biointégrée dans le ou les tissus

permettant un comblement homogène.

- [0006] Ainsi, on préfère pour de nombreuses applications un hydrogel cohésif, qui reste en un bloc par exemple lorsqu'on lui ajoute un milieu aqueux. On parle aussi d'hydrogel « homogène ». De plus, on préfère, pour la plupart des applications, un hydrogel que l'on qualifie de « lisse » de par son aspect visuel ne présentant pas ou peu de grumeaux.
- [0007] Outre la cohésion, une composition selon l'invention, et en particulier un hydrogel, doit convenir 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.
- [0008] Diverses méthodes de mise en œuvre de carboxylalkyl chitosanes sous forme d'hydrogel sont connues. Notamment, Rufato et al. (Intechopen 81811, 2018), Upadhyaya et al. (J Controlled Release 2014) et Fonseca-Santos et al. (Mater Sci Engineering C 77, 1349, 2017) ont recensé plusieurs hydrogels à base de chitosane, y compris des carboxylalkyl chitosanes, pour des usages médicaux ou pharmaceutiques. Cependant, aucun de ces hydrogels ne correspond à ce qui est recherché par les présents inventeurs, car ils ne répondent pas aux attentes, en particulier simultanément, en termes de cohésion, d'innocuité, d'immunocompatibilité, de propriétés biomécaniques, de biorésorbabilité et/ou de durée de vie ou d'activité. Aucun des carboxylalkyl chitosanes utilisés pour préparer les hydrogels connus selon l'état de la technique ne présente une bonne immunocompatibilité selon les inventeurs, hors les compositions de Kiomed Pharma selon les demandes PCT/EP2018/080763 et PCT/EP2018/080767 précitées. N'importe quel chitosane ne peut pas être utilisé pour former des hydrogels acceptables pour un usage chez l'être humain ou animal.
- [0009] Les hydrogels à base de chitosane connus à ce jour sont préparés par combinaison de chitosane ou l'un des dérivés avec d'autres polymères, par exemple alginate, isopropylacrylamide, polyuréthane, polyacrylonitrile, gélatine, Polyéthylène glycol (PEG), alcool polyvinylique (PVA). Cependant ces polymères sont soit non biorésorbables, soit immunoréactifs, ce qui ne répond pas aux buts de l'invention.
- [0010] Par exemple, Huang et al. (RCS Adv 2016 DOI:10.1039/C5RA26160K) ont préparé un hydrogel de glycol chitosane et de hyaluronane, cependant un tel glycol chitosane n'est pas acceptable chez l'être humain car immunoréactif. Song et al. (Sci Rep 6, 37600, 2016) ont préparé un hydrogel à base de carboxyméthyl chitosane et de hyaluronane oxydé, via une réaction de base de Schiff entre les groupes amine du carboxyméthyl chitosane et les aldéhydes du hyaluronane. Cependant, selon l'expérience des présents inventeurs, le carboxyméthyl chitosane utilisé ne présente par la structure

moléculaire requise pour satisfaire les buts de la présente invention. En particulier, l'hydrogel décrit se résorbe très rapidement, selon les tests *in vitro* et *in vivo* présentés. Un tel hydrogel demande donc à être amélioré notamment quant à sa durée de vie pour pouvoir être utilisé pour un large panel d'indications.

- [0011] En outre, les produits antérieurs sont souvent des produits peu versatiles pour répondre aux besoins de différentes indications, notamment différentes indications thérapeutiques. Il existe donc un besoin de fournir un produit suffisamment versatile en termes de propriétés, notamment biomécaniques, pour l'adapter facilement à différentes applications.
- [0012] Par exemple, en médecine régénérative ou chirurgie, on recherche en général à réparer un tissu ou un fluide altéré et/ou à prévenir des altérations du tissu, à combler un tissu, ou encore séparer des tissus pour éviter les adhérences. L'origine de l'altération du tissu peut être le vieillissement naturel, une agression extérieure (trauma, radiations UV, chirurgie, ...), une pathologie, par exemple inflammatoire, auto-immune, etc. Or, la plupart des altérations tissulaires font intervenir un stress oxydant, appelé parfois stress oxydatif, caractérisé par une teneur en espèces radicalaires libres importante capables d'endommager le tissu ou les cellules. Réduire la quantité d'espèces radicalaires libres permet au tissu de prévenir/retarder son vieillissement et d'en réduire les conséquences néfastes. Il existe plusieurs moyens de réduire la quantité d'espèces radicalaires libres dans un tissu, par exemple par l'administration de substances antioxydantes, par exemple les vitamines C, B, E, et/ou l'ubiquinone. Un autre moyen est d'utiliser une composition capable de capturer les radicaux libres, ce qui réduit leur teneur et leur propagation dans le tissu.
- [0013] Le chitosane et certains de ses dérivés présentent la capacité de capturer les espèces radicalaires libres oxydantes, comme décrit pour de nombreuses formulations destinées à un usage biomédical, telles que listées dans la revue de Ngo et al. (*Adv Food Nutrition Res* 73, 15, 2014). Par exemple, des carboxyméthyl chitosanes de différentes structure et masse moléculaires ont été étudiés pour leur capacité à capturer différents types de radicaux libres à l'aide de méthodes de mesure *in vitro*, comme décrit notamment par Ujang et al. (*The Development, Characterization and Application of Water Soluble Chitosan*; in *Biotechnology of Biopolymers*, InTech, 2011. ISBN: 978-953-307-179-4).
- [0014] Cependant, il est difficile de proposer des compositions permettant d'appliquer les effets bénéfiques du chitosane, notamment sa capacité à capturer les radicaux libres, sous la forme de traitements permettant à la fois de réduire l'impact du stress oxydant sur les tissus et de mieux ajuster le comportement biomécanique du produit, voire augmenter la durée de vie ou de l'effet du traitement par la présence de ce polymère d'origine exogène.

[0015] Ainsi, l'état de la technique ne permet pas de manière évidente à l'homme du métier d'arriver à fournir une composition satisfaisante pour surmonter les problématiques exposées dans la présente invention.

Buts de l'invention

[0016] L'invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir un dérivé de chitosane ou une composition en comprenant, adéquat pour être utilisé chez un être humain ou animal, en particulier dans les domaines thérapeutique, chirurgical et cosmétique.

[0017] L'invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir un dérivé de chitosane ou une composition en comprenant, permettant d'appliquer les effets bénéfiques du chitosane, notamment sa capacité de capture de radicaux libres, sous la forme d'un traitement permettant à la fois de réduire l'impact du stress oxydant sur les tissus et de mieux ajuster le comportement biomécanique et d'augmenter la durée de vie ou de l'effet du traitement par la présence de ce polymère d'origine exogène.

[0018] L'invention a notamment pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir une composition, notamment sous forme d'hydrogel, biorésorbable, adaptée à son utilisation en contact avec un tissu d'un être humain ou animal, acceptable en termes de propriétés biomécaniques, de durée de vie ou d'activité *in situ*, de recherche d'une bonne sécurité sanitaire (en particulier d'absence de réaction immunologique et/ou réaction à corps étranger à court et long-terme) 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.

[0019] L'invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir une composition présentant de bonnes propriétés biomécaniques, et en particulier des propriétés biomécaniques ajustables en fonction de son indication.

[0020] L'invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir un produit à base d'un dérivé de chitosane permettant de préparer une gamme de produits présentant des propriétés biomécaniques variables, adaptés à chaque indication visée.

[0021] L'invention a pour but de résoudre le problème technique consistant à fournir une composition fournissant, de préférence simultanément, la cohésion, l'innocuité (dont l'immunocompatibilité), les propriétés biomécaniques, la biorésorbabilité suffisantes pour une administration chez un être humain ou animal, et de préférence avec une durée de vie ou d'activité appropriée.

[0022] L'invention a pour but de résoudre les problèmes techniques exposés dans la présente invention en fournissant en particulier un dérivé de chitosane ou une composition en

comprenant avec un grade acceptable pour l'être humain ou animal dans l'indication visée.

Description détaillée de l'invention

- [0023] Pour résoudre les problèmes techniques exposés dans l'invention, les inventeurs ont cherché à développer un chitosane présentant à la fois de bonnes propriétés anti-oxydantes et de bonnes propriétés mécaniques pour les applications visées chez l'être humain ou l'animal (on parle de propriétés biomécaniques).
- [0024] Les inventeurs connaissent de par leur expérience propre les avantages d'un chitosane substitué, et notamment d'un carboxyalkyl chitosane. En particulier, Kiomed Pharma a déposé des demandes de brevet sous les numéros PCT/EP2018/080763 et PCT/EP2018/080767. Ils ont cherché à appliquer cet enseignement pour résoudre les problèmes techniques exposés dans l'invention.
- [0025] Il a été constaté par les présents inventeurs qu'un hydrogel de carboxyalkyl chitosane formé par réticulation ionique (c'est-à-dire non covalente) ne conserve pas ses propriétés biomécaniques suffisamment longtemps après implantation pour certaines applications visées ; cette technologie ne permet notamment pas une large modulation de la durée de vie ou d'activité. En outre, les hydrogels de carboxyalkyl chitosane formés par réticulation par catalyse enzymatique présentent un risque d'immunoréactivité de l'enzyme en raison de sa nature protéinique et complexifie la purification finale du produit réticulé obtenu.
- [0026] La demande de brevet CN 107325306 (Imeik Technology Development) décrit la préparation d'hydrogels à base de carboxyméthyl chitosane d'origine crustacé et de glycerol phosphate par réticulation avec le BDDE en plusieurs étapes de réticulation successives (multi-crosslinking). Cependant, cette méthode ne fournit pas un hydrogel selon les critères de l'invention en particulier car l'hydrogel obtenu n'est pas cohésif et forme des agrégats solides puisqu'il forme une poudre pulvérisable, ce que l'invention cherche précisément à éviter pour offrir une plus grande versatilité des indications, notamment lorsque l'on souhaite un hydrogel cohésif (c'est-à-dire restant en un bloc et ne se fragmentant pas par exemple au contact de l'eau) et/ou d'aspect « lisse ». Selon CN 107325306, le carboxyméthyl chitosane utilisé présente un DA faible (degré de dé-acétylation de 60-99%, de préférence de 80-95%, soit un degré d'acétylation (DA) inférieur à 40%). Des hydrogels de carboxyméthyl chitosanes de faible degré d'acétylation sont également décrits par Czechowska-Biskup et al. (DOI: 10.15259.PCACD.21.03). Cependant ces hydrogels ne sont pas cohésifs et ne répondent pas aux buts de la présente invention.
- [0027] Les inventeurs ont découvert qu'une matrice de carboxyalkyl chitosane réticulé selon l'invention ou une composition, et notamment un hydrogel, la comprenant permettait

de résoudre au moins l'un, et de préférence l'ensemble, des problèmes techniques exposés dans l'invention.

- [0028] Ainsi, l'invention concerne une matrice 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 allant de 40% 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.
- [0029] En effet, il a été découvert qu'un carboxyalkyl chitosane réticulé présentant un DA inférieur à 40% ne permettait pas d'obtenir un hydrogel présentant la cohésion souhaitée, en ce sens qu'ils se fragmente sous forme de fragments distincts lors de l'hydratation, ce qui est indésirable pour de nombreuses applications.
- [0030] Selon la présente invention, on entend par un hydrogel cohésif un hydrogel conservant sa cohésion selon le test de cohésion suivant dénommé 'test de l'eau', par adaptation de méthodes classiquement utilisées pour caractériser des hydrogels à usage intradermique, par exemple celle décrite par Micheels et al. (J Clin Aesth Dermatol 10, 29, 2017 et J Drugs Dermatol 15, 1092, 2016) :
- [0031] Une masse de 1g de l'hydrogel à tester est placée au centre d'une boîte de Petri en verre de diamètre 5cm. Un volume de 1mL d'eau distillée est ajouté sur la périphérie de la boîte. La boîte de Petri est légèrement oscillée jusqu'à ce que l'eau recouvre l'hydrogel, puis remise en position horizontale. On observe si l'hydrogel reste intègre immédiatement après contact de la matrice avec l'eau, et de préférence après un contact de 15 à 25 secondes, et de préférence après un contact d'au moins 30 secondes, c'est-à-dire forme un seul morceau quand il est cohésif, ou s'il se sépare spontanément en parties distinctes, ou forme des particules visibles à l'œil nu quand il est non cohésif.
- [0032] De plus, il a été découvert avantagement, que les matrices selon l'invention sont capables de capturer des espèces radicalaires libres. La conservation de cette propriété du chitosane était loin d'être évidente pour l'homme du métier. S'il est connu que la structure moléculaire (DS) et la masse moléculaire du carboxyalkyl chitosane influencent sa capacité de capture des radicaux libres, des résultats contradictoires ont été publiés. Il n'était donc pas évident qu'un carboxyalkyl chitosane réticulé présente une capacité de capture des radicaux libres.
- [0033] En outre, les hydrogels selon l'invention présentent une telle activité antioxydante, tout en ayant une cohésion, un profil biomécanique, une longévité et une innocuité appropriés.
- [0034] De plus, il n'était pas évident qu'un carboxyalkyl chitosane réticulé, formulé comme

un hydrogel, soit cohésif, de préférence lisse, c'est-à-dire sans fragments distincts, visibles ou perceptibles au toucher, et présente une innocuité, en particulier une immunocompatibilité, un profil biomécanique et une durée appropriés. L'invention permet de fournir une telle matrice ou une telle composition, notamment sous forme d'hydrogel. Pour qu'une matrice réticulée soit immunocompatible, c'est-à-dire non immunoréactive et qui n'active sensiblement pas de réaction immune, elle doit à minima être préparée au départ d'un ou de polymères non immunoréactifs. Pour vérifier qu'un polymère est non immunoréactif, on utilise par exemple des tests spécifiques et standardisés, par exemple le test du sang humain total (*in vitro*) et l'injection sous-cutanée dans la poche à air chez la souris.

- [0035] On peut accepter qu'un hydrogel formé par une matrice selon l'invention ne soit pas complètement lisse et qu'il présente par exemple des grumeaux visibles ou perceptibles au toucher, à condition qu'il soit cohésif selon le test de l'eau précité.
- [0036] Une matrice selon la présente invention peut être caractérisée par le carboxyalkyl chitosane de départ, qui est réticulé pour former une matrice selon l'invention.
- [0037] Selon un premier aspect, on utilise un carboxyalkyl chitosane d'origine fongique présentant des unités glucosamine, des unités N-acétyl- glucosamine et des unités glucosamine 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.
- [0038] On parle également de dérivé de chitosane ou de chitosane substitué.
- [0039] 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), qui sont citées ici par référence en particulier pour illustrer la préparation d'un carboxyalkyl chitosane.
- [0040] Le chitosane est par exemple référencé sous le numéro CAS 9012-76-4.
- [0041] 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).

- [0042] 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.
- [0043] De préférence, le chitosane est de grade suffisamment pur pour une utilisation pharmaceutique.
- [0044] 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 carboxyalkyl 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.
- [0045] Le carboxyalkyl chitosane peut être solubilisé dans une solution aqueuse, et par exemple dans une eau de qualité pharmaceutique acceptable pour une injection ou implantation dans un corps, et en particulier un corps humain.
- [0046] Un tel carboxyalkyl chitosane est ensuite réticulé pour préparer une matrice selon l'invention.
- [0047] On peut exprimer les DA et DS du carboxyalkyl chitosane réticulé en fonction des DA et DS du carboxyalkyl chitosane non réticulé car les DA et DS ne varient sensiblement pas lors de la réticulation. Toutefois, si l'agent réticulant apporte des groupes N-acétyl ou carboxyalkyl, ces groupements étrangers au carboxyalkyl chitosane non réticulé de départ ne sont pas pris en compte dans le DA et DS du carboxyalkyl chitosane réticulé. L'homme du métier sait obtenir les valeurs de DA et DS, comme expliqué ci-après. On parle donc indifféremment des DA et DS avant et après réticulation.
- [0048] 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 peut alternativement être mesuré par d'autres 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.
- [0049] Avantageusement, le carboxyalkyl chitosane présente un degré d'acétylation compris entre 40 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).
- [0050] Avantageusement, le carboxyalkyl chitosane présente un degré d'acétylation compris

entre 40 et 80%, exprimé en nombre de groupes N-acétyl par rapport au nombre d'unités totales glucosamines.

[0051] Selon une variante, le degré d'acétylation va de 40 à 50%.

[0052] Selon une variante, le degré d'acétylation va de 50 à 60%.

[0053] Selon une variante, le degré d'acétylation va de 60 à 75%.

[0054] 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 avantageusement 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.

[0055] De préférence, le carboxyalkyl chitosane est réacétylé.

[0056] 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.

[0057] 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.

[0058] 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.

[0059] 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.

[0060] 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.

[0061] Selon une variante, le carboxyalkyl chitosane présente une masse moléculaire moyenne inférieure à 400 000.

[0062] Selon une variante, la masse moléculaire moyenne est comprise entre 20 000 et 60 000.

[0063] Selon une autre variante, la masse moléculaire moyenne est comprise entre 60 000 et 120 000.

[0064] Selon une autre variante, la masse moléculaire moyenne comprise entre 100 000 et 400 000.

[0065] Selon une autre variante, la masse moléculaire moyenne comprise entre 120 000 et 400 000.

[0066] Selon une autre variante, la masse moléculaire moyenne comprise entre 180 000 et 400 000.

[0067] 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 :

- [0068] • 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.

[0069] On peut donc usuellement exprimer la viscosité inhérente du carboxylakyl chitosane :

[0070] Il est possible d'hydrolyser le chitosane afin de diminuer sa masse moléculaire.

[0071] Typiquement, dans le carboxyalkyl 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).

[0072] Selon une variante, un chitosane substitué présente une substitution des unités D-glucosamine uniquement.

[0073] 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 carboxyalkyl 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.

- [0074] La substitution est en général seulement partielle, toutes les unités ne sont pas nécessairement substituées.
- [0075] 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%.
- [0076] Selon un mode de réalisation, ledit carboxyalkyl chitosane présente un degré de substitution par un groupe carboxyalkyl 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.
- [0077] Selon un mode de réalisation, le 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.
- [0078] 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%.
- [0079] Selon un mode de réalisation, le degré de substitution par un groupe carboxyalkyl inférieur à 80%, exprimé en nombre de mole du substituant par rapport au nombre de mole d'unités totales.
- [0080] Typiquement, la substitution se réalise par liaison covalente.
- [0081] Selon une variante, le carboxyalkyl chitosane est un N,O-carboxyalkyl chitosane. La proportion d'unités substituées par un groupe carboxyalkyl en position O (soit O3 soit 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%.
- [0082] Avantagusement, le degré de substitution (DS) et le degré d'acétylation (DA) du carboxyalkyl chitosane sont mesurés par 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.

[0083] Formule 1 :

[0084] [Math.1]

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

[0085] Formule 2 :

[0086] [Math.2]

$$DS = \frac{I_{C=O} - I_{CH3 \text{ acétyle}} / \text{ratio CSU}}{\sum I_{Cx} / 6}$$

[0087] On peut 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 avec une hydrolyse préalable du carboxyalkyl chitosane y ajoutant une solution concentrée d'acide chlorhydrique deutéré avant analyse.

[0088] 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.

[0089] Le degré de carboxyalkylation du chitosane 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.

[0090] Selon une variante, le degré de carboxyalkylation 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.

[0091] Le degré de substitution du chitosane est typiquement corrélé au ratio massique des réactifs par rapport au chitosane au départ de la réaction. Comme agents carboxy-

alkylants, 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.

- [0092] Selon une variante, la présente invention concerne un carboxyalkyle chitosane où la partie alkyl du carboxyalkyl est en C1-C5, linéaire ou ramifiée.
- [0093] Selon une variante, la présente invention concerne un carboxyméthyle chitosane.
- [0094] Selon cette variante, le chitosane substitué est un chitosane N-carboxyalkylé.
- [0095] Selon cette variante, le chitosane substitué est un chitosane O-carboxyalkylé.
- [0096] Selon cette variante, le chitosane substitué est un chitosane N-carboxyalkylé et O-carboxyalkylé.
- [0097] 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.
- [0098] Avantageusement, le potentiel zeta, mesuré à pH 7,5, est inférieur ou égal à -18 mV.
- [0099] 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.
- [0100] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente, de préférence une masse moléculaire moyenne de 150 000 à 220 000 et un degré de substitution allant de 50 à 200%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0101] Selon une autre variante spécifique, le chitosane substitué présente, une masse moléculaire moyenne de 120 000 à 150 000 et un degré de substitution allant de 70 à 200%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0102] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente, de préférence une masse moléculaire moyenne de 220 000 à 300 000 et un degré de substitution allant de 70 à 200%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0103] Selon une autre variante spécifique, le chitosane substitué présente, une masse moléculaire moyenne de 220 000 à 300 000 et un degré de substitution allant de 50 à 200%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0104] Selon une autre variante spécifique, le chitosane substitué présente, une masse moléculaire moyenne de 300 000 à 500 000 et un degré de substitution allant de 50 à 200%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0105] Selon une autre variante spécifique, le chitosane substitué présente, une masse moléculaire moyenne de 300 000 à 500 000 et un degré de substitution allant de 70 à

- 200%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0106] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente, de préférence une masse moléculaire moyenne de 120 000 à 150 000 et un degré de substitution allant de 20 à 50%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0107] Selon une autre variante spécifique, le chitosane substitué présente, une masse moléculaire moyenne de 220 000 à 300 000 et un degré de substitution allant de 20 à 50%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0108] Selon une autre variante spécifique, le chitosane substitué présente, une masse moléculaire moyenne de 300 000 à 500 000 et un degré de substitution allant de 20 à 50%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0109] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente un degré de substitution allant de 20 à 80%, et de préférence de 40 à 60%, et un degré d'acétylation de 40 à 80%, et de préférence de 50 à 75%.
- [0110] 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 40 à 80%, et de préférence de 50 à 75%.
- [0111] 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 40 à 80%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0112] 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 60%, et de préférence de 50 à 60%.
- [0113] 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 50 à 75%.
- [0114] Selon une variante spécifique, le chitosane substitué présente, de préférence une masse moléculaire moyenne de 220 000 à 300 000, un degré de substitution allant de 90 à 200%, et de préférence de 90 à 150%, et un degré d'acétylation de 50 à 75%, la masse moléculaire étant de préférence exprimée avant substitution.
- [0115] 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 5,5 à 6,5. 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 au pH des fluides physiologiques modifiés par une pathologie, par exemple une pathologie inflammatoire.
- [0116] 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.

[0117] Selon une variante, le carboxyalkyl chitosane est stérile.

[0118] 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.

[0119] Selon l'invention, le carboxyalkyl chitosane est réticulé.

[0120] Selon une variante, les réticulations sont formées par un agent réticulant formant lesdites liaisons covalentes.

[0121] 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 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.

[0122] La génipine est un agent de réticulation d'origine naturelle utilisé pour réticuler des polysaccharides, notamment le carboxyméthyl chitosane (Yang et al. Acta Pharmacol Sin 31, 1625, 2020). La génipine colore l'hydrogel d'une couleur bleu foncé à noire, ce qui peut être un avantage dans certaines indications.

[0123] 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.

- [0124] Avantageusement, la composition de l'invention peut comprendre également un autre biopolymère que le carboxyalkyl chitosane réticulé. Selon une variante avantageuse, le biopolymère est 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 ou le hyaluronate de sodium.
- [0125] L'avantage de combiner ou réticuler un carboxyalkyl chitosane réticulé avec certains autres polymères est d'ajouter leurs propriétés biologiques et physico-chimiques, voire de créer des synergies.
- [0126] Selon une variante, la matrice selon l'invention comprend un carboxyalkyl chitosane réticulé et un hyaluronane, un sulfate de chondroïtine et/ou une carboxyméthyl cellulose. A ce jour, il n'existe pas d'hydrogel de carboxyalkyl chitosane réticulé (tel que défini pour l'invention) combiné à un hyaluronane. C'est un des objets de l'invention que d'associer ces deux polymères pour pouvoir combiner, par exemple, les propriétés hydratantes reconnues du hyaluronane aux propriétés de protection contre le stress oxydant du chitosane.
- [0127] Selon une variante, la matrice comprend au moins un hyaluronane.
- [0128] Avantageusement, les matrices selon l'invention comprennent seul le carboxyméthyl chitosane réticulé ou bien un carboxyméthyl chitosane réticulé combiné à un hyaluronane, réticulé ou non. Cela permet d'adapter les propriétés recherchées.
- [0129] Ladite matrice comprend au moins un carboxyméthyl chitosane et un hyaluronane.
- [0130] Selon une variante, le hyaluronane présente une masse moléculaire moyenne inférieure à 5 millions et de préférence supérieure à 1 million, de préférence supérieure à 2 millions, telle que déterminée par viscosimétrie capillaire. On exprime parfois la masse moléculaire du hyaluronane via sa densité, car elles sont corrélées via une relation linéaire. Le hyaluronane peut présenter une densité allant jusqu'à 4,25 m³/kg, et par exemple être désigné comme étant de faible densité (par exemple environ 1 à 2 m³/kg) ou haute densité (par exemple environ 2 à 4 m³/kg).
- [0131] Selon une variante, le hyaluronane est obtenu par fermentation, par exemple avec *Streptococcus*. Selon une autre variante, il est produit par extraction au départ de crêtes de coq.
- [0132] Selon une variante, la matrice comprend au moins un hyaluronane réticulé par liaisons covalentes.
- [0133] Ainsi, le hyaluronane réticulé comprend des liaisons covalentes entre différentes

chaînes de hyaluronane.

- [0134] Différents types de hyaluronane peuvent être réticulés entre eux, comme des hyaluronane avec différentes masses moléculaires ou différents sels de hyaluronane.
- [0135] La présente invention concerne également un procédé de préparation du carboxyalkyl chitosane réticulé.
- [0136] Selon une variante, le procédé de préparation d'une matrice selon l'invention, ledit procédé comprenant :
- [0137] la mise en contact du carboxyalkyl chitosane, avec au moins un agent de réticulation, la mise en contact étant de préférence réalisée en phase aqueuse alcaline ;
- [0138] la réticulation du carboxyalkyl chitosane par l'agent de réticulation ;
- [0139] l'obtention d'une matrice comprenant le carboxyalkyl chitosane réticulé.
- [0140] Selon une variante, le carboxyalkyl chitosane est réticulé dans une phase aqueuse alcaline, par exemple en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH).
- [0141] Avantagement, 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.
- [0142] Avantagement, le ratio massique entre l'agent réticulant et le ou les polymères est de 0,1% à 30%, exprimé en masse de l'agent réticulant par rapport à la masse du ou des polymères.
- [0143] De préférence, le ratio massique entre l'agent réticulant et le ou les polymères est de 0,5% à 20%, en particulier lorsque l'on utilise du BDDE, exprimé en masse de l'agent réticulant par rapport à la masse du ou des polymères.
- [0144] Typiquement, la réaction se réalise avec un chauffage, par exemple à une température de 25 à 60°C, et par exemple de 50°C, par exemple sur une période de 30 minutes à 48 heures, par exemple de 1 heures à 5 heures. En général, la réticulation est arrêtée par neutralisation et dilution, par exemple par ajout d'un acide, et par exemple par ajout d'acide acétique ou d'un acide chlorhydrique.
- [0145] Avantagement, les résidus de réaction sont éliminés par dialyse mettant en œuvre un tampon phosphate salin.
- [0146] On obtient ainsi un hydrogel comprenant une matrice selon l'invention.
- [0147] D'autre part, le carboxyalkyl chitosane est une molécule exogène qui résiste mieux à la dégradation que le hyaluronane après implantation/injection/instillation dans un corps.
- [0148] Ainsi, l'invention concerne une matrice comprenant un réseau tridimensionnel à base de ces deux polymères de masses moléculaires différentes. Ainsi, avantagement, on fournit un éventail de propriétés biomécaniques, de durée du produit *in situ* et de durée du traitement, tout en conservant le pouvoir de capture des radicaux libres du car-

boxyalkyl chitosane.

- [0149] L'invention concerne une matrice comprenant au moins un hyaluronane co-réticulé par liaisons covalentes avec le carboxyalkyl chitosane.
- [0150] Selon une variante, le procédé de préparation d'une matrice comprenant un carboxyalkyl chitosane, de préférence tel que défini selon l'invention, co-réticulé avec un autre biopolymère, et de préférence un hyaluronane, ledit procédé comprenant :
- [0151] la mise en contact d'un mélange de carboxyalkyl chitosane, et de l'autre biopolymère, et de préférence le hyaluronane, avec au moins un agent de réticulation, la mise en contact étant de préférence réalisée en phase alcaline ;
- [0152] la réticulation du carboxyalkyl chitosane et de l'autre biopolymère, et de préférence un hyaluronane, par l'agent de réticulation ;
- [0153] l'obtention d'une matrice co-réticulée de carboxyalkyl chitosane et de l'autre biopolymère, et de préférence un hyaluronane.
- [0154] Selon une variante, une matrice selon l'invention est stérile.
- [0155] Il est avantageux de fournir un hydrogel à partir d'une matrice selon l'invention.
- [0156] Ainsi l'invention concerne un hydrogel, et avantageusement forme un hydrogel cohésif.
- [0157] La présente invention concerne donc des hydrogels de carboxyalkyl chitosane réticulé dans lequel le carboxyalkyl chitosane présente un degré d'acétylation (DA) élevé (supérieur à 40%), et présente de préférence également un degré de substitution (DS) élevé (supérieur à 20%, de préférence supérieur à 50% et typiquement inférieur à 200%).
- [0158] L'invention concerne une composition comprenant au moins une matrice définie selon l'invention.
- [0159] Selon une variante préférée, une matrice selon l'invention est formulée dans un milieu aqueux pour former une composition sous forme d'un hydrogel.
- [0160] Avantageusement, la concentration de polymère (carboxyalkyl chitosane avec ou sans autre biopolymère, comme par exemple un hyaluronane) est inférieure à 10%, par exemple inférieure ou égale à 5%, en masse par rapport à la masse totale de la composition, et en particulier de l'hydrogel (m/m).
- [0161] Selon une variante, la concentration de polymère (carboxyalkyl chitosane avec ou sans autre biopolymère, comme par exemple un hyaluronane) est inférieure à 4%, par exemple inférieure ou égale à 3%, en masse par rapport à la masse totale de la composition, et en particulier de l'hydrogel (m/m).
- [0162] Le ratio massique (m/m) [carboxyalkyl chitosane/hyaluronane] est par exemple de 5 à 95 %, par exemple de 10 à 90%, et encore par exemple de 30 à 70%. Le ratio massique (m/m) [hyaluronane/carboxyalkyl chitosane] est par exemple de 5 à 95 %, par exemple de 10 à 90%, et encore par exemple de 30 à 70%. Selon une variante, le

ratio massique (m/m) [carboxyalkyl chitosane/hyaluronane] est de 1/1 (soit 50% de chitosane et 50% de hyaluronane).

- [0163] 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'un système tampon acide/base avec ajout de sels et/ou éventuellement de polyols (sorbitol, mannitol, glycérol).
- [0164] Selon une variante, la matrice selon l'invention est formulée dans un milieu hydro-lipidique permettant de former une émulsion, simple ou multiple, directe ou inverse.
- [0165] 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.
- [0166] Avantagement, l'osmolalité de la composition de la matrice est comprise entre 250 et 400 mosm/kg, et de préférence de 270 à 330 mosm/kg.
- [0167] Selon une variante, la composition de la matrice présente une osmolalité appropriée à une articulation.
- [0168] Selon une variante, la composition de la matrice présente une osmolalité compatible avec une surface oculaire ou intraoculaire.
- [0169] Selon une variante, la composition de la matrice présente une osmolalité compatible avec une le derme ou les muqueuses.
- [0170] 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 380 mosm/kg.
- [0171] Selon une variante, une composition selon l'invention est stérile.
- [0172] Avantagement, 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. Avantagement, 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.
- [0173] Selon une variante, une composition selon l'invention, et en particulier un 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.
- [0174] 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.
- [0175] La présente invention concerne plus particulièrement une composition injectable comprenant une matrice, de préférence sous forme d'un hydrogel, selon l'invention.

- [0176] L'invention concerne aussi une composition pharmaceutique comprenant au moins une matrice, de préférence sous forme d'un hydrogel, selon l'invention.
- [0177] 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.
- [0178] L'invention couvre encore une composition selon l'invention sous une forme sèche, notamment sous une forme lyophilisée. On peut notamment (re)dispenser, et de préférence solubiliser, le produit lyophilisé avant usage.
- [0179] 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-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.
- [0180] Il est avantageux d'utiliser un chitosane présentant un degré de pureté suffisant pour l'application envisagée.
- [0181] Il est avantageux d'utiliser un hyaluronane présentant un degré de pureté suffisant pour l'application envisagée.
- [0182] 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.
- [0183] Avantageusement, les propriétés de la composition selon l'invention et en particulier d'un 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 biopolymères 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.
- [0184] Notamment, l'invention concerne un hydrogel très élastique, notamment quand il faut assurer une augmentation de volume durable au niveau cutané, sous-cutané ou périostal (pour projection ou remodelage), ou un gel viscoélastique, notamment pour permettre à la fois l'absorption des chocs et un effet lubrifiant au niveau articulaire. L'invention concerne un hydrogel lubrifiant, notamment quand il faut réduire les frictions entre deux surfaces biologiques, par exemple deux surfaces de cartilage dans une articulation, ou la surface oculaire et les paupières dans un œil. 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.
- [0185] De préférence, la matrice présente une capacité antioxydante par capture des

radicaux libres, notamment une capacité antioxydante normalisée supérieure à 0,30, de préférence supérieure à 0,50, et encore de préférence supérieure à 0,80, et par exemple supérieure à 0,90.

- [0186] La présente invention concerne une composition injectable caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une matrice définie selon l'invention.
- [0187] La présente invention concerne une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une matrice définie selon l'invention.
- [0188] Selon une variante, la composition selon l'invention est utilisée comme composition pharmaceutique injectable, implantable ou apte à l'instillation, ou à l'administration topique, ou 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, intra-osseux, de ladite composition, par exemple pour la réparation ou le comblement d'au moins un tissu corporel nécessitant une réparation ou un comblement.
- [0189] 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.
- [0190] 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.
- [0191] 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.
- [0192] 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 gynécologie, en médecine esthétique, en chirurgie plastique, en chirurgie interne, chirurgie orthopédique, gynécologique, pour la prévention des adhérences tissulaires post-chirurgicales, en dermatologie.

- [0193] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation pour un traitement thérapeutique d'un syndrome de l'œil sec, d'une lésion de cornée ou d'une inflammation oculaire ou articulaire.
- [0194] 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.
- [0195] Ainsi, l'invention concerne également une composition de gouttes ophtalmiques comprenant un carboxyalkyl chitosane défini selon la présente invention.
- [0196] Selon une variante, le sujet est affecté par une pathologie inflammatoire (e.g. ostéoarthrose, arthrite, syndrome de l'œil sec).
- [0197] 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.
- [0198] 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.
- [0199] 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.
- [0200] 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.
- [0201] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique.
- [0202] 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.
- [0203] 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 derme (« dermal filling ») ou des lèvres. Il s'agit notamment par exemple d'injecter une composition selon l'invention en sous-cutané, en intradermique, en intra-mucosal, en intramusculaire.
- [0204] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour une utilisation dans une méthode de traitement superficiel de la peau par injection

multiple par voie intradermique, ou d'autres tissus, selon les méthodes de mésothérapie classiques bien connues de l'homme de l'art. De telles compositions peuvent être typiquement utilisées en dermatologie, comme traitements à visée esthétique. Une telle méthode a par exemple pour but de regonfler la peau pour lui faire perdre un aspect fripé (traitement des rides et/ou ridules). Un tel traitement peut être adressé à un sujet souhaitant donner un aspect rajeuni à sa peau.

- [0205] 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.
- [0206] 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.
- [0207] 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.
- [0208] Selon une variante, la composition selon l'invention est formulée sous une forme solide (par exemple un film ou une mousse poreuse), qui gonfle/s'hydrate une fois implantée (ex : bouchon lacrymal, pansement).
- [0209] Selon une variante, la composition est formulée sous une forme d'une composition nébulisable (spray).
- [0210] 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.
- [0211] 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).
- [0212] La présente invention concerne également une composition selon l'invention pour

une utilisation dans une méthode de traitement de prévention des adhérences tissulaires après chirurgie : le produit est appliqué sur les tissus en fin de chirurgie, par exemple gynécologique, abdominale, viscérale, orthopédique, etc.

- [0213] L'invention concerne une composition physiologique, administrée de manière topique, par injection ou par implantation, destinée à entrer en contact avec un ou plusieurs tissus vivants soumis à un stress oxydant, par exemple :
- [0214] -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 ;
- [0215] -implantation intra-osseuse pour favoriser la réparation osseuse (ostéoinduction/ostéoconduction) ;
- [0216] -injection sous-cutanée et/ou intradermique pour le comblement ou la régénération de la peau ou des follicules pileux, pour l'augmentation des volumes en cas de lipotrophie ;
- [0217] -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 ;
- [0218] -injection intra-oculaire par exemple pour l'optimisation de l'efficacité de la chirurgie du glaucome ou de la vitré-supplémentation, comme adjuvant à la chirurgie de la cataracte, pour la régénération des tissus oculaires antérieurs ou postérieurs, et l'administration intraoculaire de principes actifs ;
- [0219] -administration sur des tissus et organes internes (films) pour prévenir les adhérences post-chirurgicales ;
- [0220] -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 ;
- [0221] -injection au niveau de la muqueuse vulvaire pour le traitement de vulvodynies.
- [0222] La présente invention concerne également une composition selon l'invention formant fluide synovial artificiel.
- [0223] La composition selon la présente invention permet de mimer un fluide synovial sain ou d'améliorer un fluide synovial sain ou défectueux en cherchant par exemple à améliorer sa capacité lubrifiante pour réduire les frictions dans l'articulation, et/ou ses propriétés d'absorption des chocs (identifiable par le module d'élasticité G'), tout en étant facilement injectable pour remplir une seringue par exemple ou être injectée dans le corps humain ou animal. Pour indication, le module élastique G' du liquide synovial sain est compris entre 40 et 100Pa, et son module de perte G'' est compris entre 1 et 10Pa.

- [0224] Avantageusement, pour une injection intra-articulaire, une composition selon l'invention est facilement injectable au travers d'une aiguille fine, par exemple une aiguille de diamètre 21 Gauge, à température ambiante. Par injection « facile », on entend de préférence que la force à exercer sur une telle seringue est inférieure à 50 Newton (à une vitesse de 10mm/min) pour faire écouler une composition selon l'invention au travers d'une aiguille de 21 Gauge, de préférence une force inférieure à 20 Newton.
- [0225] Avantageusement, pour une injection intradermique, une composition selon l'invention est facilement injectable au travers d'une aiguille fine, par exemple une aiguille de diamètre 25 Gauge, ou de diamètre inférieur, à température ambiante. Par injection « facile », on entend de préférence que la force à exercer sur une telle seringue pour éjecter dans l'air est inférieure à 30 Newton (à une vitesse de 10mm/min) pour faire écouler une composition selon l'invention au travers d'une aiguille de 27 Gauge, de préférence une force inférieure à 20 Newton.
- [0226] La présente invention concerne également une composition à titre de larmes artificielles comprenant un carboxyalkyl chitosane selon l'invention.
- [0227] 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.
- [0228] Avantageusement, la composition selon la présente invention est stérile. Très avantageusement, la composition selon la présente invention est stérilisée par montée en température, de préférence sous autoclave.
- [0229] Selon un mode de réalisation, la matrice présente une capacité de lubrification dont le coefficient de friction (COF) est faible, par exemple inférieur à 20, et par exemple inférieur à 10, selon le test des exemples de l'invention.
- [0230] Selon une variante, les compositions de l'invention sont transparentes ou translucides.
- [0231] Par « translucide » on entend que l'on peut distinguer un objet lorsqu'on place sa composition entre l'œil de l'observateur et l'objet. Par « transparente » on entend que l'on peut distinguer des caractères alphanumériques lorsqu'on place la composition entre l'œil de l'observateur et les caractères observés. En général on réalise cette évaluation avec une épaisseur de composition d'environ 1cm. On peut également suivre la méthode de la monographie 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne pour l'inspection visuelle. On peut également mesurer la densité optique de la composition, par exemple par spectrométrie UV-visible à 500nm et s'assurer que la densité optique est inférieure à 0,5, de préférence 0,2 par rapport à un solvant de référence.
- [0232] Selon une variante, les compositions de l'invention ne sont pas ou peu opalescentes.
- [0233] Par « opalescent » on entend que la solution entraîne une diffraction de la lumière

visible à l'œil nu, par exemple par inspection visuelle selon une méthode telle que la monographie 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne et par comparaison à des solutions de référence de niveaux d'opalescence différents de la Pharmacopée Européenne. Selon une variante, la composition de l'invention est incolore, c'est-à-dire en particulier qu'un observateur à l'œil nu n'attribue pas de couleur spécifique à la composition. Selon une variante, l'opalescence est inférieure au maximum toléré pour l'application envisagée.

- [0234] 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. Il s'agit typiquement de dispositifs permettant d'instiller le produit sous forme de gouttes ou de seringues pré-remplies.
- [0235] La composition de l'invention peut avantageusement être stérilisée. Ainsi, l'invention concerne un carboxyalkyl chitosane réticulé stérilisé. Le carboxyalkyl chitosane réticulé est donc ainsi stérile, notamment pour des applications le nécessitant.
- [0236] Selon une variante, la composition de l'invention est stérilisée à la vapeur, selon une méthode connue de l'homme du métier et/ou recommandée par la pharmacopée européenne.
- [0237] 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 0,2 μ m.
- [0238] Avantageusement, selon un mode de réalisation préféré, la perte en viscosité intrinsèque du carboxyalkyl chitosane réticulé lors d'une stérilisation à la vapeur est inférieure à 40%.
- [0239] La présente invention couvre également une méthode de traitement thérapeutique comprenant l'injection d'une composition selon l'invention.
- [0240] 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.
- [0241] 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 comblement de rides 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.
- [0242] 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, et le tissu nerveux.

- [0243] 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.
- [0244] 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.
- [0245] 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.
- [0246] Ainsi, chaque exemple a une portée générale.
- [0247] 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.

Méthode de mesure du potentiel zeta

- [0248] La formulation à analyser est diluée dans un tampon phosphate pour obtenir une concentration finale en polymère de 0,05%, puis légèrement agitée jusqu'à homogénéisation. La solution est ensuite séparée en différentes fractions, et le pH de chacune des fractions est ajusté à la valeur désirée, entre pH 4 et 8, soit par ajout d'hydroxyde de sodium à 0,1N soit par ajout d'acide chlorhydrique à 0,1N. Le potentiel zeta de chaque fraction est mesuré à l'aide d'un appareil « Nano-Z » (gamme Zeta-Sizer, Malvern Instruments).

[0249] Méthode de mesure de la plage de solubilité des polymères de chitosane

- [0250] La plage de solubilité est établie en préparant une solution du polymère à tester à une concentration de 1% et un pH de 9, en le fractionnant en plusieurs fractions dont le pH est ajusté à différents pH sur une gamme de 9 à 1. On vérifie pour chaque fraction que le polymère est soluble, c'est-à-dire qu'il ne forme pas de trouble, selon la méthode d'inspection visuelle de la monographie 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne. On note la plage de pH sur laquelle le polymère est soluble ou insoluble.

Profil biomécanique par rhéométrie

- [0251] Le profil biomécanique de l'échantillon est caractérisé à l'aide d'un rhéomètre DHR-2 Hybrid Rheometer (TA Instrument) équipé d'une géométrie plane de 20 mm espacé de 700µm avec le peltier, à une température de 37°C, une fréquence de 3,98 rad/s et une amplitude de déformation allant de 0,1 à 10%. Chaque mesure est réalisée en

triplicate, puis on calcule la valeur moyenne des modules d'élasticité (G'), de viscosité (G'') et du $\tan \delta$ (G''/G') des trois mesures.

Capacité de lubrification

- [0252] La capacité de lubrification est caractérisée par le coefficient de friction (COF) entre deux surfaces. La mesure du coefficient de friction est réalisée selon la méthode suivante, dont les paramètres sont choisis selon le produit et l'indication visés.
- [0253] • **Méthode pour viscosuppléments**
- [0254] Deux disques à base d'un biomatériau de type polyacrylate utilisé pour la fabrication de lentilles intraoculaires hydrophobes (tel que décrit dans le brevet EP 1830898 de diamètre 16,15 mm sont préalablement hydratés par immersion dans l'eau à 60°C pendant environ 2 heures, puis fixés sur les géométries supérieure et inférieure d'un rhéomètre DHR-2 (TA Instruments). Un volume d'environ 100 μ L de l'échantillon à tester est placé sur le disque inférieur, puis la géométrie supérieure est descendue jusqu'au contact entre les deux disques, jusqu'à une force normale imposée de 5 Newton. Les mesures du coefficient de friction sont réalisées à 25°C pendant une durée de 150 secondes, à force normale constante (5N), fréquence d'oscillation de 1,256 rad/s et angle de déformation d'environ 0,05 radian, selon un protocole adapté du protocole décrit par Waller et al. (in : J 47 Rheumatol 39, 7, 1473, 2012). L'option « respect du point zéro de départ du mouvement oscillatoire » est activée. A chaque point de mesure, on enregistre la valeur du torque, puis on calcule le coefficient de friction (COF) selon la formule : $COF = \text{torque} / (1/3 \times \text{diamètre du disque} \times \text{force normale})$. Pour chaque formulation, la mesure est répliquée 5 fois. On rapporte la valeur du coefficient de friction par extrapolation 5 de l'ordonnée à l'origine au départ de chaque courbe COF en fonction du temps (COF_0).
- [0255] • **Méthode pour larmes artificielles**
- [0256] Deux disques à base d'un biomatériau de type polyacrylate utilisé pour la fabrication de lentilles intraoculaires hydrophobes (tel que décrit dans le brevet EP 1830898 de diamètre 16,15 mm sont préalablement hydratés par immersion dans l'eau à 60°C pendant environ 2 heures, puis fixés sur les géométries supérieure et inférieure d'un rhéomètre DHR-2 (TA Instruments). Un volume d'environ 100 μ L de l'échantillon à tester est placé sur le disque inférieur, puis la géométrie supérieure est descendue jusqu'au contact entre les deux disques, jusqu'à une force normale imposée de 5 Newton. Les mesures du coefficient de friction sont réalisées à 25°C pendant une durée de 150 secondes, à force normale constante (5N), fréquence d'oscillation de 1,256 rad/s et angle de déformation d'environ 0,05 radian, selon un protocole adapté du protocole décrit par Waller et al. (in : J 47 Rheumatol 39, 7, 1473, 2012). L'option « respect du point zéro de départ du mouvement oscillatoire » est activée. A chaque point de mesure, on enregistre la valeur du torque, puis on calcule le coefficient de

friction (COF) selon la formule : $COF = \text{torque} / (1/3 \times \text{diamètre du disque} \times \text{force normale})$. Pour chaque formulation, la mesure est répliquée 5 fois. On rapporte la valeur du coefficient de friction par extrapolation 5 de l'ordonnée à l'origine au départ de chaque courbe COF en fonction du temps (COF_0).

Force d'éjection via une aiguille

[0257] La mesure est réalisée à l'aide d'un banc de compression MultiTest 2.5-i (Mecmesin) équipé avec une cellule de compression de 100N. On adapte une aiguille adéquate à la seringue qui contient l'échantillon. On positionne la seringue sur le banc, on appuie sur le piston de la seringue à une vitesse constante (par exemple 10 ou 80mm/min), puis on mesure la force nécessaire pour l'éjection. La force maximale tolérée par l'équipement est d'environ 70 Newton.

Capacité antioxydante in vitro (test ABTS)

[0258] Pour mesurer l'activité antioxydante des formulations à base de carboxyalkyl chitosane et la comparer avec celle de produits disponibles commercialement, on applique le test in vitro 'ABTS'. Ce test consiste à déterminer la capacité d'une substance à piéger le radical cation du 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS\bullet 1$), un chromophore dont l'absorption maximum se situe à la longueur d'onde 734 nm sous sa forme radical cation. Le protocole est adapté de la méthode décrite par Valyova et al. (Int J Applied Res Nat Prod, 5, 19, 2012) et réalisé avec une microplaque en polystyrene de type Nunclon 96 (Thermo Fisher Scientific) et un lecteur de microplaque Infinite M200 (Tecan Life Sciences) pour la mesure d'absorbance.

[0259] Chaque série de test se déroule en 4 étapes.

[0260] 1) On dilue 1g de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) dans une solution homogène de $K_2S_2O_8$ (2.45 mM dans l'eau MilliQ) pour obtenir une concentration de 7 mM en ABTS. Ce mélange est protégé de la lumière et agité à température ambiante durant 24 heures, temps nécessaire à la génération d'une quantité définie de cations radicaux $ABTS\bullet 1$. La solution de travail $ABTS\bullet 1$ est finalement obtenue en prélevant 600 μ L de ce dernier mélange et en diluant cette quantité dans de l'eau milliQ à une concentration de 415 μ M.

[0261] 2) On établit une courbe de calibration de la capacité de piégeage des radicaux libres par comparaison avec le Trolox, une molécule antioxydante de référence (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Des solutions de Trolox de concentration 30, 60, 90, 120, 150, 180 et 210 μ M sont obtenues par dilution dans de l'eau MilliQ d'une solution-mère de 15mg de Trolox dans 5mL de méthanol 100%. Les mesures d'absorbance sont effectuées à la longueur d'onde 734 nm, 1 heure après le mélange de 50 μ L de la solution de travail $ABTS\bullet 1$ et de 50 μ L de chaque solution de

Trolox. On relève la relation entre l'absorbance et la concentration en Trolox dans la zone de linéarité. La valeur d'absorbance minimale de la zone de linéarité correspond au seuil de détection.

[0262] 3) Les produits à tester sont soit caractérisés tels quels à leur concentration initiale, soit dilués dans de l'eau MilliQ (à définir selon le produit à tester pour que l'absorbance du mélange avec la solution ABTS•1 soit supérieure au seuil de détection). On mélange 50µL de la solution de travail et 50 µL de la solution du produit à tester. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde 734 nm après 1 heure d'incubation à température ambiante. Si la valeur d'absorbance se trouve dans la gamme de détection de l'appareil, on la retient et on calcule l'équivalent Trolox via à la courbe de calibration, noté TEAC pour « trolox equivalent antioxidant capacity ».

[0263] 4) Un contrôle positif est utilisé afin d'exprimer la capacité antioxydante de manière normalisée d'une série à l'autre, l'acide ascorbique (vitamine C) en solution à la concentration 0,02 mg/ml (20µg/ml). On mesure d'abord la TEAC de solutions d'acide ascorbique de 0,005 à 0,05mg/mL. On vérifie que l'absorbance de la solution d'acide ascorbique à 0,02 mg/ml se trouve dans la zone de linéarité. On exprime enfin la capacité antioxydante normalisée du produit testé par le ratio TEAC (produit) / TEAC (acide ascorbique à 0.02 mg/mL).

Exemple 1

[0264] On produit un carboxyméthyl chitosane via les réactions de carboxyméthylation et d'acétylation selon la méthode ci-dessous, en utilisant les paramètres de réaction du Tableau 1a, donnés à titre d'exemple. Il est par ailleurs possible de moduler la structure moléculaire du carboxyméthyl chitosanes en utilisant d'autres paramètres de réaction.

[0265] Etape 1 : carboxyméthylation du chitosane.

[0266] 30g de chitosane d'origine *Agaricus bisporus* (I-180611) sont dispersés dans 600mL d'isopropanol, 41mL d'eau et 163mL d'hydroxyde de sodium à 50% (m/v). 135g de l'agent alkylant acide monochloroacétique (MCA) sont dissous dans 135mL d'isopropanol, et ajoutés à la suspension de chitosane. La réaction est poursuivie à 35°C pendant 23 heures. 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 carboxyméthyl chitosane (référence CC4, Tableau 1b) après séchage dans une étuve ventilée.

[0267] Etape 2 : acétylation du carboxyméthyl chitosane.

[0268] Une masse de 21g de CC4 est dispersée dans 570mL d'eau, et le pH de la solution est ajusté à pH > 7. Un volume de 10mL d'anhydride acétique est ajouté, et la solution est agitée à 25°C pendant 30 minutes. Le pH de la solution est ajusté à un pH >7, puis un volume de 10mL d'anhydride acide est ajouté. Après homogénéisation (environ 30 minutes d'agitation à température ambiante), le pH est ajusté à pH environ 7,5. Le

polymère est récupéré par précipitation dans l'éthanol, puis purifié par des cycles de solubilisation dans l'eau et précipitation. On collecte le carboxyméthyl chitosane (référence CC3, Tableau 1b) après séchage dans une étuve ventilée.

[0269] Les carboxyméthyl chitosanes utilisés pour préparer les matrices des exemples 2 à 11 sont décrits dans le Tableau 1b. Les CC1 à CC6 sont des carboxyméthyl chitosanes issus de chitosane d'origine fongique, et préparés selon la méthode ci-dessus.

[0270] Le CC7 est un carboxyméthyl chitosane commercial issu de crustacé, fourni par la société Kraeber (code produit 5313009900, Ellerbek, Allemagne).

[0271] [Tableaux 1a]

Tableau 1a – Paramètres des réactions de carboxyméthylation et d'acétylation	
Etape 1 : Carboxyméthylation	Référence : CC4 (060-065)
Agent alkylant	Acide monochloroacétique (MCA)
NaOH / chitosane	5,44% (m/m)
Agent alkylant / chitosane	4,50% (m/m)
Isopropanol / agent alkylant	100%
Température - durée	35°C – 23 heures
Etape 2 : Acétylation	Référence : CC3 (060-070)
Anhydride acétique/CC	0,5 (v/m)
-Premier ajout	0,5 (v/m)
-Deuxième ajout	
Température - durée	25°C – 1 heure

[0272] [Tableaux1b]

Tableau 1b – Carboxyméthyl chitosanes (CC)					
Référence	Origine	DA^a (mol %)	DS^a (mol %)	DN^b (mol %)	Viscosité Inhérente^c (mL/g)
CC1 180924	<i>Agaricus bisporus</i>	58	82	20	1096
CC2 180326 (LOT CLI 180530)		56	81	20	994
CC3 060-070		55	87	20	912
CC4 060-065		14	85-90	41	652
CC5 181008		57	88	23	960
CC6 180830		47	85	24	1064
CC7 (Kraeber)	Crustacé	<10% ^d	79	95	332

[0273] a : mesuré par RMN du carbone 13 en phase solide (formule 2) ; b : mesuré par titrage potentiométrique ; c : mesurée par viscosimétrie capillaire ; d : le signal du groupe acétyl est non détectable par RMN du carbone 13 (DA faible).

Exemple 2 – Matrices de carboxyméthyl chitosane

[0274] Des essais de synthèse ont été réalisés dans le but de fournir des matrices de carboxyméthyl chitosane par réticulation covalente à l'aide de l'agent de réticulation 1,4-butanediol diglycidyl éther (CAS 245-79-8, BDDE). Plusieurs carboxyméthyl chitosanes d'origine *Agaricus bisporus* (Kiomed Pharma) produits selon la méthode de l'Exemple 1 sont utilisés. Leurs caractéristiques se trouvent au Tableau 1. Le BDDE (96%, densité 1,049) est fourni par Alfa Aesar (ThermoFischer, Kandel, Allemagne).

Exemple 2a

[0275] On prépare une matrice réticulée au départ du carboxyméthyl chitosane CC3 après avoir ajusté les paramètres de réaction (Tableau 2a, colonne M1-A). CC3 présente un degré d'acétylation de 55% et un degré de carboxyméthylation de 87%, mesurés par RMN du carbone 13 (formule 2). Après dialyse, l'hydrogel formé par la matrice est transféré dans des seringues en verre de 3mL que l'on stérilise à la vapeur via un cycle

court, dans un autoclave SYSTEC-DX-65 (condition « A2 »). La concentration finale en polymère de l'hydrogel stérilisé obtenu (M1-A) 061-087B est déterminée par bilan de masse. Le caractère cohésif de l'hydrogel est analysé par le test de l'eau et son niveau de viscoélasticité (sur une échelle de 1 à 4) est déterminé par rhéométrie. Plus le score de est élevé, plus la matrice formant l'hydrogel est élastique. On conclut qu'après adaptation des paramètres de réaction, il est possible d'obtenir une matrice de carboxyalkyl chitosane réticulé par le BDDE formant un hydrogel cohésif selon le test de l'eau. L'hydrogel présente un score d'élasticité de 1. Il est injectable au travers d'une aiguille intradermique (27G 13mm).

[0276] Ces mêmes paramètres de réaction ont ensuite été appliqués avec deux carboxyméthyl chitosanes de structure moléculaire différentes et dont le degré d'acétylation est inférieur à 40% (Tableau 1b) : CC4 (060-065) d'origine fongique (Kiomed Pharma) et CC7 d'origine crustacé (Kraeber).

[0277] [Tableaux2a]

Tableau 2a – Matrices de carboxyalkyl chitosane réticulé				
Référence	M1-A	M1-B	M1-C	M1-D
	061-087B	061-087A	061-143	061-148
Polymère - référence (masse), concentration initiale	CC3 (7g) 060-070 11%	CC4 (7g) 060-065 11%	CC4 (7g) 060-065 11%	CC7 (7g) Kraeber 11%
DA	>40%	<40%	<40%	<40%
Origine	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	Crustacé
Phase aqueuse - Composition	Tampon phosphate, NaOH 0,25M			
Phase aqueuse - Volume	63,4 mL			
Agent de réticulation - Molécule (volume)	BDDE 1,2mL	BDDE 1,2mL	BDDE 0,6 mL	BDDE 1,2mL
Agent/polymère (g/100g)	18% m/m	18% m/m	9% m/m	18% m/m
Température, durée de la réaction	50°C, 2 hrs			
Neutralisation	Acide chlorhydrique, tampon phosphate			
Purification	Dialyse contre tampon phosphate salin			
Stérilisation	A2*			
Concentration finale en polymère (mg/ml)	24	26	25	22
Cohésion de l'hydrogel (test de l'eau)	OK	NOK	NOK	NOK
pH – Osmolalité (mOsm/kg)	7,2 - 289	/	/	/
Niveau de visco-élasticité	1	/	/	/

(échelle de 0 à 4)				
Facile à injecter ** (aiguille 27G, 13mm)	OK	/	/	/

[0278] *A2 : cycle court (autoclave SYSTEC DX-65) ; **la force d'éjection est inférieure à 30 Newton à la vitesse d'éjection de 10mm/min.

[0279] Les matrices obtenues dans les mêmes conditions que celles de la matrice M1-A, respectivement M1-B et M1-C (Tableau 2a), n'ont pas formé d'hydrogel cohésif selon le test de l'eau. En revanche, la matrice M1-A permet de former un hydrogel cohésif, satisfaisant ainsi à ce but de la présente invention.

Exemple 2b

[0280] On cherche à moduler les propriétés biomécaniques des hydrogels à base de carboxyalkyl chitosane réticulé, en particulier leur viscoélasticité (mesurée sur une échelle de 0 à 4). Pour cela, des matrices sont préparées au départ des CC1, CC5 et CC6 dont le DA est supérieur à 40% (Tableau 1b), en faisant varier la masse moléculaire du carboxyalkyl chitosane (exprimée en viscosité inhérente) et les paramètres de la réaction de réticulation. L'agent réticulant (BDDE), le milieu, la température et la durée de réaction sont les mêmes que celles de la matrice M1-A, ainsi que les conditions de neutralisation et de purification.

[0281] [Tableaux2b]

Tableau 2b – Matrices de carboxyalkyl chitosane réticulé de viscoélasticité variables							
Référence	M1-E	M1-F	M1-G	M1-H	M1-I	M1-J	M1-K
	190318	061-075	061-127 A	061-127B	59-136	61-036	056-020
Polymère - Référence (masse sèche)	CC1	CC1	CC1	CC1	CC5	CC5	CC6
Concentration initiale	11%				15%	13%	8%
BDDE/polymère (g/100g)	18%	13%	21%	26%	9%	9%	18%
Stérilisation*	A2*	A2*	A2*	A2*	A2*	A2*	A1*
Concentration finale (mg/ml)	23	21	24	23	22	25	24
Cohésion de l'hydrogel (test de l'eau)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
pH - Os- molalité (mOsm/kg)	7,2 316	7,3 288	7,2 287	7,2 287	7,2 281	7,2 287	7,4 319
Niveau de vis- coélasticité (échelle de 0 à 4)	2	1	2	3	3	1	1
Facile à injecter (aiguille 27G, 13mm)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

[0282] *A2 : cycle court, (autoclave SYSTEC DX-65) ou A1 : cycle long, (autoclave SYSTEX DX-23)

[0283] Il apparaît qu'il est possible de faire varier les propriétés biomécaniques des

hydrogels à base de carboxyalkyl chitosane réticulé, en particulier la viscoélasticité, en faisant varier les paramètres de réaction (notamment, concentration initiale en carboxyalkyl chitosane ou ratio agent réticulant/ carboxyalkyl chitosane, ici BDDE/ carboxyméthyl chitosane) ainsi que la masse moléculaire du carboxyalkyl chitosane.

[0284] **Exemple 3 – Matrices de carboxyméthyl chitosane et de hyaluronane co-réticulés**

[0285] On cherche à obtenir des matrices par réticulation d'un mélange de carboxyméthyl chitosane d'origine fongique et de DA supérieur à 40% (Tableau 1b) et de hyaluronane avec le BDDE (« co-réticulation »). On utilise des hyaluronanes (HA) de masse moléculaire viscosimétrique moyenne de 2,2, et 4,3 million (Tableau 3a).

[0286] [Tableaux3]

Tableau 3 – Hyaluronate de sodium (HA)			
Type	Fournisseur	Mw* (million)	Densité* (m³/kg)
HA1	HTL Javenech (France)	2,2	2,32 m ³ /kg
		2,3	2,36 m ³ /kg
HA 2		4,3	3,68 m ³ /kg

[0287] *valeurs rapportées par le fournisseur

[0288] L'agent (BDDE), le milieu, la température et la durée de la réaction de réticulation sont les mêmes que celles de la matrice M1-A (Exemple 2), ainsi que les conditions de neutralisation et de purification. Les hydrogels formés par les matrices sont stérilisés par autoclave comme décrit à l'Exemple 2 (conditions A1 ou A2). Plusieurs hydrogels sont décrits à titre d'illustration, d'autres combinaisons et/ou paramètres pouvant également mener à des hydrogels cohésifs. Tous ces hydrogels sont faciles à injecter au travers d'une aiguille intradermique de taille 27 Gauge et de longueur 13 mm.

Exemple 3a

[0289] On cherche à montrer qu'il est possible de co-réticuler le carboxyalkyl chitosane (CC) avec le hyaluronane (HA) pour former un hydrogel cohésif. Pour cela on prépare une matrice au départ d'un mélange de CC et HA dans un ratio massique CC/HA de 75 :25 (Tableau 3a). Les références des CC sont conformes aux exemples précédents. De plus, on cherche à moduler le niveau d'élasticité de 1 à 3 (sur une échelle de 0 à 4), en ajustant les paramètres de la réaction de réticulation.

[0290] [Tableaux3a]

Tableau 3a – Matrices de CC et HA co-réticulés (ratio massique 75:25)				
Référence	M2-A 190325	M2-B 190402	M2-C 59-075	M2-E 56-138
Polymères - Référence (masse)	CC1	CC1	CC5	CC1
	HA1	HA1	HA2	HA1
Concentration initiale en polymères (% m/v)	(11%)	(11%)	(11%)	(11%)
BDDE/polymères (% g/100g)	13%	18%	13%	13%
Stérilisation*	A2	A2	A1	A1
Concentration finale en polymères (mg/mL)	23	23	24	23
Cohésion de l'hydrogel (test de l'eau)	OK	OK	OK	OK
pH - Osmolalité (mOsm/kg)	7,3 – 314	7,3 – 317	7,2 – 286	7,2 – 287
Niveau de viscoélasticité (échelle de 0 à 4)	2	3	2	1

[0291] *conditions de l'Exemple 2

[0292] On observe qu'au même ratio BDDE/polymères (18%) et à la même concentration finale en polymère (23mg/mL), l'hydrogel M2-B de CC co-réticulé avec 25% de HA est plus élastique que l'hydrogel M1-A de CC de l'Exemple 2. On conclut aussi qu'il est possible de faire varier les propriétés viscoélastiques des hydrogels de carboxyalkyl chitosane et HA co-réticulés en jouant sur la masse moléculaire du HA, le pourcentage d'agent réticulant, ici de BDDE.

Exemple 3b

[0293] On cherche à obtenir des hydrogels cohésifs au départ de carboxyalkyl chitosane et HA co-réticulés en proportion variable.

[0294] [Tableaux3b]

Tableau 3b – Matrices decarboxyalkyl chitosane et HA co-réticulées (ratio CC / HA variable)			
Référence	M2-F 61-54	M2-G 61-48	M2-H 59-40
Polymères - Référence	CC5	CC5	CC1
	HA1	HA1	HA1
Concentration initiale	11%	11%	11%
Ratio massique CC/HA (m/m)	25 : 75	50 : 50	95 : 5
BDDE/polymères (% g/100g)	13%	13%	13%
Cohésion de l'hydrogel (test de l'eau)	OK	OK	OK
Concentration finale en polymères (mg/ml)	23	23	22
pH - Osmolalité (mOsm/kg)	7,3	7,3	7.2
	292	293	299
Niveau de viscoélasticité (échelle de 0 à 4)	3	2	1

[0295] Il apparait qu'il est possible d'obtenir des hydrogels cohésifs de carboxyalkyl chitosane et HA co-réticulés en proportion variable, et que leur niveau d'élasticité dépend du ratio carboxyalkyl chitosane /HA.

[0296] **Exemple 4 – Matrices de carboxyméthyl chitosane réticulé combiné à un hyaluronane**

[0297] Dans cet exemple, on cherche à évaluer la possibilité de former un hydrogel cohésif au départ d'une matrice de carboxyalkyl chitosane réticulé combiné à du HA. Le carboxyalkyl chitosane est réticulé avec le BDDE selon une méthode de l'Exemple 1, dans lequel on ajoute le HA (référence HA1). L'hydrogel ainsi obtenu est ensuite stérilisé par autoclave via le cycle A2. (Tableau 4).

[0298] [Tableaux4]

Tableau 4 – Matrice de carboxyalkyl chitosane combiné à HA	
Référence	M4-A 059-158
CC Référence - concentration initiale	CC5 15%
HA	HA1
BDDE/polymère (g/100g)	13%
Concentration finale en polymères (mg/ml)	22
Concentration finale, ratio CC/HA (mg/ml)	19,5 / 0,3
Stérilisation	A2
Cohésion de l'hydrogel (test de l'eau)	OK
pH - Osmolalité (mOsm/kg)	7,2 - 275
Niveau de viscoélasticité (échelle de 0 à 4)	3
Facile à injecter (aiguille 27G, 13mm)	Oui

[0299] Il est aisé d'incorporer du HA dans un hydrogel à base d'une matrice de carboxyalkyl chitosane réticulé. L'hydrogel obtenu est cohésif selon le test de l'eau, et présente un score de viscoélasticité de 3, tout en étant facile à injecter au travers d'une aiguille intradermique de diamètre 27 Gauge.

[0300] **Exemple 5 – Propriétés biomécaniques des hydrogels**

[0301] Dans cet exemple, on caractérise les propriétés biomécaniques de certains hydrogels cohésifs, injectables via une aiguille de 27G et de niveaux d'élasticité de 1 à 3 représentatifs des Exemples 2 à 4, par rhéométrie, en particulier le module d'élasticité (G'). On les compare à celles de produits commerciaux à base de hyaluronane réticulé, destinés à l'injection intradermique à visée esthétique.

[0302] [Tableaux5]

Tableau 5 – Profil biomécanique des hydrogels					
	C_p (mg/ml)	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan δ	Niveau de visco-élasticité (échelle de 0 à 4)
M1-E 190318	23	40	14	0,3	2
M1-F R-061-075	21	17	8	0,5	1
M2-A 190325	23	37	14	0,4	2
M2-B 190402	23	127	21	0,2	3
M2-C 59-075	24	42	15	0,4	2
M2-E 56-138	23	11	8	0,8	1
M4-A 059-158	22	106	34	0,3	3
B1 Soft	20	11	13	1,2	1
B2 Balance	22,5	48	31	0,7	2
B3 Intense	25,5	137	53	0,4	3

[0303] On confirme que les hydrogels à base de carboxyalkyl chitosane réticulé selon l'invention présentent des modules d'élasticité (G') comparables à ceux des produits commerciaux à base de HA réticulé destinés à l'injection intradermique pour la médecine esthétique.

[0304] **Exemple 6 – Capacité à capturer les radicaux libres ABTS°1 (in vitro)**

[0305] On cherche à vérifier que les matrices de carboxyalkyl chitosane réticulés sont capables de capturer les radicaux libres oxydants, en utilisant un test in vitro standard, dit « ABTS ».

[0306] Chaque produit à tester est dilué pour obtenir une concentration totale en polymère C_p (carboxyalkyl chitosane, HA, ou carboxyalkyl chitosane et HA) de 8 mg/ml, 4 mg/ml et 1 mg/ml. On vérifie que le résultat se trouve bien dans la zone de détection du test, puis on exprime la capacité à capturer le radical ABTS°1 en équivalent Trolox et on

calcule la capacité antioxydante normalisée égale à TEAC (produit) / TEAC (acide ascorbique à 20µg/ml).

[0307] De plus, on teste le polymère carboxyalkyl chitosane non réticulés en solution (CC2), et un produit commercial à base d'une solution de HA non réticulé (référence B6). On caractérise 4 produits commerciaux destinés à l'injection intradermique à visée esthétique : B1 à B3, à base de HA réticulé seul (description au Tableau 5 de l'Exemple 5), et B4, à base de HA réticulé combiné avec un complexe de plusieurs petites molécules y compris des molécules antioxydantes.

[0308] Le Tableau 6 rapporte les résultats obtenus à la même concentration totale en polymère (C_p) de 4 mg/ml pour tous les produits.

[0309] [Tableaux6]

Tableau 6 – Capacité antioxydante via le test ABTS (normalisée par rapport à l'acide ascorbique à 20µg/ml)				
Référence	Composition	C_p Initiale (mg/ml)	C_p (mg/ml)	Capacité antioxydante normalisée
<u>Contrôle positif</u>				
/	Acide ascorbique	/	0,02	1
<u>Solutions (sans réticulation)</u>				
S1 180530	CC2	20 mg/ml	4	0,76
B6 Teosyal Meso	HA	15 mg/ml	4	0,15
<u>Hydrogels (avec réticulation)</u>				
M1-E 190318	CC	23 mg/ml	4	1,02
M2-F 180325	CC/HA 75 :25	23 mg/ml	4	0,97
<u>Produits commerciaux (HA réticulé)</u>				
B1 Soft	HA	20 mg/ml	4	0,14
B2 Balance	HA	22,5 mg/ml	4	0,17
B3 Intense	HA	25,5 mg/ml	4	0,14
B4 Redensity II	HA, complexe	15 mg/ml	4	0,53

[0310] On observe que toutes les compositions à base de carboxyalkyl chitosane sont capables de capturer le radical cation ABTS^{°1} de manière significative, et ainsi d'agir comme antioxydant, que ce soit une solution de carboxyalkyl chitosane non réticulé

(référence S1) ou les hydrogels de carboxyalkyl chitosane réticulé (M1-E et M2-F). A la même concentration en polymère, les produits commerciaux à base de HA seul (B1 à B3) ne montrent pas cette capacité.

- [0311] De manière surprenante, les hydrogels M1-E (100% CC) et M2-F (75% de CC / 25% de HA) montrent la capacité antioxydante la plus élevée de tous les produits testés, y compris par rapport à la solution S1 de carboxyalkyl chitosane non réticulé. Ces deux hydrogels ont la même capacité antioxydante que la vitamine C à 20µg/ml.
- [0312] Parmi les produits commerciaux à base d'hydrogels de HA testés dans les mêmes conditions, seul B4 (Teosyal Redensity II) est capable de capturer le radical de manière significative, néanmoins avec une capacité 2 fois moins élevée que celle de M1-E et M2-F. En fait, il s'agit un hyaluronane réticulé associé avec un complexe de plusieurs petites molécules dont des antioxydants, à l'origine de l'effet observé. Cependant, comme ces substances sont des petites molécules hydrosolubles, il est probable qu'elles diffusent rapidement hors de l'hydrogel après injection intradermique, et que celui-ci perdra alors sa capacité antioxydante.
- [0313] **Exemple 7 – Capacité des hydrogels à diminuer le stress oxydant dans une culture de cellules dermales *in vitro***
- [0314] On évalue la capacité de deux hydrogels à base de carboxyalkyl chitosane réticulé (référence M1-E 190318, Exemple 2) et de CC/HA co-réticulés (M2-F 190325, Exemple 3) à protéger les cellules humaines dermales vis-à-vis dommages causés par les radicaux libres de type 'ROS' (reactive oxygen species), qui sont des espèces radicalaires rencontrées dans le tissu cutané sous stress oxydant, dans un test *in vitro* standard. On la compare à celle d'une solution de carboxyalkyl chitosane non réticulé, et d'un produit commercial à base de hyaluronane réticulé destiné à l'injection intradermique à visée esthétique, de référence B3.
- [0315] Des fibroblastes dermiques humains (NHDF) à environ 40% de leur potentiel de prolifération *in vitro* sont cultivés en monocouche dans un milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) avec 10% de sérum fœtal de bovin, de la pénicilline et de la streptomycine, à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. La culture est transférée dans du DMEM sans sérum fœtal bovin, puis fractionnée dans des puits. Le produit à tester est dilué dans le DMEM pour atteindre les concentrations totales en polymère de 0,6 et 0,2mg/mL, puis ajouté aux puits (3 puits par produit à tester). Après 72 heures de contact avec le produit à tester, on ajoute la sonde 2'-7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate, qui devient fluorescente sous l'effet des radicaux libres, pendant 30 minutes. On rince alors la culture de chaque puits par le HBSS pour éliminer le produit à tester, on replace les cellules dans le HBSS, puis on irradie tous les puits par des UVA à 12,5J/cm² pendant 20 minutes pour générer des ROS.

[0316] Une culture non traitée et non irradiée est utilisée comme référence. Une culture non traitée et irradiée est utilisée comme contrôle négatif, et une culture traitée par l'acide ascorbique (50µg/mL) et irradiée est utilisée comme contrôle positif. A la fin de l'irradiation par les UVA, on mesure l'intensité de fluorescence (longueur d'onde d'excitation 485nm, d'émission 520nm), qui est proportionnelle à la teneur en ROS, puis la teneur relative en ROS par rapport à la référence non irradiée est calculée (Tableau 7). On calcule ensuite la diminution de la teneur en ROS par rapport au contrôle non traité et irradié, ce qui caractérise la capacité du produit à diminuer le stress oxydant.

[0317] [Tableaux7]

Tableau 7 – Capacité des hydrogels diminuer le stress oxydant (traitement pendant 72h avant exposition aux UVA pendant 20 minutes)					
Traitement	Composition	Concentration	UVA	Teneur relative en ROS (moyenne ± écart-type, N=3)	Diminution de la teneur en ROS (%)
Référence	/	/	Non	100 ± 9%	/
Contrôle négatif	/	/	Oui	338 ± 20%	0%
Contrôle positif	Acide ascorbique	50µg/mL		233 ± 4%	-31%
<u>Solution</u> S1	CC2 non réticulé	0,6mg/mL*		249 ± 26%	-26%
<u>Hydrogels</u> M1-E 190318	CC réticulé	0,6mg/mL*		238 ± 25%	-30%
M2-F 180325	CC/HA co-réticulés	0,6mg/mL*		265 ± 24%	-22%
B3 Intense	HA réticulé	0,6mg/mL*		307 ± 16%	-9%

[0318] *concentration totale en polymère (CC, CC/HA ou HA) pour le traitement des cellules

- [0319] Dans les conditions de culture *in vitro* de ce test, on conclut que les compositions à base de CC, qu'il soit réticulé (M1-E) ou non réticulé (S2), ont une bonne capacité à diminuer la teneur en ROS, c'est-à-dire à diminuer le stress oxydant susceptible d'altérer les cellules et le tissu dermique. Cette capacité est du même niveau que celle de l'acide ascorbique (50µg/mL, vitamine C), et bien supérieure à celle du produit commercial à base de HA réticulé. Avec 75% de carboxyalkyl chitosane, la composition M2-F de CC/HA co-réticulés présente elle aussi une bonne capacité à diminuer le stress oxydant.
- [0320] **Exemple 8 – Hydrogel fluide à base de matrice de carboxyalkyl chitosane pour administration oculaire**
- [0321] Dans cet exemple, on cherche à obtenir un hydrogel de carboxyalkyl chitosane réticulé pour le traitement de la surface oculaire, qui soit facilement instillable tout en ayant une viscoélasticité et une capacité lubrifiante appropriées à cette indication.
- [0322] Pour cela, on prépare un hydrogel en visant une viscosité dynamique dans une gamme de de 1 à 60 mPa.s (à taux de cisaillement de 10 s^{-1}) (Tableau 8a). On vérifie sa cohésion selon le test de l'eau, puis son instillabilité, c'est-à-dire que l'on peut facilement former une goutte bien définie. On mesure la capacité de lubrification entre deux surfaces en polyacrylate.
- [0323] On compare les propriétés de cet hydrogel à celles de produits commerciaux destinés au traitement de la surface oculaire à base de HA (références B7 et B8) (Tableau 8b). Le coefficient de friction est mesuré dans une même série de test pour tous les produits.

[0324] [Tableaux8a]

Tableau 8a – Hydrogel fluide à base de carboxyalkyl chitosane	
Référence	M8-B 61-140B
Méthode	Matrice de carboxyalkyl chitosane réticulée
Polymère - réf, concentration initiale	CC1 11%
BDDE/polymère (g /100g)	13%
Stérilisation	Cycle A2
Apparence/texture ac- ceptables ?	Oui
Cohésion (test de l'eau)	OK
Concentration finale en polymère (mg/ml)	7 mg/ml
Instillabilité	OK
Viscosité dynamique à 10 ⁻¹ s (mPa.s)	1,1
Coefficient de friction	164 +/- 44

[0325] [Tableaux8b]

Tableau 8b – Produits commerciaux à base de HA pour l’administration oculaire		
Référence	B7	B8
	Vismed 0,18	Vismed 0,3
Concentration en HA (mg/ml)	1,8 mg/mL	3 mg/mL
Cohésion selon le test de l’eau	NOK	NOK
Instillabilité	OK	OK
Viscosité dynamique à 10 ⁻¹ s (mPa.s)	6	50
Coefficient de friction	141+/-57	264 +/- 64

[0326] On conclut que l’on peut d’obtenir des hydrogels de carboxyalkyl chitosane réticulé cohésifs et instillables dont la viscoélasticité est comparable à celle de produits commerciaux destinés au traitement de la surface oculaire. Cet hydrogel de carboxyalkyl chitosane réticulé présente une bonne capacité lubrifiante.

[0327] **Exemple 9 – Effets locaux après implantation intradermique chez le lapin (court-terme)**

[0328] Trois hydrogels à base de matrice de carboxyalkyl chitosane sont évalués par administration intradermique chez le lapin : M1-A (carboxyalkyl chitosane réticulé, Exemple 1), M2-A et M2-B (CC/HA co-réticulés, Exemple 2). Ce sont des formulations stériles, conditionnées dans une seringue en verre de 1 mL (Hypak, BD Medical). Leur contenu en endotoxines (mesuré selon la monographie EP 2.6.14 – méthode D de la Pharmacopée Européenne) est satisfaisant.

[0329] Deux produits commerciaux à base de hyaluronane réticulés disponibles sur le marché pour l’injection intradermique à visée esthétique sont également évalués (références B1 à B2, cf Exemple 5). Un volume de 200µL de formulation est administré par injection intradermique chez le lapin via une aiguille de diamètre 27 Gauge (aiguille de diamètre très faible), selon un protocole respectant la norme ISO10993 (partie 10) pour l’évaluation de l’irritation primaire induite par un implant intradermique. Un nombre total de douze injections par produit a été réalisé sur six

lapins. Les effets locaux sont observés quotidiennement pour tous sites injectés, en particulier le niveau d'érythème. Le Tableau 9 rapporte le niveau d'érythème moyen au délai de 7 jours après injection (score sur une échelle de 0 à 4). On note également si une papule est visible au délai de 7 jours (score sur une échelle de 0 à 4). Par analyse macroscopique ou par analyse microscopique (histologie du derme) des sites d'injection pour les animaux euthanasiés au délai de 7 jours après injection, on évalue la présence du produit.

[0330] [Tableaux9]

Tableau 9 – Effets locaux 7 jours après injection intradermique d'hydrogels à base de matrices de carboxyalkyl chitosane et HA chez le lapin (6 sites d'injection par produit testé)				
Référence	C_p (mg/mL)	Effets locaux – érythème (score moyen, échelle de 0 à 4)	Volume de la papule (score moyen, échelle de 0 à 4)	Présence dans le derme
M1-E 190318	23	0	0	Oui
M2-F 190325	23	0,5	1,0	Oui
M2-B 190402	23	1	1,0	Oui
B1 Soft	20	0	0	Oui
B2 Balance	22,5	0,1	1,3	Oui

[0331] L'injection intradermique des hydrogels est associée à l'apparition d'effets locaux légers, caractérisés par un érythème avec un score maximum de 1 en moyenne à 7 jours, sur une échelle de 0 à 4. Ceci correspond à niveau d'érythème léger, comparable à celui observé pour les 2 produits commerciaux. De plus, la présence des produits dans le derme a été démontrée lors de l'euthanasie des animaux et les analyses histologiques.

[0332] **Exemple 10 – Hydrogels pour la viscosupplémentation des articulations**

[0333] Dans cet exemple, les propriétés viscoélastiques et le caractère lubrifiant de deux hydrogels à base de carboxyalkyl chitosane réticulé et carboxyalkyl chitosane/HA co-réticulé a été évalué, et comparé à celui de deux produits commerciaux à base de HA

destinés au traitement de l'ostéoarthrose par viscosupplémentation des articulations (références B9 et B10). Le caractère lubrifiant des hydrogels est déterminé par leur capacité à réduire le coefficient de friction entre deux disques de polymère en polyacrylate montés sur un rhéomètre (Méthode pour viscosuppléments).

[0334] [Tableaux10]

Tableau 10 – Profil biomécanique (rhéométrie) et coefficient de friction (COF, moyenne de 3 seringues par produit, 5 mesures par seringue)					
Référence	Composition Cp (mg/mL)**	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan δ	COF
M1-E 190318	CC réticulé 23mg/mL	40	14	0,3	5,7 ± 0,6
M2-B 190402	CC / HA co-réticulés 23mg/mL	127	21	0,2	7,3 ± 0,6
B9 Synvisc 7RSP003ZA	HA réticulé / HA libre 8mg/mL	87	27	0,3	6.9 ± 1,0
B10 Durolane 15634	HA réticulé 20mg/mL	542	127	0,3	44 ± 20*

[0335] *l'écart-type est élevé, ce qui est indicateur de frictions élevées entre les deux surfaces (faible capacité lubrifiante du produit testé) ; **concentration totale en polymères

[0336] On observe que les deux hydrogels de carboxyalkyl chitosane testés présentent une capacité lubrifiante importante, caractérisée par un faible coefficient de friction entre les deux surfaces. Elle est comparable à celle du viscosupplément articulaire B10 à niveau de viscoélasticité équivalent. Elle est meilleure que celle du viscosupplément B11, d'élasticité très élevée (G').

Revendications

- [Revendication 1] Matrice 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 40% 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.
- [Revendication 2] Matrice, selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit carboxyalkyl chitosane présente un degré de substitution par un groupe carboxyalkyl 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.
- [Revendication 3] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le chitosane est 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).
- [Revendication 4] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le carboxyalkyl chitosane est réacétylé.
- [Revendication 5] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la matrice est stérile.
- [Revendication 6] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la matrice forme un hydrogel cohésif.
- [Revendication 7] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la matrice comprend au moins un hyaluronane.
- [Revendication 8] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la matrice comprend au moins un hyaluronane obtenu par fermentation.
- [Revendication 9] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la matrice comprend au moins un hyaluronane réticulé par liaisons covalentes.
- [Revendication 10] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la matrice comprend au moins un hyaluronane co-réticulé par liaisons covalentes avec le carboxyalkyl chitosane.
- [Revendication 11] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée

en ce que les réticulations sont formées par un agent réticulant formant lesdites liaisons covalentes.

- [Revendication 12] Matrice, selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'agent réticulant est choisi parmi les agents réticulant utilisés pour la réticulation 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-dibromopro- panethiol, 2,4-dibromobutanethiol, and 2,5-dibromopentane- thiol epichlorohydrin, 2,3-dibromopropanol, 1-chloro-2,3-epithiopropane, dimethylaminopro- pylcarbodiimide, 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 13] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle forme un hydrogel.
- [Revendication 14] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle forme un hydrogel cohésif.
- [Revendication 15] Matrice, selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que la matrice présente une capacité antioxydante par capture des radicaux libres, notamment une capacité antioxydante normalisée su- périeure à 0,30, de préférence supérieure à 0,50, et encore de préférence supérieure à 0,80, et par exemple supérieure à 0,90.
- [Revendication 16] Composition caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une matrice définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.
- [Revendication 17] Composition injectable caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une matrice définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.
- [Revendication 18] Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une matrice définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.
- [Revendication 19] Composition, selon la revendication 17 ou 18, caractérisée en ce que la composition est une composition pharmaceutique sous une forme adaptée à une administration par injection, implantation, 'instillation, ou administration topique, par exemple par voie sous-cutanée, intra- dermique, mucoale, oculaire, intraoculaire, ou intra-articulaire.
- [Revendication 20] Composition, selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est

utilisée 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 21] Composition selon la revendication 17 ou 18, 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 22] 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 16 à 21.
- [Revendication 23] Procédé de préparation d'une matrice telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, ledit procédé comprenant :
la mise en contact du carboxyalkyl chitosane avec au moins un agent de réticulation, la mise en contact étant de préférence réalisée en phase alcaline ;
la réticulation du carboxyalkyl chitosane par l'agent de réticulation ;
l'obtention d'une matrice comprenant le carboxyalkyl chitosane réticulé.
- [Revendication 24] Procédé de préparation d'une matrice comprenant un carboxyalkyl chitosane, de préférence tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, co-réticulé avec un autre biopolymère, et de préférence un hyaluronane, ledit procédé comprenant :
la mise en contact d'un mélange de carboxyalkyl et de l'autre biopolymère, et de préférence un hyaluronane, avec au moins un agent de réticulation, la mise en contact étant de préférence réalisée en phase alcaline ;
la réticulation du carboxyalkyl chitosane et de l'autre biopolymère, et de préférence un hyaluronane, par l'agent de réticulation ;
l'obtention d'une matrice co-réticulée de carboxyalkyl chitosane et de l'autre biopolymère, et de préférence un hyaluronane.

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

CN 107 325 306 A (IMEIK TECH DEVELOPMENT CO LTD) 7 novembre 2017 (2017-11-07)

CN 103 937 014 A (BEIJING AIMEIKE BIOTECHNOLOGY CO LTD)
23 juillet 2014 (2014-07-23)

YOUMING DENG ET AL: "Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration",
SCIENTIFIC REPORTS,
vol. 7, no. 1, 2 juin 2017 (2017-06-02),
XP55668120,
DOI: 10.1038/s41598-017-02962-z

DI MARIO F ET AL: "Chitin and chitosan from Basidiomycetes",
INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL,
vol. 43, no. 1,
1 juillet 2008 (2008-07-01), pages 8-12,
XP022705839,
ISSN: 0141-8130, DOI:
10.1016/J.IJBIOMAC.2007.10.005
[extrait le 2008-06-05]

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

NEANT

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

NEANT