(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 146 899***

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

(21) **N° d'enregistrement national :** **23 02635**

(51) Int Cl[8] : ***C 08 B 37/08*** *(2023.01), C 08 K 5/092, A 61 L 27/20, 2/07, A 61 P 23/02*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 21.03.23.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 27.09.24 Bulletin 24/39.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

( ) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *TEOXANE SA Société Anonyme* — CH.

(72) **Inventeur(s) :** BRUSINI Romain, VANTOU Camille, FAIVRE Jimmy et BOURDON François.

(73) **Titulaire(s) :** TEOXANE SA Société Anonyme.

(74) **Mandataire(s) :** REGIMBEAU.

(54) Procédé de préparation d'un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, non réticulé ou leur mélange.

(57) La divulgation concerne un procédé de préparation d'un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé, ou leur mélange, le procédé comprenant les étapes suivantes :

(1) préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange et comprenant en outre au moins 1 mM d'ions citrates ; et

(2) stérilisation, de préférence à la chaleur, de l'hydrogel comprenant au moins 1 mM d'ions citrates pour obtenir un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange.

FR 3 146 899 - A1

Description

Titre de l'invention : Procédé de préparation d'un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, non réticulé ou leur mélange

DOMAINE DE L'INVENTION

[0001] La présente invention concerne un procédé de préparation d'un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange, en particulier comprenant un acide hyaluronique réticulé, un acide hyaluronique non réticulé ou leur mélange.

ARRIERE PLAN TECHNOLOGIQUE

[0002] Les polysaccharides, tels que les glycosaminoglycanes, sont largement utilisés dans les domaines médical et esthétique, notamment pour le comblement des tissus mous. En particulier, la majorité des produits commercialisés pour des applications esthétiques sont à base d'acide hyaluronique. Pour améliorer la qualité de la peau, les hydrogels préparés à partir d'acide hyaluronique non modifié sont intéressants car ils présentent l'avantage d'être parfaitement biocompatibles.

[0003] Il est également possible d'utiliser des hydrogels à base d'acide hyaluronique modifié, l'acide hyaluronique étant habituellement modifié par réticulation. Cette réticulation présente l'avantage d'augmenter la durabilité *in vivo* et la résistance à la dégradation *in vivo* des hydrogels. Des hydrogels à base d'acide hyaluronique réticulé peuvent être obtenus par différents procédés de préparation.

[0004] Par ailleurs, les hydrogels à base d'acide hyaluronique réticulé et/ou non réticulé destinés au comblement des tissus mous doivent être stériles. Ainsi, les procédés de préparation des hydrogels à base d'acide hyaluronique réticulé et/ou non réticulé destinés à être injectés comprennent généralement une étape de stérilisation de l'hydrogel préalablement formé. La stérilisation est typiquement réalisée par la chaleur, par exemple en autoclave. Il a été observé que ces conditions de stérilisation ont tendance à dégrader l'acide hyaluronique réticulé et/ou non réticulé, entrainant des dégradations des propriétés rhéologiques des hydrogels.

[0005] Ainsi, un besoin demeure pour la mise à disposition d'un procédé de préparation d'hydrogels stériles comprenant un polysaccharide réticulé (ex. : acide hyaluronique réticulé) et/ou non réticulé (ex. : acide hyaluronique non réticulé) qui soit le plus respectueux possible des propriétés des hydrogels, c'est-à-dire qui entraine le moins de dégradations possibles des propriétés rhéologiques des hydrogels lors de la stérilisation, par exemple à la chaleur, ainsi que dans le temps.

BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

[0006] La présente invention porte sur un procédé de préparation d'un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé, ou leur mélange, le procédé comprenant les étapes suivantes :

[0007] (1) préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange et comprenant en outre au moins 1 mM d'ions citrates ; et

[0008] (2) stérilisation, de préférence à la chaleur, de l'hydrogel pour obtenir un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange.

[0009] L'invention porte également sur un hydrogel obtenu par le procédé de l'invention.

[0010] Enfin, l'invention porte sur l'utilisation des ions citrates pour protéger un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange, en particulier un acide hyaluronique réticulé, non réticulé ou leur mélange, et éventuellement un agent anesthésiant, de la dégradation de ses propriétés rhéologiques lors de sa stérilisation, de préférence par la chaleur et sur l'utilisation des ions citrates pour préserver la stabilité dans le temps des hydrogels comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange, en particulier un acide hyaluronique réticulé, non réticulé ou leur mélange, et éventuellement un agent anesthésiant.

[0011] D'autres aspects de l'invention sont tels que décrits ci-dessous et dans les revendications.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Définitions

[0012] Le terme « **gel** » désigne un réseau de polymères qui est dilaté dans tout son volume par un fluide. Cela signifie qu'un gel est formé de deux milieux, l'un « solide » et l'autre « liquide », dispersés l'un dans l'autre. Le milieu dit « solide » est constitué des longues molécules polymères connectées entre elles par des liaisons faibles (par exemple des liaisons hydrogène) ou par des liaisons covalentes (réticulation). Le milieu liquide est constitué d'un solvant. Un gel correspond généralement à un produit viscoélastique qui possède un angle de phase δ inférieur 90°, de préférence inférieur ou égal à 70°, de préférence inférieur ou égal à 45°, à 1Hz pour une déformation de 0,1% ou une pression de 1 Pa, de préférence un angle de phase δ allant de 2° à 45° ou allant de 20° à 45°.

[0013] Le terme « **hydrogel** » désigne un gel tel que défini ci-dessus dans lequel le solvant constituant le milieu liquide est majoritairement de l'eau (par exemple au moins 90%, en particulier au moins 95%, notamment au moins 97%, notamment au moins 98% en poids du milieu liquide) et présentant un pH allant de 6,8 à 7,8.

[0014] Le terme « **hydrogel injectable** » désigne un hydrogel qui peut s'écouler et être injecté manuellement au moyen d'une seringue munie d'une aiguille de diamètre allant de 0,1 à 0,5 mm, par exemple d'une aiguille hypodermique de 32 G, 30 G, 27 G, 26 G, 25 G. Préférentiellement, un « hydrogel injectable » est un hydrogel présentant une force d'extrusion moyenne inférieure ou égale à 25N, de préférence allant de 5 à 25 N, encore de préférence allant de 8 à 15 N, lors d'une mesure avec un dynamomètre, à une vitesse fixe d'environ 12,5 mm/min, dans des seringues de diamètre externe supérieur ou égal à 6,3 mm, avec une aiguille de diamètre externe inférieur ou égal à 0,4 mm (27 G) et de longueur ½ '', à température ambiante.

[0015] Une « **application superficielle** » désigne l'administration, par exemple par méso-thérapie, d'une composition superficiellement dans la peau, ou sur la peau, pour le traitement des couches superficielles de la peau, de l'épiderme et des parties les plus superficielles du derme, pour réduire les rides superficielles et/ou améliorer la qualité de la peau (telle que son éclat, sa densité ou sa structure) et/ou rajeunir la peau.

[0016] Une « **application médiane** » désigne l'administration d'une composition dans la partie médiane de la peau pour traiter les couches médianes de la peau, ainsi que pour réduire les rides médianes.

[0017] Une « **application profonde** » désigne l'administration d'un hydrogel dans les couches les plus profondes de la peau, l'hypoderme et la partie la plus profonde du derme, et/ou sous la peau (au-dessus du périoste) pour « apporter du volume », tels que pour le comblement des rides les plus profondes et/ou des régions partiellement atrophiées du contour du visage et/ou du corps. Les hydrogels dit « volumateur » peuvent typiquement être administrés pour une application profonde.

[0018] Un **« polysaccharide réticulé »** désigne un polysaccharide modifié au cours d'une réaction de réticulation.

[0019] A contrario, un **« polysaccharide non réticulé »** désigne un polysaccharide non modifié avec un agent réticulant et qui donc n'a pas subi de réaction de réticulation.

[0020] Le terme « **agent réticulant** » désigne tout composé capable d'introduire une réticulation entre différentes chaines de polysaccharide.

[0021] Le « **taux de réticulation molaire** » (TR), exprimé en %, désigne le rapport molaire de la quantité d'agent réticulant par rapport à la quantité d'unité de répétition du polysaccharide introduite dans le milieu réactionnel de réticulation exprimé pour 100 moles d'unités de répétition du polysaccharide dans le milieu de réticulation. Par exemple, un taux de réticulation molaire de 1% signifie qu'il y a une molécule d'agent réticulant introduite dans le milieu réactionnel pour 100 unités de répétition de polysaccharide.

[0022] L'expression « **unité de répétition** » d'un polysaccharide désigne un motif structurel constitué d'un ou plusieurs (généralement 1 ou 2) monosaccharides dont la répétition produit la chaîne de polysaccharide complète.

[0023] Le « **degré de modification** » (MOD) d'un polysaccharide, tel que l'acide hyaluronique, correspond à la quantité molaire d'agent réticulant liée au polysaccharide, par une ou plusieurs de ses extrémités, exprimée pour 100 moles d'unités de répétition du polysaccharide. Il peut être déterminé par des méthodes connues de l'homme du métier telle que la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Par exemple, un degré de modification de 1% signifie qu'il y a une molécule d'agent réticulant pour 100 unités de répétition de polysaccharide.

[0024] Le terme « **polysaccharide** » désigne un polymère composé de monosaccharides (préférentiellement des énantiomères D) joints entre eux par des liaisons glycosidiques.

[0025] Par « **température ambiante** », il est entendu une température allant de 20 à 25°C, plus particulièrement 21°C.

[0026] Le **domaine de viscoélasticité linéaire (Linear ViscoElastic Region ou LVER)** correspond à la gamme de déformations de l'hydrogel allant d'une valeur initiale de module élastique G' jusqu'à la valeur du module élastique G' diminué de 10% de sa valeur initiale. La mesure du LVER consiste en une mesure de balayage à contrainte oscillatoire en mode compression à une fréquence d'oscillation donnée pour déterminer la région viscoélastique linéaire.

Procédé

[0027] De manière inattendue, les inventeurs ont découvert que l'addition d'ions citrates lors de la préparation des hydrogels comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, en particulier un acide hyaluronique réticulé et/ou non réticulé, permet de protéger efficacement l'hydrogel d'une dégradation de ses propriétés rhéologiques lors de la stérilisation, en particulier lors de la stérilisation par la chaleur. Les hydrogels obtenus par le procédé de la présente invention présentent ainsi des modifications moindres de leurs propriétés rhéologiques par rapport à des hydrogels préparés par un procédé équivalent sans addition d'ions citrates. Les hydrogels obtenus par le procédé de la présente invention présentent également une meilleure conservation de leurs propriétés rhéologiques dans le temps.

[0028] La présente invention porte ainsi sur un procédé de préparation d'un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, le procédé comprenant les étapes suivantes :

[0029] (1) préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé et comprenant en outre au moins 1 mM d'ions citrate ; et

[0030] (2) stérilisation, de préférence à la chaleur, de l'hydrogel pour obtenir un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé.

[0031] L'hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé et comprenant en outre au moins 1 mM d'ions citrate selon l'étape (1) peut être préparé selon deux méthodes alternatives :

[0032] - méthode 1 : en ajoutant les ions citrates sous forme de poudre ou sous forme d'une solution lors de la préparation d'un hydrogel à partir d'un polysaccharide préalablement réticulé et/ou non réticulé ; ou

[0033] - méthode 2 : lorsque l'hydrogel comprend un polysaccharide réticulé, en conduisant la réticulation du polysaccharide dans un milieu réactionnel comprenant des ions citrates puis en préparant l'hydrogel à partir du polysaccharide réticulé obtenu.

Méthode 1

[0034] Lorsque le procédé de la présente invention met en œuvre la méthode 1, l'étape (1) de préparation de l'hydrogel comprend une étape d'addition, au polysaccharide réticulé ou au polysaccharide non réticulé ou à leur mélange, d'une solution comprenant des ions citrates en une quantité suffisante pour atteindre une concentration en ions citrates d'au moins 1 mM dans l'hydrogel.

[0035] Dans une variante, lorsque le procédé de la présente invention met en œuvre la méthode 1, l'étape (1) de préparation d'un hydrogel comprend une étape d'addition, au polysaccharide réticulé ou au polysaccharide non réticulé ou à leur mélange, d'ions citrates sous forme de poudre en une quantité suffisante pour atteindre une concentration en ions citrates d'au moins 1 mM dans l'hydrogel.

[0036] Dans certains modes de réalisation, la préparation de l'hydrogel comprend l'addition d'ions citrates sous forme de poudre et sous forme d'une solution, de préférence la poudre et la solution étant ajoutées à des étapes différentes de la préparation de l'hydrogel.

Le polysaccharide réticulé et/ou non réticulé

[0037] Le polysaccharide peut être tout polymère composé de monosaccharides joints entre eux par des liaisons glycosidiques ou leurs mélanges. De préférence, le polysaccharide est choisi parmi la pectine et les substances pectiques; le chitosan; la chitine; la cellulose et ses dérivés; l'agarose; les glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique, l'héparosane, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, la chondroïtine et la chondroïtine sulfate; et leurs mélanges. De manière encore plus préférée, le polysaccharide est choisi parmi l'acide hyaluronique, l'héparosane, la chondroïtine et leurs mélanges, encore plus préférentiellement le polysaccharide est l'acide hyaluronique ou un de ses sels, en particulier un sel physiologiquement acceptable tel que le sel de sodium, le sel de potassium, le sel de zinc, le sel de calcium, le sel de magnésium, le sel d'argent, le sel de calcium et les mélanges de ceux-ci. Plus particulièrement, l'acide hyaluronique est sous sa forme acide ou sous forme de sel de sodium (NaHA). L'hydrogel peut ainsi être un hydrogel à base d'acide hyaluronique et/ou d'un de ses sels.

[0038] De préférence, si le polysaccharide est l'acide hyaluronique ou un de ses sels, il a une

masse moléculaire moyenne en poids (Mw) allant de 0,05 à 10 MDa, préférentiellement allant de 0,5 à 5 MDa, par exemple allant de 2 à 4 MDa ou allant de 1 à 5 MDa.

[0039] Le polysaccharide peut être fourni sous forme hydratée (totalement ou partiellement hydratée), ou sous forme sèche, telle que sous forme de poudre ou de fibres. Lorsque le polysaccharide est fourni sous forme hydratée, il se présente typiquement sous forme de gel.

[0040] Un polysaccharide réticulé peut être préparé par toute méthode connue de l'homme du métier. Par exemple, le polysaccharide réticulé peut être préparé tel que décrit dans WO2010131175A1 et WO201277054A1.

[0041] Le procédé de la présente invention peut ainsi comprendre, avant l'étape de préparation de l'hydrogel, une étape de préparation d'un polysaccharide réticulé.

[0042] Le polysaccharide réticulé est de préférence un polysaccharide réticulé dont le taux de réticulation molaire est inférieur ou égal à 10%. Préférentiellement, le polysaccharide réticulé est un polysaccharide réticulé dont le taux de réticulation molaire est supérieur à 0 et inférieur ou égal à 6%. Encore plus préférentiellement, le polysaccharide réticulé est un polysaccharide réticulé dont le taux de réticulation molaire est supérieur à 0 et inférieur ou égal à 4%. De manière encore plus préférée, le polysaccharide réticulé est un polysaccharide réticulé dont le taux de réticulation molaire est supérieur à 0 et inférieur ou égal à 2%, de préférence inférieur ou égal à 1%, encore préférentiellement inférieur ou égal à 0,8%, notamment allant de 0,1% à 0,5% (nombre de moles d'agent(s) réticulant pour 100 moles d'unité de répétition du ou des polysaccharides).

[0043] Le polysaccharide peut être réticulé par réaction d'un polysaccharide ayant été au préalable modifié. Le polysaccharide peut avoir été modifié par greffage au moyen d'une molécule permettant la réticulation ultérieure du polysaccharide ainsi modifié. Par exemple, le polysaccharide peut avoir été modifié par greffage d'une molécule silylée, d'un acide aminé, d'un dérivé d'acide aminé ou d'une protéine.

[0044] Le polysaccharide est de préférence réticulé au moyen d'un agent réticulant choisi parmi les agents réticulant bi- ou multi-fonctionnels époxydiques ou non époxydiques, c'est-à-dire préparé par réaction du polysaccharide avec un agent réticulant. Parmi les agents époxydiques peuvent être cités le 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE), le 1,2,7,8-diépoxy-octane, le 1,2-bis(2,3-époxypropyl)-2,3-éthane (EGDGE), le poly(éthylèneglycol)-diglycidyl éther (PEGDE), et leurs mélanges. Parmi les agents non époxydiques peuvent être cités les polyamines endogènes telles que la spermine, la spermidine et la putrescine, les aldéhydes tel que le glutaraldéhyde, les carbodiimides et la divinylsulfone, les dérivés d'hydrazide tel que l'adipic acid dihydrazide, les bisalkoxyamine, les dithiol tel que le polyéthylene glycol dithiol et leurs mélanges. Parmi

les agents non époxydiques peuvent être cités les acides aminés tels que la cystéine, la lysine ; des peptides ou protéines contenant des acides aminés tels que la cystéine, la lysine ; le poly(diméthylsiloxane); des trimétaphosphates, comme par exemple le trimétaphosphate de sodium, le trimétaphosphate de calcium, ou encore le trimétaphosphate de barium.

[0045] Dans certains modes de réalisation, l'agent réticulant est un agent époxydique, de préférence le 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) ou le polyéthylèneglycol-diglycidyl éther. Préférentiellement l'agent réticulant est le 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE).

[0046] Dans certains modes de réalisation, l'agent réticulant est un agent non époxydique, de préférence choisi parmi les polyamines endogènes, les aldéhydes, les carbodiimides, la divinylsulfone, les acides aminés, les peptides et leurs mélanges.

[0047] Le polysaccharide réticulé est de préférence un polysaccharide réticulé présentant un degré de modification (MOD) inférieur ou égal à 10%, de préférence inférieur ou égal à 6%, de préférence inférieur ou égal à 4%, de manière préférée inférieur ou égal à 2%, de manière plus préférée inférieur ou égal à 1%. Avantageusement, le polysaccharide réticulé est un polysaccharide réticulé présentant un degré de modification (MOD) inférieur ou égal à 1,8%, de manière plus préférée inférieur ou égal à 1,5%, préférentiellement inférieur ou égal à 1,2%, encore plus préférentiellement inférieur à 1%.

[0048] Le polysaccharide réticulé peut en particulier être préparé par un procédé comprenant les étapes suivantes :

[0049] (a1) préparer un milieu réactionnel de réticulation comprenant un ou plusieurs polysaccharide(s), un ou plusieurs agent(s) réticulant et un solvant ; et

[0050] (a2) faire réagir le milieu réactionnel pour obtenir un polysaccharide réticulé.

[0051] Le polysaccharide est tel que décrit ci-dessus.

[0052] Dans l'étape (a1), le polysaccharide peut être fourni sous forme sèche telle que sous forme de poudre ou de fibres. Lorsque le polysaccharide est fourni sous forme hydratée, il se trouve sous forme d'un gel non réticulé ou d'une solution. En particulier, lorsque le polysaccharide est sous forme hydratée, il s'agit d'un gel non réticulé aqueux ou d'une solution aqueuse. Plus particulièrement, le polysaccharide est mélangé à de l'eau, éventuellement additionnée d'un milieu alcalin adapté pour la réticulation ou d'un tampon phosphate ou d'un tampon phosphate supplémenté, c'est-à-dire comprenant possiblement des composants additionnels tels que définis ci-dessus.

[0053] L'agent réticulant est tel que décrit ci-dessus.

[0054] Le solvant est typiquement de l'eau ou un mélange comprenant de l'eau et un solvant organique (typiquement un mélange comprenant au moins 90% en poids d'eau, ou au moins 95% ou au moins 99% en poids d'eau par rapport au poids total du solvant). Par

exemple, un solvant organique tel qu'un alcool, en particulier l'éthanol, ou le DMSO, peut être utilisé pour solubiliser l'agent réticulant, par exemple lorsqu'il s'agit du poly(diméthylsiloxane) terminé à chaque extrémité par un diglycidyl éther (numéro CAS : 130167-23-6), avant son addition au milieu réactionnel aqueux.

[0055] Le milieu réactionnel peut en outre comprendre des sels, des ajusteurs de pH, par exemple une base de Bronsted, plus préférentiellement un sel d'hydroxyde, tel que l'hydroxyde de sodium ou de potassium, des composants additionnels tels que décrits ci-dessus et leurs mélanges. L'addition d'une base de Bronsted peut être tout particulièrement nécessaire lorsque les groupements fonctionnels de l'agent réticulant présentent un groupement époxyde ou un groupement vinyle. Dans ces cas, la réticulation a lieu à un pH supérieur ou égal à 10, plus avantageusement supérieur ou égal à 12, ce qui requiert l'addition d'une base de Bronsted au milieu réactionnel, typiquement à une concentration comprise entre 0,10M et 0,30M.

[0056] La quantité totale d'agent réticulant dans le milieu réactionnel varie typiquement de 0,001 à 0,10 moles pour 1 mole d'unité de répétition du polysaccharide, de préférence de 0,001 à 0,08 ou de 0,001 à 0,06 pour 1 mole d'unité de répétition du polysaccharide, préférentiellement de 0,001 à 0,04 pour 1 mole d'unité de répétition du polysaccharide, de manière préférée de 0,001 à 0,03 pour 1 mole d'unité de répétition du polysaccharide, de manière préférée 0,001 à 0,02 moles pour 1 mole d'unité de répétition du polysaccharide, de manière plus préférée de 0,001 à 0,01 moles pour 1 mole d'unité de répétition du polysaccharide, de manière encore plus préférée de 0,001 à 0,005 pour 1 mole d'unité de répétition du polysaccharide. Lorsque le polysaccharide est un glycosaminoglycane tel qu'un acide hyaluronique, l'unité de répétition est une unité disaccharidique.

[0057] La concentration massique en polysaccharide ou en sel de polysaccharide dans le milieu réactionnel varie avantageusement de 50 à 300 mg/g de solvant, de préférence de 80 à 200 mg/g.

[0058] L'étape (a1) comprend typiquement une étape d'homogénéisation du milieu réactionnel. L'homogénéisation est généralement réalisée par agitation tridimensionnelle, agitation avec un mélangeur, agitation avec pales ou agitation à la spatule.

[0059] L'étape (a1) est typiquement réalisée à une température allant de 4 à 35°C, de préférence 15°C à 25°C. De préférence, la durée de l'étape (1) n'excède pas 5 heures. Elle varie généralement de 15 minutes à 4 heures, de préférence de 30 min à 2 heures.

[0060] L'étape (a2) consiste à faire réagir le milieu réactionnel pour obtenir un polysaccharide réticulé. Avantageusement, l'étape (a2) est réalisée directement après l'étape (a1).

[0061] Cette étape permet de réticuler les chaines polysaccharidiques entre elles. Les groupes fonctionnels de l'agent réticulant réagissent avec des groupements fonc-

tionnels présents sur les polysaccharides de sorte à lier les chaines polysaccharidiques entre elles et à les réticuler en formant des liaisons intermoléculaires. L'agent réticulant peut également réagir avec des groupements fonctionnels présents sur une même molécule de polysaccharide de sorte à former des liaisons intramoléculaires. Notamment, les groupements fonctionnels de l'agent réticulant réagissent avec les groupes -OH ou -COOH, ou encore -CHO, présents sur les polysaccharides tels que l'acide hyaluronique. Des polysaccharides réticulés comprenant au moins un lien de réticulation entre deux chaines polysaccharidiques, ledit lien de réticulation étant le résidu de l'agent réticulant, sont ainsi obtenus.

[0062] La réticulation peut être réalisée en présence de plusieurs agents réticulant. Lorsque la réticulation est réalisée en présence de plusieurs agents réticulant, les agents réticulant peuvent être ajoutés de manière simultanée ou séparée dans le temps au milieu réactionnel. L'étape (a2) peut ainsi comprendre des étapes de réticulation répétées, avantageusement l'étape (a2) comprend une seule étape de réticulation. La réticulation est alors réalisée en présence d'une quantité totale d'agents réticulant allant typiquement de 0,1 à 10 moles, ou de 0,1 à 8 moles, ou de 0,1 à 6 moles, ou de 0,1 à 4 moles, ou de 0,1 à 3 moles, ou de 0,1 à 2 moles ou de 0,1 à 1 mole ou de 0,1 à 0,8 moles, ou de 0,1 à 0,5 moles d'agents réticulant (ou leurs sels) pour 100 moles d'unité de répétition du polysaccharide. Les conditions de réticulation, en particulier les teneurs en agent réticulant, durée et températures ainsi que les masses moléculaires moyennes en poids (Mw) du polysaccharide, utilisées sont interdépendantes.

[0063] Plus la teneur en agent réticulant est faible, plus la durée de réaction doit être longue pour obtenir des propriétés mécaniques analogues du polysaccharide réticulé résultant, et *in fine* de l'hydrogel préparé. Autrement dit, plus le pourcentage molaire en agent réticulant est faible, moins il y a de fonctions réactives dans le milieu réactionnel et plus la probabilité que 2 groupes se rencontrent et réagissent ensemble est faible, ainsi plus la durée de réaction doit être longue pour permettre aux fonctions de réagir entre elles et former des liens de réticulation, et ainsi obtenir un polysaccharide réticulé, et *in fine* un hydrogel avec des propriétés souhaitables.

[0064] Dans certains modes de réalisation, l'étape (a2) peut être réalisée en plaçant le milieu réactionnel directement obtenu à l'issue de l'étape (a1), à une température inférieure ou égale à 30°C, de préférence inférieure ou égale à 25°C. La température est typiquement supérieure à 0°C ou supérieure à 5°C ou encore supérieure à 10°C. De manière encore plus préférée, l'étape (a2) peut être réalisée en plaçant le milieu réactionnel directement obtenu à l'issue de l'étape (a1) à une température égale à la température ambiante. Lorsque l'étape (a2) est réalisée à une température supérieure ou égale à 0°C et inférieure ou égale à 30°C, la durée de réticulation est d'au moins 1 minute, de préférence d'au moins 10 minutes, de manière encore plus préférée d'au

moins 1 heure. De préférence, la durée de réticulation est d'au plus 5 jours.

[0065] Dans certains modes de réalisation, l'étape (a2) peut être réalisée en plaçant le milieu réactionnel obtenu à l'issue de l'étape (a1), à une température supérieure à 30°C, ou supérieure ou égale à 35°C, ou supérieure ou égale à 40°C, ou supérieure ou égale à 45°C, ou supérieure ou égale à 50°C. La température est typiquement inférieure à 60°C. Lorsque la température est supérieure à 30°C, la durée de l'étape de réticulation est au moins supérieure ou égale à 1 minute, de préférence au moins supérieure ou égale à 10 minutes, de manière encore plus préférée au moins 1 heure, de préférence comprise entre 1 heure et 5 heures.

[0066] Dans certains modes de réalisation, l'étape (a2) peut être réalisée en plaçant le milieu réactionnel directement obtenu à l'issue de l'étape (a1), à une pression P inférieure ou égale à la pression atmosphérique et à une température T supérieure à la température du point eutectique du milieu réactionnel telle que mesurée à la pression P et inférieure à la température du point de congélation du milieu réactionnel telle que mesurée à la pression P, de préférence pendant une durée d'au moins 1 heure. Les hydrogels à base de polysaccharide réticulé préparés par un tel procédé sont hautement biocompatibles. En effet, les polysaccharides réticulés peuvent être préparés avec des quantités moindres d'agent réticulant, par exemples des quantités allant de 0,001 à 0,02 moles pour 1 moles d'unité de répétition du polysaccharide.

[0067] La température du point de congélation du milieu réactionnel désigne la température à laquelle le mélange des composants du milieu réactionnel, à l'échelle macroscopique, se solidifie, c'est-à-dire qu'il devient non fluide. En dessous du point de congélation, le mélange est dans un état de congélation qui se caractérise par la coexistence de composants sous forme solide et liquide. L'état de congélation est maintenu jusqu'à la température du point eutectique du milieu réactionnel.

[0068] La température du point eutectique du milieu réactionnel désigne la température en dessous de laquelle le mélange des composants du milieu réactionnel passe d'un état congelé (coexistence de phases liquides et solides) à un état complètement solide, c'est-à-dire un état dans lequel tous les composants du mélange sont sous forme solide. Le point de congélation et le point eutectique d'un mélange dépendent de la pression à laquelle le mélange est soumis donc le point de congélation et le point eutectique sont mesurés à la pression P.

[0069] Le point de congélation et le point eutectique peuvent être déterminés par calorimétrie différentielle à balayage. Cette méthode permet de déterminer les transitions de phase. Pour cela, le produit à étudier est progressivement refroidi jusqu'à observer ses transitions de phases.

[0070] La température T est de préférence supérieure ou égale à -55°C et inférieure ou égale à -5°C, de préférence elle va de -35°C à -10°C. De manière encore plus préférée, la

température T est d'environ -20°C.

[0071] La pression P est de préférence, la pression atmosphérique. La « pression atmosphérique » est la pression qu'exerce l'air constituant l'atmosphère sur une surface quelconque en contact avec elle. Elle varie en fonction de l'altitude. A une altitude de 0m, la pression moyenne atmosphérique est de 101 325 Pa. De préférence, la pression P est la pression atmosphérique et la température T est supérieure ou égale à -55°C et inférieure ou égale à -5°C, de préférence T varie de -35°C à -10°C ou est d'environ -20°C.

[0072] De préférence, lors de l'étape (a2) de réticulation, lorsque la température T est supérieure ou égale à -55°C et inférieure ou égale à -5°C le milieu réactionnel obtenu à l'issue de l'étape (1) est placé pendant une durée d'au moins 1 heure, de préférence d'au moins 3 heures, de préférence d'au moins 72 heures, de préférence d'au plus 27 semaines. De préférence, l'étape (a2) de réticulation est conduite pendant une durée allant de 2 à 25 semaines, de préférence allant de 2 à 20 semaines ou 2 à 17 semaines, de manière encore plus préférée de 3 à 8 semaines ou 4 à 7 semaines et à la température T, à la pression P.

[0073] A l'issue de l'étape (a2), le polysaccharide réticulé se présente typiquement sous forme d'un gel. Ce gel est généralement directement engagé dans la suite du procédé de l'invention (étape 1).

[0074] Les polysaccharides réticulés et/non réticulés décrits précédemment sont utiles pour la mise en œuvre du procédé de l'invention et ainsi préparer des hydrogels comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé. Le polysaccharide réticulé, ou non réticulé, ou leur mélange, va constituer le réseau de polymères de l'hydrogel. L'hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, ou non réticulé, ou leur mélange peut ainsi être dit être à base d'un polysaccharide réticulé, ou d'un polysaccharide non réticulé, ou de leur mélange. Un hydrogel comprenant, comme seul polysaccharide, un polysaccharide non réticulé, est préparé à partir d'un polysaccharide non réticulé. Un hydrogel comprenant, comme seul polysaccharide, un polysaccharide réticulé, est préparé à partir d'un polysaccharide réticulé. Lorsque l'hydrogel comprend le mélange d'un polysaccharide réticulé et non réticulé, l'hydrogel est préparé à partir d'un polysaccharide réticulé et d'un polysaccharide non réticulé. Le polysaccharide non réticulé est typiquement ajouté au polysaccharide réticulé au cours de la préparation de l'hydrogel.

Préparation de l'hydrogel (étape (1))

[0075] Le procédé de la présente invention selon la méthode 1 comprend la préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange et comprenant en outre au moins 1 mM d'ions citrates, de préférence de 1 à 12 mM d'ions citrates.

[0076] La préparation de l'hydrogel comprend au moins une étape d'addition d'ions citrates au polysaccharide réticulé et/ou non réticulé. La quantité d'ions citrates ajoutée à cette étape permet d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel préparé d'au moins 1 mM, de préférence allant de 1 à 12 mM.

[0077] La préparation de l'hydrogel comprend avantageusement une étape d'ajustement au pH physiologique, notamment entre 6,8 et 7,8.

[0078] Dans une variante, les ions citrates sont ajoutés sous forme de poudre au polysaccharide réticulé et/ou non réticulé. La quantité d'ions citrates sous forme de poudre ajoutée à cette étape permet d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel préparé d'au moins 1 mM, de préférence allant de 1 à 12 mM. Typiquement lorsque l'ajout d'ions citrates sous forme de poudre est réalisé, une neutralisation de l'effet des ions citrates sur le pH de l'hydrogel peut être réalisée.

[0079] Dans une autre variante, les ions citrates sont ajoutés sous forme d'une solution (solution comprenant des ions citrates) au polysaccharide réticulé et/ou non réticulé. La quantité de la solution comprenant des ions citrates ajoutée à cette étape permet d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel préparé d'au moins 1 mM. De préférence, la concentration en ions citrates dans l'hydrogel varie de 1 à 12 mM.

[0080] Dans certains modes de réalisation, la quantité d'ions citrates ajoutée (sous forme d'une solution ou de poudre) permet d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel d'au moins 1,5 mM, ou d'au moins 2 mM, ou d'au moins 2,5 mM, ou d'au moins 3 mM ou d'au moins 3,5 mM. La concentration maximale d'ions citrates dans l'hydrogel est généralement de 12 mM.

[0081] Dans certains modes de réalisation, la quantité d'ions citrates ajoutée (sous forme d'une solution ou de poudre) permet d'atteindre une concentration en ions citrate dans l'hydrogel allant de 2 à 12 mM, ou de 3 à 11 mM, ou de 3 à 9 mM, ou de 3 à 8 mM ou de 4 à 8 mM ou de 3 à 5 mM.

[0082] Dans certains modes de réalisation, la quantité d'ions citrates ajoutée (sous forme d'une solution ou de poudre) permet d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel allant de 5 à 12 mM.

[0083] Une solution comprenant des ions citrates désigne une solution dont le pH permet aux ions citrates d'être présents en solution dans cette solution ou désigne une solution capable de libérer des ions citrates une fois ajoutée lors de la préparation de l'hydrogel. La solution comprenant des ions citrates est de préférence préparée à partir d'acide citrique.

[0084] La solution comprenant des ions citrates ajoutée présente typiquement un pH allant de 6,8 à 7,8 (pH physiologique). Si la solution ne présente pas un tel pH, le pH est ajusté, au besoin, au cours de la préparation de l'hydrogel pour que l'hydrogel final

présente un tel pH.

[0085] La concentration en ions citrates de la solution est choisie de manière à limiter l'effet de dilution pouvant être engendré par l'ajout de la solution lors de la préparation de l'hydrogel, un tel effet de dilution de l'hydrogel n'étant pas souhaitable. La concentration maximale en ions citrates qu'il est possible de rajouter dans l'hydrogel est alors limitée par l'ajustement du pH. En effet l'ajustement du pH de la solution pour atteindre un pH physiologique est moins aisé au-delà d'une certaine concentration en ions citrate. La solution comprenant des ions citrates est typiquement préparée de sorte à ce que la solution soit concentrée en ions citrates, par exemple 100 fois plus concentrée par rapport à la concentration finale en ions citrates dans l'hydrogel.

[0086] La solution comprenant des ions citrates est typiquement préparée dans de l'eau ou dans un tampon physiologiquement acceptable, de préférence par addition d'acide citrique dans de l'eau ou un tampon physiologiquement acceptable. Des exemples de tampons incluent, de manière non limitative, le N-carbamoylméthyl taurine (CAS No: 7365-82-4), le sel de sodium d'acide 3-[N,N-bis(hydroxyéthyl)amino]-2-hydroxypropane sulfonique (CAS No: 102783-62-0), l'acide 3-morpholino-2-hydroxypropane sulfonique (CAS No: 68399-77-9), l'acide 1,4-piperazinediéthane sulfonique (CAS No: 5625-37-6), l'acide 1,4-piperazine-N,N'-bispropane sulfonique) (CAS No: 5625-56-9), l'acide 2-hydroxy-3-[tris(hydroxyméthyl)méthylamino]-1-propane sulfonique (CAS No: 68399-81-5), l'acide 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl)amino]éthane sulfonique (CAS No: 7365-44-8), le N-tris(hydroxyméthyl)méthylglycine (CAS No: 5704-04-1), l'acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique (CAS No: 1132-61-2), le tris(hydroxymethyl)aminométhane (CAS No: 77-86-1), le bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxyméthyl)méthane (CAS No: 6976-37-0), le N,N-bis(2-hydroxyethyl)taurine (CAS No: 10191-18-1), le 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (CAS No: 7365-45-9), l'acide 1,4-Piperazinediethane sulfonique (CAS No: 5625-37-6), l'acide 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-(2-hydroxypropane-3-sulfonique) (CAS No: 68399-78-0), les tampons phosphates tels que le PBS avec un pH autour du pH physiologique (CAS No: 7647-14-5, 7447-40-7).

[0087] De préférence, le tampon est choisi parmi l'acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique (CAS No: 1132-61-2), le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (CAS No: 77-86-1), le bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxyméthyl)méthane (CAS No: 6976-37-0), le N,N-bis(2-hydroxyéthyl)taurine (CAS No: 10191-18-1), l'acide 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-éthane sulfonique (CAS No: 7365-45-9) et les tampons phosphates tels que le PBS avec un pH autour du pH physiologique (CAS No: 7647-14-5, 7447-40-7).

[0088] Préférentiellement le tampon est un tampon phosphate, particulièrement un tampon de solution saline de NaH_2PO_4/Na_2HPO_4ou de KH_2PO_4/K_2HPO_4. Le pH de la solution comprenant des ions citrates est typiquement ajusté au moyen d'addition d'acide ou de base.

[0089] Ainsi, dans certains modes de réalisation, la solution comprenant des ions citrates est une solution d'acide citrique dans un tampon phosphate, dont le pH varie de 6,8 à 7,8.

[0090] Dans des modes de réalisation préférés, les ions citrates sont ajoutés sous forme d'une solution comprenant des ions citrates, la solution pouvant être telle que décrite ci-dessus. De préférence, la solution est une solution d'acide citrique. La solution est de manière préférée une solution d'acide citrique dans un tampon physiologiquement acceptable, tel qu'un tampon phosphate.

[0091] La préparation d'un hydrogel à partir d'un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé peut être réalisée de manière conventionnelle, à la différence près que des ions citrates sont ajoutés lors de la préparation de l'hydrogel. Ainsi, la préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé peut comprendre une ou plusieurs des étapes conventionnelles suivantes :

- Ajustement du pH (1);
- Dilution (2);
- Purification (3);
- Addition d'au moins un composant additionnel (4);
- Homogénéisation (5).

[0092] Ces étapes bien connues de l'homme du métier peuvent être telles que décrites ci-après.

[0093] Ces étapes bien connues de l'homme du métier peuvent être telles que décrites ci-après. Les étapes conventionnelles peuvent être réalisées de manière concomitante. Les étapes conventionnelles peuvent être réalisées de la manière séquentielle suivante : éventuel ajustement du pH (1) puis éventuelle dilution (2) puis éventuelle purification (3) puis éventuelle addition d'un composant additionnel (4) puis éventuelle homogénéisation (5). Elles peuvent être également réalisées dans un ordre différent. Avantageusement, l'étape d'homogénéisation (5) est réalisée en dernier lieu, lorsqu'au moins une des autres étapes conventionnelles est mise en œuvre. Elle peut aussi être effectuée à plusieurs reprises et s'intercaler entre les autres étapes conventionnelles décrites.

[0094] Par exemple, étapes conventionnelles peuvent être réalisées de la manière séquentielle suivante : (1), (2), (3), (4), (5); ou (2), (1), (3), (4), (5) ; ou (2) (1), (4), (5) ; ou (2), (4), (5) ; ou (1), (4), (5); ou (2), (4), (3), (5) ; ou (2), (4), (1), (5) ; ou (2), (4), (5) ; ou (4), (2), (1) ; ou (4), (1), (2); ou (2), (3), (4), (5);ou (4), (2), (3), (5); ou (2), (4), (1) ; ou (1), (5), (3), (4); ou (1), (5), (4); ou (2), (4). Les étapes (2), (3), (4) et (5) peuvent être concomitantes. Par exemple, la préparation de l'hydrogel, peut

comprendre la séquence suivante : (2) et (4) sont réalisées de manière concomitante.

[0095] Les ions citrates (sous forme de poudre ou en solution) peuvent être ajoutés au moment de, avant ou après l'une de ces étapes conventionnelles.

[0096] Dans une variante, les ions citrates sont ajoutés avant l'étape d'homogénéisation (5) de façon à obtenir un gel homogène.

[0097] Lorsqu'une étape de purification (3) est mise en œuvre, les ions citrates peuvent être ajoutés avant ou après l'étape de purification (3), avantageusement les ions citrates sont ajoutés après l'étape de purification (3). L'addition des ions citrates après l'étape de purification assure un meilleur contrôle de la concentration en ions citrates dans l'hydrogel préparé.

[0098] De préférence, les ions citrates sont ajoutés entre les étapes de purification (3) et d'homogénéisation (5).

[0099] L'addition des ions citrates peut être réalisée après l'étape de dilution (2) ou lors de l'étape de dilution (2), par exemple les ions citrates peuvent être ajoutés dans le solvant aqueux de dilution.

[0100] De préférence, les ions citrates sont ajoutés lors de l'étape de dilution (2) et/ou lors de l'étape d'addition d'au moins d'un composant additionnel (4), préférentiellement lors de l'étape d'addition d'au moins d'un composant additionnel (4). En particulier, dans certains modes de réalisation, l'addition de la solution comprenant des ions citrates est concomitante à l'étape d'addition d'au moins un composant additionnel (4). En particulier, dans certains modes de réalisation, l'addition de la solution comprenant des ions citrates est concomitante à l'addition d'une solution d'anesthésiant. En particulier, dans certains modes de réalisation, l'addition de la solution comprenant des ions citrates est concomitante à l'addition d'un agent lubrifiant. Dans certains modes de réalisation, la solution comprenant des ions citrates ajoutée peut comprendre d'autres composants, en particulier un agent lubrifiant, par exemple de l'acide hyaluronique non réticulé, de l'héparosan non réticulé ou leur mélange.

[0101] Les étapes de dilution (2), d'addition d'au moins d'un composant additionnel (4) et d'addition des ions citrates peuvent être concomitantes.

[0102] Les ions citrates peuvent être ajoutés après l'étape de d'ajustement du pH (1). Les ions citrates peuvent être ajoutés entre les étapes de d'ajustement du pH (1) et d'homogénéisation (5) lorsque ces deux étapes sont mises en œuvre.

Ajustement du pH (1)

[0103] Le procédé de préparation de l'hydrogel peut comprendre une étape d'ajustement du pH de l'hydrogel pour atteindre le pH désiré (pH de 6,8-7,8).

Dilution (2)

[0104] Le procédé de préparation de l'hydrogel peut comprendre une étape de dilution du

polysaccharide réticulé et/ou non réticulé. L'étape de dilution permet d'adapter la concentration en polysaccharide dans l'hydrogel préparé. En particulier, un solvant aqueux est ajouté au polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, par exemple, une solution saline physiologique, possiblement tamponnée par la présence de sels, tels que des sels phosphates. Plus particulièrement, le solvant aqueux ajouté a un pH autour du pH physiologique (6,8-7,8). La concentration en polysaccharide obtenue suite à l'étape de dilution varie avantageusement de 1 mg/g à 50 mg/g d'hydrogel, plus avantageusement de 5 mg/g à 35 mg/g d'hydrogel, encore plus avantageusement de 10 mg/g à 30 mg/g d'hydrogel.

Purification (3)

[0105] Le procédé de préparation de l'hydrogel peut comprendre au moins une étape de purification.

[0106] L'étape de purification vise à éliminer les éventuelles impuretés indésirables. Ces impuretés peuvent résulter de la réticulation du polysaccharide, par exemple résultant de l'étape (a2) décrite ci-avant. De telles impuretés peuvent comprendre par exemple l'agent de réticulation résiduel, en particulier de type époxydique, qui n'aurait pas réagi.

[0107] Cette étape peut également permettre d'effectuer un échange de liquide, par exemple un échange de tampon. L'étape de purification peut donc tout particulièrement être mise en œuvre lorsque l'hydrogel comprend un polysaccharide réticulé.

[0108] La purification peut être réalisée par dialyse ou encore par filtration, par exemple par filtration tangentielle dynamique (« DCF » pour Dynamic Cross-flow Filtration).

Addition de composants additionnels (4)

[0109] Le procédé de préparation de l'hydrogel peut comprendre une ou plusieurs étapes d'ajout d'au moins un composant additionnel. Le composant additionnel peut être choisi parmi les agents anesthésiants, les antioxydants, les agents lubrifiants, les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les minéraux, les acides nucléiques, les nucléotides, les nucléosides, les co-enzymes, les dérivés adrénergiques, le dihydrogénophosphate de sodium mono-hydraté et/ou di-hydraté, le chlorure de sodium et un de leurs mélanges.

[0110] Les polysaccharides non réticulés, en particulier l'acide hyaluronique non réticulé, l'héparosan non réticulé ou leur mélange, peuvent être cités à titre d'exemple d'agent lubrifiant.

[0111] Des exemples d'anesthésiants incluent de manière non limitative l'Ambucaïne, l'Amoxécaïne, l'Amyléine, l'Aprindine, l'Aptocaïne, l'Articaïne, la Benzocaïne, la Bétoxycaïne, la Bupivacaïne, la Butacaïne, le Butamben, la Butanilicaïne, le Chlorobutanol, la Chloroprocaïne, la Cinchocaïne, la Clodacaïne, la Cocaïne, la Cryo-

fluorane, la Cyclométhycaïne, la Dexivacaïne, la Diamocaïne, le Dipérodon, la Dyclonine, l'Etidocaïne, l'Euprocine, la Fébuvérine, la Fomocaïne, le Guafécaïnol, l'Heptacaïne, l'Hexylcaïne, l'Hydroxyprocaïne, l'Hydroxytétracaïne, l'Isobutamben, la Leucinocaïne, la Lévobupivacaïne, le Lévoxadrol, le Lidamidine, la Lidocaïne, la Lotucaïne, le Menglytate, la Mépivacaïne, la Méprylcaïne, la Myrtécaïne, l'Octacaïne, l'Octodrine, l'Oxétacaïne, l'Oxybuprocaïne, la Paréthoxycaïne, la Paridocaïne, la Phénacaïne, la Pipérocaïne, la Piridocaïne, le Polidocanol, la Pramocaïne, la Prilocaïne, la Procaïne, la Propanocaïne, la Propipocaïne, la Propoxycaïne, la Proxymétacaïne, la Pyrrocaïne, la Quatacaïne, la Quinisocaïne, la Risocaïne, la Rodocaïne, la Ropivacaïne, la Tétracaïne, la Tolycaïne, la Trimécaïne, et un de leurs sels, en particulier un sel de chlorhydrate, ou un mélange de ceux-ci. De préférence, l'hydrogel selon l'invention comprend un agent anesthésiant tel que défini ci-dessus et en particulier la lidocaïne, la mépivacaïne ou l'un de leurs sels tel que le chlorhydrate.

[0112] Des exemples d'antioxydants incluent de manière non limitative le glutathion, le glutathion réduit, l'acide ellagique, la spermine, le resvératrol, le rétinol, la L-carnitine, les polyols, les polyphénols, les flavonols, les théaflavines, les catéchines, la caféine, l'ubiquinol, l'ubiquinone, l'acide alpha-lipoïque et leurs dérivés, et un mélange de ceux-ci.

[0113] Des exemples d'acides aminés incluent de manière non limitative l'arginine (e.g., L-arginine), l'isoleucine (e.g., L-isoleucine), la leucine (e.g., L-leucine), la lysine (e.g., L-lysine ou L-lysine monohydratée), la glycine, la valine (e.g., L-valine), la thréonine (e.g., L-thréonine), la proline (e.g., L-proline), la méthionine, l'histidine, la phénylalanine, le tryptophane, la cystéine, leurs dérivés (e.g., dérivés N-acétylés comme la N-acétyl-L-cystéine) et un mélange de ceux-ci.

[0114] Des exemples de vitamines et de leurs sels incluent de manière non limitative les vitamines E, A, C, B, spécialement les vitamines B6, B8, B4, B5, B9, B7, B12, et mieux la pyridoxine et ses dérivées et/ou sels, de préférence le chlorhydrate de pyridoxine.

[0115] Des exemples de minéraux incluent de manière non limitative les sels de zinc (par exemple l'acétate de zinc, notamment déshydraté ou le citrate de zinc ; de préférence on choisira le citrate de zinc), les sels de magnésium, les sels de calcium (par exemple l'hydroxyapatite, notamment sous forme de bille), les sels de potassium, les sels de manganèse, les sels de sodium, les sels de cuivre (par exemple le sulfate de cuivre, notamment pentahydraté), éventuellement sous une forme hydratée, et les mélanges de ceux-ci. De préférence, on choisira le citrate de zinc comme composant additionnel.

[0116] Des exemples d'acides nucléiques incluent de manière non limitative l'adénosine, la cytidine, la guanosine, la thymidine, la cytodine, leurs dérivés et un mélange de ceux-ci. En tant que co-enzymes, la coenzyme Q10, la CoA, le NAD, le NADP, et les

mélanges de ceux-ci peuvent être cités.

[0117] En tant que dérivés d'adrénaline, l'adrénaline, la noradrénaline et un mélange de ceux-ci, peuvent être cités.

Homogénéisation (5)

[0118] Le procédé de préparation de l'hydrogel peut comprendre une ou plusieurs étapes d'homogénéisation. Cette étape d'homogénéisation permet d'obtenir un hydrogel plus homogène, en particulier avec une force d'extrusion la plus constante possible, i.e., la plus régulière possible. Par exemple, l'étape d'homogénéisation peut consister en une étape d'extrusion, plus particulièrement au moyen d'un tamis dont les perforations présentent un diamètre compris entre 50 et 2000 µm. L'homme du métier sait sélectionner le diamètre de perforation en fonction des propriétés mécaniques de l'hydrogel recherchées.

Méthode 2

[0119] Lorsque le procédé de la présente invention met en œuvre la méthode 2, l'étape (1) de préparation de l'hydrogel comprend les étapes suivantes :

[0120] (a) préparation d'un polysaccharide réticulé à partir d'un milieu réactionnel de réticulation comprenant un ou plusieurs polysaccharide(s), un ou plusieurs agent(s) réticulant, un solvant et des ions citrates en quantité suffisante pour permettre la préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et comprenant en outre au moins 1 mM d'ions citrates ;

[0121] (b) préparation d'un hydrogel à partir du polysaccharide réticulé obtenu à l'issue de l'étape (a) et éventuellement d'un polysaccharide non réticulé.

[0122] Le polysaccharide réticulé peut en particulier être préparé par un procédé comprenant les étapes suivantes :

[0123] (a1) préparer un milieu réactionnel de réticulation comprenant un ou plusieurs polysaccharide(s), un ou plusieurs agent(s) réticulant, un solvant et des ions citrates en quantité suffisante pour permettre la préparation d'un hydrogel à base d'un polysaccharide réticulé comprenant au moins 1 mM d'ions citrates ; et

[0124] (a2) faire réagir le milieu réactionnel pour obtenir un polysaccharide réticulé.

[0125] Les étapes (a), (a1) et (a2) du procédé selon la méthode 2 sont telles que décrites précédemment dans la section « Le Polysaccharide réticulé et/ou non réticulé », à la différence que le milieu réactionnel comprend en outre des ions citrates.

[0126] Les ions citrates sont typiquement présents dans le milieu réactionnel en une quantité permettant d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel d'au moins 1,5 mM, ou d'au moins 2 mM, ou d'au moins 2,5 mM, ou d'au moins 3 mM ou d'au moins 3,5 mM. La concentration maximale d'ions citrates dans l'hydrogel est généralement de 20 mM ou 12 mM.

[0127] Dans certains modes de réalisation, la quantité d'ions citrates présente dans le milieu réactionnel permet d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel allant de 2 à 20 mM, ou 2 à 12 mM, ou de 3 à 11 mM, ou de 3 à 9 mM, ou de 3 à 8 mM ou de 4 à 8 mM ou de 3 à 5 mM.

[0128] Dans certains modes de réalisation, la quantité d'ions citrates présente dans le milieu réactionnel permet d'atteindre une concentration en ions citrates dans l'hydrogel allant de 5 à 12 mM.

[0129] Les ions citrates présents dans le milieu réactionnel peuvent résulter de l'addition d'acide citrique ou d'une solution aqueuse d'acide citrique au milieu réactionnel.

[0130] A l'issue de l'étape (a2), le polysaccharide réticulé se présente typiquement sous forme d'un gel comprenant des ions citrates. Ce gel est généralement directement engagé dans la suite du procédé de l'invention (étape (b)).

[0131] La préparation d'un hydrogel (étape (b)) à partir du polysaccharide réticulé obtenu à l'issue de l'étape (a) ou (a2), peut être réalisée de manière conventionnelle. En particulier, la préparation d'un hydrogel à partir du polysaccharide réticulé obtenu à l'issue de l'étape (a) ou (a2), comprend typiquement une ou plusieurs des étapes conventionnelles suivantes :

- Ajustement du pH (1);
- Dilution (2);
- Purification (3);
- Addition d'au moins un composant additionnel (4) ;
- Homogénéisation (5).

[0132] Ces étapes bien connues de l'homme du métier peuvent être telles que décrites ci-avant en relation avec la méthode 1. Elles peuvent être mises en œuvre selon les manières séquentielles décrites précédemment.

Stérilisation de l'hydrogel (étape (2))

[0133] Le procédé de la présente invention comprend une étape de stérilisation de l'hydrogel préparé. La stérilisation est réalisée de préférence par la chaleur, par exemple en autoclave. La stérilisation est généralement effectuée en augmentant la température du milieu de stérilisation jusqu'à une température dite « température au plateau », qui est maintenue pendant une durée déterminée dite « durée au plateau ». La stérilisation est de préférence réalisée à une température au plateau allant de 121°C à 135°C, de préférence à une durée au plateau allant de 1 minute à 20 minutes avec $F0 \geq 15$. La valeur stérilisatrice F0 correspond au temps nécessaire, en minutes, à 121°C, pour inactiver 90% de la population de microorganismes présente dans le produit à stériliser. Alternativement, la stérilisation peut être notamment réalisée par radiation aux rayons gamma, UV ou au moyen oxyde d'éthylène.

[0134] L'hydrogel obtenu à l'issue du procédé selon l'invention présente typiquement un pH

allant de 6,8 à 7,8 (pH physiologique).

Méthode 1 ou 2 : Etape optionnelle

[0135] Le procédé de la présente invention (méthode 1 ou 2) peut en outre comprendre une étape de conditionnement de l'hydrogel. Le conditionnement de l'hydrogel est typiquement réalisé dans un dispositif d'injection. Le conditionnement est de préférence réalisé juste avant l'étape de stérilisation (2). Ainsi, l'hydrogel stérile peut se présenter sous forme d'un dispositif d'injection pré-rempli avec l'hydrogel, par exemple une seringue pré-remplie avec l'hydrogel.

Hydrogel stérile

[0136] L'hydrogel stérile obtenu par le procédé de la présente invention (méthode 1 ou 2) est un hydrogel à base d'un polysaccharide réticulé ou d'un polysaccharide non réticulé ou de leur mélange. L'hydrogel stérile obtenu par le procédé de la présente invention (méthode 1 ou 2) comprend donc un polysaccharide réticulé, ou un polysaccharide non réticulé, ou un mélange d'un polysaccharide réticulé et d'un polysaccharide non réticulé. Il est entendu que le polysaccharide réticulé peut être un mélange de polysaccharides réticulés.

[0137] L'hydrogel stérile obtenu par le procédé de la présente invention (méthode 1 ou 2) a un pH physiologique, *i.e.,* allant de 6,8 à 7,8. Le pH de l'hydrogel stérile est de préférence supérieur ou égal à 6.9 et inférieur ou égal à 7,4 ; 7,3 ; 7,2 ;7,1 ou 7.

[0138] L'hydrogel stérile obtenu par le procédé de la présente invention (méthode 1 ou 2) et comprenant un polysaccharide réticulé, possède avantageusement un angle de phase δ inférieur ou égal à 45°, à 1Hz pour une déformation de 0,1% ou une pression de 1 Pa, de préférence un angle de phase δ allant de 2° à 45° ou allant de 20° à 45°.

[0139] L'hydrogel obtenu par le procédé de la présente invention est de préférence un hydrogel injectable, c'est-à-dire qui peut s'écouler et être injecté manuellement au moyen d'une seringue munie d'une aiguille de diamètre allant de 0,1 à 0,5 mm, par exemple d'une aiguille hypodermique de 32G, 30 G, 27 G, 26 G, 25 G.

[0140] L'hydrogel obtenu par le procédé de la présente invention peut comprendre de 0,1 à 5% en poids, de préférence de 1 à 3% en poids, de polysaccharide (poids total de polysaccharide, c'est-à-dire poids total de polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, par exemple d'acide hyaluronique réticulé et/ou non réticulé), par rapport au poids total de l'hydrogel. Ainsi, lorsque l'hydrogel comprend, comme seul polysaccharide, un polysaccharide non réticulé, l'hydrogel obtenu par le procédé de la présente invention peut donc comprendre de 0,1 à 5% en poids, de préférence de 1 à 3% en poids, de polysaccharide non réticulé (par exemple d'acide hyaluronique non réticulé), par rapport au poids total de l'hydrogel. Lorsque l'hydrogel comprenant, comme seul polysaccharide, un polysaccharide réticulé, l'hydrogel obtenu par le procédé de la présente invention

peut donc comprendre de 0,1 à 5% en poids, de préférence de 1 à 3% en poids, de polysaccharide réticulé (par exemple d'acide hyaluronique réticulé), par rapport au poids total de l'hydrogel. Lorsque l'hydrogel comprend le mélange d'un polysaccharide réticulé et non réticulé, l'hydrogel obtenu par le procédé de la présente invention peut donc comprendre de 0,1 à 5% en poids, de préférence de 1 à 3% en poids, d'un mélange de polysaccharide non réticulé et réticulé (par exemple d'acide hyaluronique non réticulé et/ou réticulé), par rapport au poids total de l'hydrogel. En particulier, la teneur en polysaccharide (par exemple en acide hyaluronique) non réticulé peut varier de 0,5 à 40% en poids, préférentiellement de 1 à 40% en poids, plus préférentiellement de 5 à 30% en poids, par rapport au poids total de polysaccharide (par exemple d'acide hyaluronique) présent dans l'hydrogel.

[0141] La concentration en polysaccharide totale dans l'hydrogel obtenu par le procédé de la présente invention varie avantageusement de 1 mg/g à 50 mg/g d'hydrogel, plus avantageusement de 5 mg/g à 35 mg/g d'hydrogel, encore plus avantageusement de 10 mg/g à 30 mg/g d'hydrogel. Préférablement le polysaccharide est de l'acide hyaluronique, encore plus préférentiellement du hyaluronate de sodium.

[0142] Lorsque l'hydrogel comprend un polysaccharide réticulé, le polysaccharide réticulé présente de préférence un taux de réticulation molaire inférieur ou égal à 10%. Préférentiellement, l'hydrogel comprend un polysaccharide réticulé dont le taux de réticulation molaire est supérieur à 0 et inférieur ou égal à 6%. Encore plus préférentiellement, l'hydrogel comprend un polysaccharide réticulé dont le taux de réticulation molaire est supérieur à 0 et inférieur ou égal à 4%. De manière encore plus préférée, l'hydrogel comprend un polysaccharide réticulé dont le taux de réticulation molaire est supérieur à 0 et inférieur ou égal à 2%, de préférence inférieur ou égal à 1%, encore préférentiellement inférieur ou égal à 0,8%, notamment allant de 0,1% à 0,5% (nombre de moles d'agent(s) réticulant pour 100 moles d'unité de répétition du ou des polysaccharides).

[0143] Lorsque l'hydrogel comprend un polysaccharide réticulé, le polysaccharide réticulé présente de préférence un degré de modification (MOD) inférieur ou égal à 10%, de préférence inférieur ou égal à 6%, de préférence inférieur ou égal à 4%, de manière préférée inférieur ou égal à 2%, de manière plus préférée inférieur ou égal à 1%. Avantageusement, le polysaccharide réticulé présente un degré de modification (MOD) inférieur ou égal à 1,8%, de manière plus préférée inférieur ou égal à 1,5%, préférentiellement inférieur ou égal à 1,2%, encore plus préférentiellement inférieur à 1%.

[0144] Dans certains modes de réalisation, l'hydrogel comprend un agent anesthésiant. L'agent anesthésiant peut être tel que décrit ci-dessus, en particulier l'agent anesthésiant peut être la mépivacaïne, la lidocaïne ou un de leurs sels ; plus particulièrement sous forme d'un sel de chlorhydrate ; préférablement dans des quantités

allant de 0,1 à 30 mg/ml, par exemple de 0,5 à 10 mg/ml ou plus préférentiellement de 2 à 6 mg/ml.

[0145] Les hydrogels stériles préparés selon le procédé de l'invention sont tout particulièrement utiles pour le comblement et/ou le remplacement de tissus, en particulier de tissus mous, notamment par injection de l'hydrogel dans le tissu.

[0146] Ils peuvent être injectés en utilisant l'un quelconque des modes connus de l'homme du métier. Notamment, ils peuvent être administrés au moyen d'un dispositif d'injection adapté à une injection intra-épidermique et/ou intradermique et/ou sous-cutanée et/ou supra-périostée. Le dispositif d'injection peut notamment être choisi parmi une seringue, un ensemble de micro-seringues, un fil, un dispositif laser ou hydraulique, un pistolet d'injection, un dispositif d'injection sans aiguille, ou un rouleau à micro-aiguilles.

[0147] Les hydrogels stériles préparés selon le procédé de l'invention sont de préférence injectés en sous-cutané.

[0148] Ils peuvent concerner des applications profondes, des applications médianes et/ou des applications superficielles.

[0149] Ils peuvent avoir des applications thérapeutiques et/ou cosmétiques et/ou cosméceutiques.

[0150] Dans le domaine cosmétique, les hydrogels peuvent tout particulièrement être utiles pour compenser des pertes de volume des tissus dues au vieillissement.

[0151] Ils peuvent être utilisés dans la prévention et/ou le traitement cosmétique d'une altération de l'aspect de surface de la peau. Par exemple, les hydrogels peuvent être utilisés dans le domaine cosmétique pour prévenir et/ou traiter l'altération des propriétés viscoélastiques ou biomécaniques de la peau ; pour combler des défauts volumiques de la peau, notamment pour combler des rides, des ridules et des cicatrices ; pour atténuer les sillons naso-géniens et plis d'amertumes ; pour augmenter le volume des pommettes, du menton ou des lèvres ; pour rétablir les volumes du visage, notamment des joues, des tempes, de l'ovale du visage, et du pourtour de l'œil ; pour réduire l'apparition des rides et ridules.

[0152] Le procédé de préparation d'hydrogels stériles de la présente invention est respectueux des propriétés des hydrogels, c'est-à-dire qu'il entraine des modifications moindres des propriétés rhéologiques des hydrogels lors de la stérilisation. En effet, il a été observé une meilleure conservation des propriétés rhéologiques des hydrogels après stérilisation (meilleure conservation du module élastique G', meilleure conservation de l'angle de phase) par rapport à des hydrogels préparés par un procédé sans addition d'ions citrates.

[0153] Le procédé de la présente invention permet la préparation d'hydrogels stériles dont la diminution du module élastique G' après stérilisation n'excède pas 50%, 45%, 40%,

35% ou 30% de la valeur du module élastique G' avant stérilisation.

[0154] L'étape d'addition des ions citrates selon la méthode 1, en particulier sous forme d'une solution, ayant pour effet de diluer légèrement l'hydrogel, il pouvait être attendu que les propriétés rhéologiques de l'hydrogel soient impactées de manière négative par cette addition. De manière inattendue, il a été observé que l'addition d'une solution comprenant des ions citrates exerce un effet favorable sur les propriétés de l'hydrogel lors de la stérilisation.

[0155] Par ailleurs, l'addition des ions citrates, en particulier sous forme d'une solution, permet de préserver les propriétés de l'hydrogel dans le temps. En effet, il a été observé une meilleure conservation des propriétés rhéologiques des hydrogels au cours du temps, meilleure conservation du module élastique G', meilleure conservation de l'angle de phase) par rapport à des hydrogels préparés par un procédé sans addition d'ions citrates et qui ont tendance à voir leurs propriétés rhéologiques diminuer de manière plus conséquente au cours des mois.

[0156] L'utilisation des ions citrates, en particulier sous forme d'une solution, dans un procédé de préparation d'un hydrogel permet donc de protéger un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, en particulier comprenant au moins un polysaccharide réticulé de la dégradation de ses propriétés rhéologiques lors d'une stérilisation, de préférence par la chaleur. L'utilisation des ions citrates, en particulier sous forme d'une solution, dans un procédé de préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, en particulier comprenant au moins un polysaccharide réticulé permet également de préserver la longueur des chaines de polysaccharide réticulé et/ou non réticulé.

[0157] L'utilisation des ions citrates, en particulier sous forme d'une solution, dans un procédé de préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, en particulier comprenant au moins un polysaccharide réticulé, permet également de préserver la stabilité des hydrogels, notamment après stérilisation, dans le temps, en particulier d'augmenter la stabilité des hydrogels, notamment après stérilisation, dans le temps par comparaison avec des hydrogels identiques ne comprenant pas d'ions citrates. En d'autres termes, les hydrogels obtenus selon l'invention maintiennent plus efficacement dans le temps leurs propriétés rhéologiques après stérilisation.

[0158] Par ailleurs, il est connu que la présence additionnelle d'un agent anesthésiant dans un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé et/ou non réticulé, entraine une dégradation accrue des propriétés rhéologiques des hydrogels lors de la stérilisation, de préférence à la chaleur. L'addition des ions citrates permet de limiter ces effets. Les hydrogels obtenus par le procédé de la présente invention comprenant un agent anesthésiant présentent des dégradations moindres de leur propriétés rhéologiques après

stérilisation par rapport à des hydrogels, comprenant un agent anesthésiant, préparés par un procédé équivalent sans addition d'ions citrates.

[0159] Les exemples qui suivent sont donnés à titre illustratif, mais ne doivent en aucun cas être considérés comme limitatifs de la présente invention.

EXEMPLES

1. Matériels

[0160] - Hyaluronate de sodium non réticulé

[0161] - BDDE (Sigma Aldrich)

[0162] - NaOH 0,25M

[0163] - HCl 1M

[0164] - Acide citrique (Sigma Aldrich)

[0165] - Tampon Phosphate (BBraun),

[0166] - Chlorhydrate de Lidocaïne

[0167] - Agitateur tridimensionnel

[0168] - Rhéomètre DHR-2

[0169] - Dynamomètre et banc d'essai

[0170] - Homogénéisateur Broyeur à palettes

[0171] - Poche stérile en polyéthylène

2. Méthodes

Mesure des propriétés viscoélastiques

[0172] Les propriétés viscoélastiques des hydrogels obtenus ont été mesurées en utilisant un rhéomètre (DHR-2) ayant un cône en acier inoxydable (1° - 40 mm) à géométrie cône-plan et un plan peltier en aluminium anodisé (42 mm) (entrefer 24 μm).

[0173] 0,5 g d'hydrogel stérilisé est déposé entre le plan peltier et ledit cône. Puis un balayage en contraintes est effectué à 1 Hz et 25°C. Le module élastique G', le module visqueux G'' et l'angle de phase δ sont reportés pour une contrainte de 5 Pa. Les mesures sont réalisées dans le domaine linéaire LVER.

[0174] La contrainte au croisement de G' et G'', τ, est déterminée au croisement des courbes des modules G' et G'' et est exprimée en Pascal.

3. Exemples

3.1 Exemple 1

[0175] Deux hydrogels d'acide hyaluronique réticulé sont préparés à partir d'un acide hyaluronique de haut poids moléculaire 3 MDa et du BDDE dans une solution aqueuse de soude à 0,25M (réticulation pendant 1 mois à -20°C). Les polysaccharides réticulés présentent un taux de réticulation molaire de 0,2% et soit une concentration de 15 mg d'acide hyaluronique par gramme de produit (hydrogel A), soit une concentration de 23 mg d'acide hyaluronique par gramme de produit (hydrogel B). Du tampon phosphate

PBS et une solution d'HCl 1N est ensuite ajoutée aux polysaccharides réticulés jusqu'à obtenir un pH de 7,3 ± 0,5. Les hydrogels obtenus sont homogénéisés au moyen d'un agitateur tridimensionnel. Les mélanges sont dialysés.

[0176] Aux hydrogels obtenus, sont ensuite ajoutée une solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire non réticulé en tant que lubrifiant (même quantité de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire dans les différents mélanges) comprenant, ou non, des ions citrates.

[0177] La solution comprenant les ions citrates et le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire est préparée comme suit. L'acide citrique (sous forme de poudre) est dissout dans le tampon phosphate, et le pH est ensuite ajusté avec du NaOH 5M afin d'atteindre un pH physiologique (pH= 6.8 - 7.8), enfin le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire est ajouté en tant que lubrifiant. La concentration en ions citrates dans la solution est adaptée en prenant en compte l'effet de dilution suite à l'ajout de cette solution dans l'hydrogel à base d'acide hyaluronique réticulé. En effet, la concentration en ions citrates indiquée dans le tableau 1 correspond à la concentration finale dans l'hydrogel.

[0178] La solution préparée comprenant l'acide citrique et le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire ou la solution comprenant le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire seul est ensuite mélangée à l'hydrogel à base d'acide hyaluronique réticulé dans une cuve d'agitation.

[0179] Les produits obtenus (hydrogels A, B) ont été tamisés puis conditionnés en seringue.

[0180] Enfin, les produits ont été stérilisés à l'autoclave (température au plateau comprise entre 121°C et 135°C avec F0 ≥ 15).

[0181] Avant et après stérilisation, les prototypes ont été analysés. Le module élastique G' et l'angle de phase δ ont été déterminés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

[0182] Les prototypes présentent un taux de réticulation molaire de 0,2%.

[0183] [Tableaux1]

Hydrogels	A		B	
	A1	A2	B1	B2
Concentration molaire en ions citrates (mM) dans l'hydrogel final	0	3,06	0	3,06
Pourcentage massique en ions citrates par rapport à la masse de l'hydrogel final	0	0,06%	0	0,06%
G' (1Hz) avant stérilisation	261,7	245,0	511,1	499,2
δ avant stérilisation	15,4	15,8	13,3	13,4
ΔG' (%)[1]	-54,5	-33,2	-37,9	-18,8
Δ δ (%)[2]	67,5	39,3	58,9	36,2

[0184] Tableau 1

[0185] [1] ΔG' (%)= (G' après stérilisation – G' avant stérilisation)/(G' avant stérilisation) *100

[0186] [2] Δ δ (%)= (δ après stérilisation – δ avant stérilisation)/(δ avant stérilisation) *100

[0187] Il est observé que les hydrogels préparés à partir d'un procédé selon l'invention comprenant une étape d'addition d'une solution d'acide citrique (hydrogels A2, B2) présentent des dégradations moindres de leurs propriétés rhéologiques après stérilisation par rapport à des hydrogels préparés par un procédé équivalent sans addition d'une solution d'acide citrique (hydrogels A1, B1). En effet, il a été observé que les hydrogels A2 et B2 présentent un module élastique (G') plus élevé après stérilisation que les hydrogels A1 et B1 après stérilisation. La diminution du module élastique (G') est donc inférieure après stérilisation pour les hydrogels A2 et B2. Il a également été observé que les hydrogels A2 et B2 présentent un angle de phase (δ) moins élevé après stérilisation que les hydrogels A1 et B1 après stérilisation.

3.2 Exemple 2

[0188] Un hydrogel d'acide hyaluronique réticulé est préparé à partir d'un acide hyaluronique de haut poids moléculaire 4MDa et du BDDE dans une solution aqueuse de soude à 0,25M. Le polysaccharide réticulé présente un taux de réticulation molaire de 2% et une concentration de 15 mg d'acide hyaluronique par gramme de produit. Du tampon phosphate PBS et une solution d'HCl 1N sont ensuite ajoutés au polysaccharide réticulé jusqu'à obtenir un pH de 7,3 ± 0,5. L'hydrogel obtenu est homogénéisé au moyen d'un agitateur tridimensionnel. Le mélange est dialysé.

[0189] Aux hydrogels obtenus, selon les cas, sont ensuite ajoutées :

[0190] - une solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire en tant que lubrifiant (même quantité dans les différents mélanges) comprenant, ou non des ions citrates;

[0191] - une solution aqueuse de chlorhydrate de lidocaïne pour obtenir 0,3% en poids de chlorhydrate de lidocaïne par rapport au poids de l'hydrogel final ;

[0192] - une solution d'acide citrique.

Hydrogels C

[0193] Pour les hydrogels C, seule une solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire non réticulé comprenant, ou non, des ions citrates est ajoutée.

[0194] La solution comprenant des ions citrates et le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire est préparée comme suit. L'acide citrique (sous forme de poudre) est dissout dans le tampon phosphate, le pH est ensuite ajusté avec du NaOH 5M afin d'atteindre un pH physiologique (pH= 6.8- 7.6), enfin le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire est ajouté en tant que lubrifiant. La concentration en ions citrates dans la solution est adaptée en prenant en compte l'effet de dilution suite à l'ajout de cette solution dans le mélange comprenant l'acide hyaluronique réticulé. En effet, la concentration en ions citrates indiquée dans le tableau 2 correspond à la concentration finale dans l'hydrogel.

[0195] La solution préparée comprenant l'acide citrique et le hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire est ensuite mélangée au mélange comprenant l'acide hyaluronique réticulé dans une cuve d'agitation.

Hydrogels D

[0196] Pour les hydrogels D, une solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire, une solution d'anesthésiant et éventuellement une solution d'acide citrique sont ajoutées.

[0197] La solution d'acide citrique est ajoutée au même moment que la solution d'anesthésiant, la solution d'acide citrique et la solution d'anesthésiant étant ajoutées après addition de la solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire.

[0198] Une solution d'acide citrique est préparée. L'acide citrique (sous forme de poudre) est d'abord dissout dans du tampon phosphate puis, du NaOH 5M est ajouté pour ajuster le pH à un niveau physiologique. L'objectif est de faire une solution concentrée 100 fois par rapport à la concentration réelle souhaitée dans l'hydrogel final. Cela permet d'éviter un trop fort effet de dilution de l'hydrogel dû à l'ajout de la solution d'acide citrique.

[0199] Les produits obtenus (hydrogels C et D) ont été tamisés de l'ordre du micron puis conditionnés en seringue.

[0200] Enfin, les produits ont été stérilisés à l'autoclave (température au plateau comprise

entre 121°C et 135°C avec F0 ≥ 15).

[0201] Avant et après stérilisation, les prototypes ont été analysés. Le module élastique G' et l'angle de phase δ ont été déterminés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous.

[0202] [Tableaux2]

Hydrogels	C		D					
	C1	C2	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Concentration molaire en ions citrates (mM) dans l'hydrogel final	0	3,06	0	1,53	4,59	7,65	10,71	12,24
Pourcentage massique en ions citrates par rapport à la masse totale de l'hydrogel final	0	0,06%	0	0,03%	0,10%	0,16%	0,23%	0,26%
G' (1 Hz) avant stérilisation	130,1	127,8	124,9	122,7	120,9	122,1	122,3	121,1
δ avant stérilisation	13	15,3	13,5	13,5	13,5	13,4	13,3	13,4
ΔG' (%)[1]	-18,9	-10,7	-33,0	-29,4	-23,4	-18,2	-14,4	-16,6
Δ δ (%)[2]	31,6	8,8	45,5	36,3	27,7	21,1	21,1	22,1

[0203] Tableau 2

[0204] [1] ΔG' (%)= (G' après stérilisation – G' avant stérilisation)/(G' avant stérilisation) *100

[0205] [2] Δ δ (%)= (δ après stérilisation – δ avant stérilisation)/(δ avant stérilisation) *100

[0206] Il est observé que les hydrogels préparés à partir d'un procédé selon l'invention comprenant une étape d'addition d'ions citrates (addition d'une solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire non réticulé comprenant des ions citrates ou addition d'une solution d'acide citrique) (hydrogels C2, D2 à D6) présentent des modifications moindres de leurs propriétés rhéologiques après stérilisation par rapport à des hydrogels préparés par un procédé équivalent sans addition d'ions citrates (hydrogels C1 et D1). En effet, il a été observé que les hydrogels C2 et D2 à D6

présentent un module élastique (G') plus élevé après stérilisation que les hydrogels C1 et D1. La diminution du module élastique (G') est donc inférieure après stérilisation pour les hydrogels C2 et D2 à D6. Il a également été observé que les hydrogels C2 et D2 à D6 présentent un angle de phase (δ) moins élevé après stérilisation que les hydrogels C1 et D1.

[0207] Après 1 mois à 40°C, l'hydrogel C2 préparé à partir d'un procédé selon l'invention comprenant une étape d'addition d'une solution comprenant des ions citrates ne présente pas de modifications de ses propriétés rhéologiques par rapport à l'hydrogel C1 préparé par un procédé équivalent sans addition d'une telle solution.

3.3 Exemple 3

[0208] Un hydrogel d'acide hyaluronique réticulé est préparé à partir d'un acide hyaluronique de haut poids moléculaire 4MDa et du BDDE dans une solution aqueuse de soude à 0,25M. Le polysaccharide réticulé présente un taux de réticulation de 2% et une concentration de 15 mg d'acide hyaluronique par gramme de produit. Du tampon phosphate PBS et une solution d'HCl 1N sont ensuite ajoutés au polysaccharide réticulé jusqu'à obtenir un pH de 7,3 ± 0,5. L'hydrogel obtenu est homogénéisé au moyen d'un agitateur tridimensionnel. Le mélange est dialysé.

[0209] Aux hydrogels obtenus, sont ensuite ajoutées :

[0210] - une solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire en tant que lubrifiant (même quantité dans les différents mélanges) ;

[0211] - une solution aqueuse de chlorhydrate de lidocaïne pour obtenir 0,3% en poids de chlorhydrate de lidocaïne par rapport au poids de l'hydrogel final ;

[0212] - éventuellement une solution d'acide citrique.

[0213] Pour les hydrogels E2 et E3, la solution d'acide citrique est ajoutée au même moment que la solution d'anesthésiant, la solution d'acide citrique et la solution d'anesthésiant étant ajoutées après addition de la solution de hyaluronate de sodium de haut poids moléculaire.

[0214] Une solution d'acide citrique est préparée. L'acide citrique (sous forme de poudre) est d'abord dissout dans du tampon phosphate puis, du NaOH 5M est ajouté pour ajuster le pH à un niveau physiologique. L'objectif est de faire une solution concentrée 100 fois par rapport à la concentration réelle souhaitée dans l'hydrogel final. Cela permet d'éviter un trop fort effet de dilution de l'hydrogel dû à l'ajout de la solution d'acide citrique.

[0215] Les produits obtenus (hydrogels E1, E2 et E3) ont été tamisés de l'ordre du micron puis conditionnés en seringue.

[0216] Enfin, les produits ont été stérilisés à l'autoclave (température au plateau comprise entre 121°C et 135°C avec F0 ≥ 15).

[0217] Avant et après stérilisation, les hydrogels E1-E3 ont été analysés. Le module

élastique G' et l'angle de phase δ ont été déterminés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous.

[0218] [Tableaux3]

Hydrogels	E1	E2	E3
Concentration molaire en ions citrates (mM) dans l'hydrogel final	0	3,06	7,65
G' (1Hz) avant stérilisation	127,5	130,2	123,9
G' (1 Hz) à T0 mois (après stérilisation)	70,3	90,0	103,9
G' (1 Hz) à T2 mois (après stérilisation)	61,0	86,9	99,8
ΔG' (%)[1]	-13,2	-3,4	-3,9

[0219] Tableau 3

[0220] [1] ΔG' (%)= (G' T 2mois – G' T0)/(G' T0) *100

[0221] Après 2 mois à 40°C, les hydrogels E2 et E3 préparés à partir d'un procédé selon l'invention comprenant une étape d'addition d'une solution comprenant des ions citrates présentent une mineure modification de leurs propriétés rhéologiques par rapport à l'hydrogel E1 préparé par un procédé équivalent sans addition d'une telle solution.

Revendications

[Revendication 1] Procédé de préparation d'un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé, ou leur mélange, le procédé comprenant les étapes suivantes :
(1) préparation d'un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé, ou leur mélange, et comprenant en outre au moins 1 mM d'ions citrates ; et
(2) stérilisation, de préférence à la chaleur, de l'hydrogel comprenant au moins 1 mM d'ions citrates pour obtenir un hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange.

[Revendication 2] Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'étape (1) comprend l'addition, au polysaccharide réticulé ou au polysaccharide non réticulé ou à leur mélange, d'une solution comprenant des ions citrates en une quantité suffisante pour atteindre une concentration en ions citrates d'au moins 1 mM dans l'hydrogel.

[Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'étape (1) comprend l'addition, au polysaccharide réticulé ou au polysaccharide non réticulé ou à leur mélange, d'ions citrates sous forme de poudre en une quantité suffisante pour atteindre une concentration en ions citrates d'au moins 1 mM dans l'hydrogel.

[Revendication 4] Procédé selon la revendication 2 dans lequel la solution comprenant des ions citrates a un pH allant de 6,8 à 7,8.

[Revendication 5] Procédé selon la revendication 2 ou 4 dans lequel la solution comprenant des ions citrates est une solution d'acide citrique, de préférence une solution d'acide citrique dans un tampon physiologiquement acceptable.

[Revendication 6] Procédé selon la revendication 5 dans lequel le tampon physiologiquement acceptable est un tampon phosphate.

[Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 6 dans lequel la quantité des ions citrates ajoutée à l'hydrogel permet d'atteindre une concentration en ions citrates allant de 1 à 12 mM dans l'hydrogel.

[Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7 dans lequel l'étape (1) de préparation d'un hydrogel comprend une ou plusieurs des étapes conventionnelles suivantes :

- Ajustement du pH;
- Dilution;

- Purification;
- Addition d'au moins un composant additionnel;
- Homogénéisation.

[Revendication 9] Procédé selon la revendication 8 comprenant une étape de dilution et/ou une étape d'addition d'au moins un composant additionnel, dans lequel les ions citrates sont ajoutés lors de l'étape de dilution et/ou lors de l'étape d'addition d'au moins un composant additionnel.

[Revendication 10] Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'étape (1) comprend les étapes suivantes :
(a) préparation d'un polysaccharide réticulé à partir d'un milieu réactionnel de réticulation comprenant un ou plusieurs polysaccharide(s), un ou plusieurs agent(s) réticulant, un solvant et des ions citrates en quantité suffisante pour permettre la préparation d'un hydrogel à base d'un polysaccharide réticulé comprenant au moins 1mM d'ions citrates ;
(b) préparation d'un hydrogel à partir du polysaccharide réticulé obtenu à l'issue de l'étape (a) et éventuellement d'un polysaccharide non réticulé.

[Revendication 11] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 dans lequel le polysaccharide est un acide hyaluronique.

[Revendication 12] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 comprenant en outre une étape de conditionnement de l'hydrogel, de préférence dans un dispositif d'injection, après l'étape (1) et avant l'étape (2).

[Revendication 13] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 dans lequel la stérilisation est une stérilisation à la chaleur, de préférence réalisée en autoclave.

[Revendication 14] Hydrogel stérile comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange, en particulier un acide hyaluronique réticulé, un acide hyaluronique non réticulé ou leur mélange, obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13.

[Revendication 15] Utilisation des ions citrates pour protéger un hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange, en particulier un acide hyaluronique réticulé, non réticulé ou leur mélange, et éventuellement un agent anesthésiant, de la dégradation de ses propriétés rhéologiques lors de sa stérilisation, de préférence par la chaleur.

[Revendication 16] Utilisation des ions citrates pour préserver la stabilité dans le temps d'un

hydrogel comprenant un polysaccharide réticulé, un polysaccharide non réticulé ou leur mélange, en particulier un acide hyaluronique réticulé, non réticulé ou leur mélange, et éventuellement un agent anesthésiant.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 917669
FR 2302635

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2018/087272 A1 (ANTEIS SA [CH]) 17 mai 2018 (2018-05-17) * alinéas [0006], [0007] - [0011], [0023], [0031], [0035], [0037], [0043] - [0062]; revendications 1-15; exemples 1-3; tableaux 1-6 * -----	1-16	A61L 2/07 A61L 27/20 A61P 23/02 C08K 5/092 C08B 37/08
A	ALAVARSE ALEX CARVALHO ET AL: "Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 202, 14 janvier 2022 (2022-01-14), pages 558-596, XP086973778, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.01.029 [extrait le 2022-01-14] * le document en entier * -----	1-16	
A	WO 2018/071033 A1 (ALLERGAN INC [US]) 19 avril 2018 (2018-04-19) * alinéas [0135], [0143]; revendications 1-25 * -----	1-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61Q A61L

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
5 octobre 2023	Burtan, M

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons
.....
& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2302635 FA 917669

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 05-10-2023
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2018087272 A1	17-05-2018	EP 3538066 A1	18-09-2019
		ES 2906331 T3	18-04-2022
		LT 3538066 T	11-04-2022
		PL 3538066 T3	02-05-2022
		US 2019269597 A1	05-09-2019
		WO 2018087272 A1	17-05-2018
WO 2018071033 A1	19-04-2018	AU 2016426150 A1	18-04-2019
		AU 2022204011 A1	30-06-2022
		CA 3038981 A1	19-04-2018
		CN 109890428 A	14-06-2019
		EP 3525834 A1	21-08-2019
		EP 3895742 A1	20-10-2021
		ES 2883839 T3	09-12-2021
		JP 6827108 B2	10-02-2021
		JP 2019531816 A	07-11-2019
		KR 20190070343 A	20-06-2019
		RU 2019112320 A	13-11-2020
		US 2020054786 A1	20-02-2020
		US 2023277725 A1	07-09-2023
		WO 2018071033 A1	19-04-2018

EPO FORM P0465