

BREVET D'INVENTION

Date de priorité :

Classification internationale : A61K 8/67, A61K 8/73, A61K 8/04, A61K 8/19, A61K 8/23, A61K 31/375, A61K 31/728, A61K 33/08, A61K 33/10, A61K 9/00, A61Q 19/08

Numéro de dépôt : 2013/0295

Date de dépôt : 26/04/2013

Titulaire :

AURIGA INTERNATIONAL
1410, WATERLOO
Belgique

Inventeur :

Marchal Alfred
1410 Waterloo
BelgiqueCabou Jérôme
59163 Saint Aybert
FranceLacroix Damien
5030 Ernage
BelgiqueDubois Jacques
1495 Villers-La-Ville
Belgique**GEL STABLE D'ACIDE HYALURONIQUE ET D'UNE FORME LIBRE DE VITAMINE C ET/OU DE L'UN DE SES SELS**

Composition aqueuse gélifiée d'acide hyaluronique comprenant de 0.1 à 20.0 % en poids de vitamine C et de 0.01 à 1.00 % en poids d'agent stabilisant. Pouvant être obtenu selon le procédé qui consiste à préparer un mélange d'acide hyaluronique, de vitamine C, d'agent stabilisant et d'une phase aqueuse et dégazer la composition avant qu'elle ne gonfle complètement.

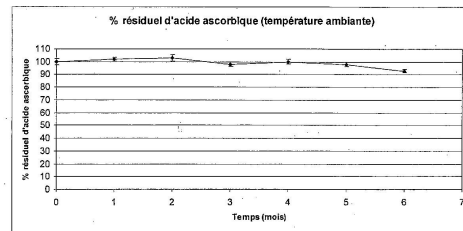


Figure 1

**Gel stable d'acide hyaluronique et d'une forme libre de
vitamine C et/ou de l'un de ses sels**

Domaine de l'invention

5 La présente invention se rapporte à une composition aqueuse d'acide hyaluronique et de vitamine C, injectable, sous forme d'hydrogel qui soit suffisamment stable pour être stocké sans dégradation notable pendant une période de plusieurs mois et qui, de préférence, ne soit pas sujet au
10 jaunissement.

 L'invention se rapporte également à une méthode permettant d'obtenir de tels gels et à l'utilisation de ces gels à des fins esthétiques et/ou thérapeutiques.

15 État de la technique

 Les compositions d'acide hyaluronique sont généralement utilisées sous forme d'un gel injectable. En médecine esthétique ou réparatrice le gel d'acide hyaluronique peut être injecté sous la peau afin de permettre le comblement des
20 rides et ridules, le remodelage du visage ou encore des lèvres. Ces gels sont également utilisés en médecine thérapeutique et trouvent des applications notamment dans le domaine de l'ophtalmologie pour lequel le gel permet d'hydrater l'œil ou encore de soulager la cornée après une
25 greffe de cornée, un glaucome ou une cataracte. Le gel peut également être injecté dans les articulations afin de diminuer les douleurs articulaires, en particulier en rhumatologie.

 L'amélioration de ces gels, en particulier en termes de
30 tenue et de résistance à la dégradation dans l'organisme, peut être obtenue par l'utilisation d'additifs.

 Ces additifs peuvent aussi apporter des effets complémentaires qui améliorent ceux du traitement par

injection d'acide hyaluronique. De tels additifs peuvent par exemple prolonger la durée de l'effet recherché, optimiser la répartition du produit injecté, limiter la douleur lors de l'injection, apporter une action complémentaire, notamment
5 des propriétés anti-ecchymotiques, antioxydantes ou stimulatrices de la production d'acide hyaluronique ou de collagène.

Parmi les différents additifs utilisables, l'acide L-ascorbique ou vitamine C est particulièrement intéressant du
10 fait des ses propriétés antioxydantes, anti-âges et promotrices du collagène.

Cependant, il s'est avéré que l'association de la vitamine C et/ou de l'un de ses sels, sous une forme libre, c'est-à-dire sous forme d'acide ou d'ascorbate, avec un gel
15 d'acide hyaluronique ne permet pas d'obtenir un gel qui soit suffisamment stable. En effet, un ajout de vitamine C induit la dégradation de l'acide hyaluronique et conduit à la liquéfaction du gel et au jaunissement de la solution. Cette dégradation est particulièrement contraignante dans la mesure
20 où ces compositions sont rapidement dégradées lorsqu'elles sont stérilisées par voie thermique. De plus, la vitamine C elle-même est une molécule peu stable qui se dégrade rapidement. De telles compositions ne peuvent donc pas être facilement, produites, conservées en vue de leurs
25 utilisations ultérieures, ou stérilisées.

On connaît des documents US 2011/0171286, WO 2011/086458, US 2012/0225842 des compositions stables associant des gels d'acide hyaluronique et des dérivés
30 d'acide ascorbique et comprenant éventuellement un stabilisant additionnel. De telles compositions ne sont cependant stables que lorsqu'un dérivé de la vitamine C est utilisé, notamment l'ascorbyl phosphate de magnésium ou de

sodium et l'acide ascorbique 2-glucoside (AA2G). En effet, lorsque la vitamine C et/ou l'un de ses sels, est utilisée sous une forme libre, le gel d'acide hyaluronique est rapidement dégradé lorsque l'on stérilise la composition par passage à l'autoclave. Après traitement en autoclave le gel jaunit et se dégrade. Cette dégradation de l'acide hyaluronique est également connue de l'homme du métier. Par exemples, les documents WO 95/29683 et FR 2 900 575 décrivent les problèmes de stabilité des gels d'acide hyaluronique lorsqu'ils sont combinés à de la vitamine C, ou ses sels, sous une forme libre.

Par ailleurs, il est couramment admis que l'utilisation des esters de l'acide ascorbique, notamment le palmitate, ou d'autres dérivés de vitamine C par exemple les ascorbates d'acides gras, l'acide ascorbique 2-glucoside, ou l'ascorbyl phosphate, procure une efficacité moindre que l'utilisation directe de la vitamine C ou de ses sels sous une forme libre.

Il existe donc un besoin pour un gel injectable comprenant de l'acide hyaluronique et de la vitamine C et/ou l'un de ses sels, sous une forme libre et qui soit suffisamment stable pour pouvoir être stérilisé thermiquement en autoclave, c'est-à-dire que le gel ne présente pas une perte significative de viscosité et/ou de viscoélasticité, ne se dégrade pas sous une forme liquide, ni ne jaunit pas.

Figures

Figure 1 : Graphique représentant la teneur en ascorbate dosé sous forme d'acide ascorbique après acidification d'un gel d'acide hyaluronique stocké à température ambiante.

Figure 2 : Graphique représentant la teneur en ascorbate dosé sous forme d'acide ascorbique après acidification d'un gel d'acide hyaluronique stocké à 7°C.

Figure 3 : Graphique représentant les courbes d'évolution du
5 pH des gels d'acide hyaluronique supplémentés en vitamine C selon le procédé de l'invention en fonction du temps et à deux températures différentes (7°C et à température ambiante - TA).

10 **Résumé de l'invention**

Un but de l'invention est d'obtenir un gel aqueux comprenant de l'acide hyaluronique, réticulé ou non, ou l'hyaluronate correspondant et de la vitamine C sous une forme libre et/ou
15 de l'un de ses sels. Le gel doit être suffisamment stable pour pouvoir être stérilisé par passage à l'autoclave et conditionné pour pouvoir être stocké pendant plusieurs mois, de préférence au moins 6 mois, sans dégradation notable du gel ou de sa composition.

20

Un autre objet de l'invention est d'associer les bénéfices d'une injection d'acide hyaluronique aux effets antioxydants, anti-âge et promoteurs du collagène de la vitamine C et/ou de l'un de ses sels, utilisés sous forme libre.

25

Un autre objet de l'invention est l'utilisation dans le domaine cosmétique d'une formule contenant un acide hyaluronique sous forme d'acide ou de sel, réticulé ou non, de la vitamine C et/ou l'un de ses sels, notamment
30 l'ascorbate de sodium, sous une forme libre, c'est à dire sous la forme d'acide ou d'ascorbate, et d'un agent stabilisant.

Un autre but de l'invention est l'utilisation a des fins esthétiques, reconstructrices ou thérapeutiques d'un gel injectable comprenant un acide hyaluronique sous forme d'acide ou de sel, réticulé ou non, de la vitamine Cou de l'un de ses sels, notamment l'ascorbate de sodium, sous une forme libre, et d'un agent stabilisant.

Description détaillée de modes de réalisation particuliers

- 10 Le terme acide hyaluronique sera utilisé pour décrire de manière indifférenciée l'acide hyaluronique, réticulé ou non, ou l'un de ses sels. De préférence le sel d'acide hyaluronique est un sel de sodium.
- En fonction des applications souhaitées, il est possible d'utiliser un mélange d'acides hyaluroniques réticulés et non réticulés. En effet, l'acide hyaluronique réticulé permet d'obtenir une viscosité et une stabilité plus élevée. A l'inverse, l'acide hyaluronique non réticulé permet d'obtenir des compositions plus fluides. Les agents de réticulation sont de préférence des diols, en particulier ils peuvent être choisis parmi le 1,4-butanediol, le diglycidyl ether, le 1,4-bis(2,3-epoxypropoxy)butane, le 1,4-bisglycidyl oxybutane, le 1,2-bis(2,3-epoxypropoxy)éthylène et le 1-(2,3-epoxypropyl)-2,3-epoxycyclohexane.
- 25 Pour ces raisons il peut être intéressant de combiner l'acide hyaluronique réticulé et non-réticulé dans la fabrication d'implants. L'acide hyaluronique est notamment commercialisé sous les marques Juvederm par Allergan, ou Restylane par Medicis Aesthetics.
- 30 Le terme vitamine C doit être interprété comme recouvrant les formes libres de l'acide ascorbique, c'est-à-dire l'acide ascorbique sous forme acide lévogyre ou l'un de ses sels dénommé ascorbate.

La phase aqueuse utilisée pour la préparation du gel d'acide hyaluronique, peut être choisie par l'homme du métier sur la base de ses connaissances générales, afin d'être compatible avec les applications du gel injectable.

- 5 La dégradation du gel d'acide hyaluronique et de vitamine C se traduit par une perte significative de viscosité et de viscoélasticité du gel signe d'un début de dégradation avant dégradation totale en un liquide avec l'apparition d'une coloration jaune intense.
- 10 Les inventeurs ont trouvé de façon surprenante que la stabilité du gel, c'est-à-dire sa non dégradation sur une période d'au moins 6 mois, ou lors d'un passage à l'autoclave et l'absence de coloration jaune, sont obtenues lorsque l'ajout de l'agent stabilisant est combiné à une étape de
- 15 dégazage de la composition lors de la préparation du gel. En particulier, les inventeurs ont résolu ces problèmes de dégradation et de coloration en préparant une composition aqueuse gélifiée comprenant de l'acide hyaluronique réticulé ou non, ou l'un de ses sels et dont la masse molaire est
- 20 comprise entre 1000 Da et 10 MDa (10^7 Da) et préférentiellement entre 50 KDa et 5 MDa ou encore préférentiellement entre 200 KDa et 3 MDa, une masse molaire trop élevée rendant la manipulation du gel difficile alors que pour une masse molaire inférieure à 1000 Da la composition serait très
- 25 liquide. La composition aqueuse gélifiée comprend également de 0.1 à 20.0 % et de préférence entre 2 et 10 % en poids de vitamine C sous sa forme acide, ou son équivalent en ascorbate provenant d'un sel de vitamine C, de 0.01 à 1.00 %, de préférence entre 0.08 et 1.00 % en poids, d'un agent
- 30 stabilisant tel que le métabisulfite de sodium et d'une solution aqueuse ajoutée de façon à ce que la teneur en acide hyaluronique soit comprise entre 0.01 et 100 mg/ml et préférentiellement entre 2 et 50 mg/ml.

Le gel injectable doit de préférence avoir un pH qui ne soit pas trop acide afin d'être compatible avec les différentes applications du gel.

5 Il est dès lors avantageux d'utiliser un sel de l'acide ascorbique tel qu'un sel de sodium. Ce sel pourra être introduit en l'état ou formé in situ par l'adjonction d'une base telle que l'hydrogénocarbonate de sodium sur l'acide
10 lors de la réaction acide / base et contribue également au dégazage de la solution.

Un agent stabilisant additionnel est utilisé dans la composition du gel. Cet agent stabilisant doit être
15 compatible avec les applications médicales ou cosmétiques, notamment pour des injections et est préférentiellement choisi parmi le groupe des agents réducteurs et antioxydants employé à une concentration comprise entre 0.01 et 1 % en masse et de préférence entre 0.08 et 1 % et pourra
20 avantageusement être le métabisulfite de sodium.

Toutefois, si l'ajout de l'agent stabilisant permet d'éviter la liquéfaction du gel, il ne permet pas, et ce de manière surprenante, de prévenir la coloration du gel en jaune, même
25 à des concentrations élevées en agent stabilisant. Par exemple des concentrations comprises entre 0.08 % en poids et 1 % en poids d'agent stabilisant ne permettent pas d'éviter la coloration jaune du gel.

30 Afin de prévenir la coloration en jaune du gel d'acide hyaluronique, il est nécessaire de réaliser une étape de dégazage lors de la préparation du gel.

La composition aqueuse gélifiée selon l'invention est susceptible d'être obtenue selon le procédé qui comprend les étapes de :

- 5
- Préparation d'un mélange comprenant de l'acide hyaluronique réticulé ou non et/ou l'un de ses sels de masse molaire comprise entre 1000 Da et 10 MDa, de 0.1 à 20.0 % en poids de vitamine C sous forme d'acide, ou son équivalent en ascorbate, de 0.01 à 1.00 % en poids d'un
- 10
- agent stabilisant et une solution aqueuse ajoutée de façon à ce que la teneur en acide hyaluronique soit comprise entre 0.01 et 100 mg/ ml afin de former un hydrogel.
- Dégazage du mélange avant que l'hydrogel en formation ne
- 15
- gonfle complètement.

Préparation du mélange

Selon un mode de réalisation préféré, une base telle qu'un

20

hydrogénocarbonate, et plus particulièrement de l'hydrogénocarbonate de sodium, est ajoutée au mélange comprenant de la vitamine C afin de former in situ l'ascorbate correspondant. Avantageusement, avec l'hydrogénocarbonate, il se produit, en présence d'eau, un

25

dégagement de dioxyde de carbone, ce qui améliore le dégazage de la composition.

La phase aqueuse utilisée selon l'invention est de préférence une solution aqueuse tamponnée à un pH compris entre environ

30

5 et environ 8. la phase aqueuse peut contenir tout additif utile connu de l'Homme de l'art et compatible avec l'application, permettant par exemple d'améliorer le gel, d'augmenter sa résistance, d'éviter la douleur à l'injection.

Lors de la préparation du mélange, deux alternatives sont possibles :

- 5 • Lors de l'étape de mélange, l'acide hyaluronique, la vitamine C, l'agent stabilisant, les additifs éventuels et éventuellement l'hydrogénocarbonate sont de préférence utilisés sous une forme solide puis mélangés à la phase aqueuse. Ceci permet d'obtenir par la suite un gel qui soit homogène.
- 10 • Il est également possible de préparer au préalable une solution aqueuse comprenant la vitamine C, le stabilisant, les additifs éventuels et éventuellement l'hydrogénocarbonate. La solution aqueuse est ensuite utilisée pour gonfler un gel d'acide hyaluronique
- 15 préalablement partiellement gonflé.

Ces deux alternatives, ou toute méthode combinant ces deux alternatives, permettent d'obtenir un gel d'acide hyaluronique homogène et permettent de faciliter le dégazage

20 du mélange par la suite.

Afin d'éviter tout problème lié à un gonflement trop rapide du gel, il est avantageux de dégazer chacune des préparations, c'est à dire la phase aqueuse et l'acide

25 hyaluronique lorsque celui-ci est utilisé sous forme de gel partiellement gonflé, ainsi que le volume contenant les solides. Puis d'effectuer le mélange sous une atmosphère contrôlée et inerte.

30 Etape de dégazage

Suivant un mode de réalisation avantageux l'étape de dégazage est réalisée par ultrasons et/ou par alternance de cycles d'aspiration sous vide et d'ajout de gaz inerte.

5 Le procédé selon l'invention permet d'obtenir un gel, suffisamment stable pour pouvoir être stérilisé en autoclave et qui ne jaunit pas. Le gel obtenu est compatible avec l'injection, par exemple par seringue dans le cas d'applications cosmétiques et/ou thérapeutiques.

10

Il a par ailleurs pu être montré que le passage à l'autoclave d'une telle préparation n'a pas d'effet significatif sur la concentration en vitamine C contenue dans le gel.

15 Les gels injectables selon l'invention peuvent également contenir des ingrédients additionnels, en particulier des agents anesthésiques et notamment la lidocaïne, des agents anti-ecchymotiques, des agents stimulant la production d'acide hyaluronique, des agents stimulant la prolifération
20 cellulaire et/ou des agents stimulant la production de collagène. A titre d'exemples non limitatifs, ces agents additionnels stimulant la production de collagène peuvent être choisis parmi les acides aminés, notamment proline, glycine, hydroxyproline, lysine, les dérivés peptidiques
25 issus du couplage d'acides aminés.

Exemples

Il apparaîtra évident pour l'homme du métier que la présente
30 invention n'est pas limitée aux exemples illustrés et décrits ci-dessous. L'invention comprend chacune des caractéristiques nouvelles ainsi que leurs combinaisons.

Etudes de stabilité

Une étude de stabilité a été réalisée sur une période de 6 mois à partir d'un gel commercial. Les échantillons ont été
5 stérilisés à l'autoclave, puis conservés à une température de 7°C et à température ambiante durant 6 mois. La teneur en vitamine C des échantillons de gel a été analysée par un dosage de la vitamine C résiduelle. L'aspect du gel et sa tenue ont également été évalués par une observation visuelle
10 des caractéristiques organoleptiques du gel.

Les caractéristiques du gel sont contrôlées visuellement en comparaison à un échantillon témoin. La teneur en vitamine C est dosée par HPLC.

15

Le lot testé a été réalisé à partir d'un gel d'acide hyaluronique monophasique commercial purifié de manière à ce qu'il ne contienne plus de solvants ou d'additifs tel que la lidocaïne.

20 Une quantité d'ascorbate de sodium équivalente à 10 % en poids de vitamine C a été générée in situ par adjonction d'une quantité au moins stœchiométrique d'hydrogénocarbonate de sodium sur l'acide ascorbique et 0.08 % en poids de métabisulfite de sodium ont été ajoutés, ainsi que, in fine,
25 la quantité nécessaire d'eau. Les préparations ont été dégazées selon des méthodes de dégazage connues de l'Homme de l'art, parmi lesquelles on peut citer par exemple des méthodes par ultrasons ou la réalisation de cycles vide / azote. Le gel est ensuite mis à gonfler dans un contenant
30 sous atmosphère contrôlée et hermétiquement fermé avant de passer le contenant à l'autoclave, à une température de 121°C pendant 15 minutes.

Exemple 1 (comparatif): stérilisation d'un gel réticulé gonflé sans ajout de vitamine C

Dans un flacon DURAN de 25ml, on introduit le contenu de 5
5 seringues de gel commercial réticulé monophasique. Le gel est stérilisé à l'autoclave à une température de 121°C pendant 15 minutes.

Le gel obtenu après stérilisation est translucide, incolore
10 et conserve un aspect similaire à celui qu'il avait avant le passage à l'autoclave. Le gel n'est pas dégradé du fait de l'absence de vitamine C dans la composition.

Exemple 2 (comparatif): stérilisation d'un gel d'acide
15 hyaluronique avec ajout de vitamine C

Dans un flacon DURAN de 25ml, on place 0,5 g d'acide
ascorbique et 5 ml d'eau. On mélange jusqu'à dissolution
totale, puis on ajoute 194 mg d'acide hyaluronique (HA)
20 obtenu à partir d'une source commerciale et qui a préalablement été isolé sous forme solide d'HA solide purifié.

Le flacon contenant la préparation est hermétiquement fermé
et agité lentement pendant 3 heures, puis laissé à
25 température ambiante pendant 2 jours jusqu'à gonflement complet du gel, puis passé à l'autoclave à 121°C durant 15 minutes pour stérilisation.

Après passage à l'autoclave le gel s'est dégradé en une
30 solution limpide de couleur jaune prononcée.

Exemple 3 : stérilisation d'un gel d'acide hyaluronique, avec ajout de vitamine C et de métabisulfite dans la phase solide sans effectuer d'étape de dégazage

- 5 Les gels sont préparés tel que décrit précédemment, mais en l'absence de dégazage.

	d'acide ascorbique	hydrogéné carbonate de sodium	métabisulfite de sodium	Acide hyaluronique solide	Eau
Echantillon 1	1.0 g (10 % m/v)	0.5 g (5 % m/v)	8 mg (0.08 % m/v)	396 mg (3.96 % m/v)	complément pour 10 ml
Echantillon 2	0.5 g (10 % m/v)	0.25 g (5 % m/v)	50 mg (1% m/v)	192 mg (3.84 % m/v)	complément pour 5 ml

Avec 1 %m/v correspondant à une concentration massique de 1 g par 100ml.

Dans les 2 cas, le gel conserve son aspect gélifié sans différence visuellement significative de texture par rapport au gel commercial. Il présente toutefois une coloration jaune après passage à l'autoclave.

L'augmentation par un facteur 12.5 de la concentration en métabisulfite entre les 2 essais, ne permet pas de résoudre le problème.

20

Exemple 4 (comparatif): stérilisation d'un gel d'acide hyaluronique avec ajout de vitamine C, sans métabisulfite, avec une étape de dégazage.

Exemple 4	d'acide ascorbique	Hydrogéné- carbonate de sodium	Métabi- sulfite de sodium	Acide hyaluronique solide	Eau
Quantités	1.0 g	0.5 g	-	302 mg	8.44 ml
% en poids	9.76	4.88	-	2.95	82.41

Dans un flacon DURAN de 25ml, on introduit 1,0 g d'acide ascorbique, 0,5 g d'hydrogénocarbonate de sodium et 302 mg d'HA solide isolé depuis le gel commercial. On ajoute 8,44 ml d'eau et on referme directement le flacon. Un dégagement gazeux est observé dès l'ajout de l'eau. On referme directement le flacon et on attend la dissolution des réactifs. On entrouvre deux fois le flacon rapidement pour évacuer la surpression liée à la libération de CO₂ et on poursuit le dégazage par une méthode classique connue, puis l'échantillon ainsi dégazé et hermétiquement fermé est laissé pendant 2 jours à température ambiante le temps du gonflement. Le gel, une fois gonflé, est stérilisé à l'autoclave à une température de 121°C pendant une durée de 15 minutes.

Après passage à l'autoclave, le gel conserve son aspect sans différence visuellement significative de texture par rapport au gel commercial. Le gel présente toutefois une coloration jaune.

Exemple 5 (invention): Stérilisation d'un gel d'acide hyaluronique avec ajout de vitamine C et de métabisulfite à

une concentration de 0.08 % et dégazage avant gonflement et passage à l'autoclave.

Exemple 5	d'acide ascorbique	Hydrogéné-carbonate de sodium	métabisulfite de sodium	HA solide	Eau
Quantités	1.0 g	0.5 g	8.0 mg	300mg	8.44ml
% en poids	9.76	4.88	0.08	2.93	82.36

- 5 Dans un flacon DURAN de 25ml, on introduit 1 g d'acide ascorbique, 0,5 g d'hydrogénécarbonate de sodium, 8 mg de métabisulfite de sodium et 300 mg d'HA solide isolé depuis le gel commercial. On ajoute rapidement 8,44 ml d'eau. Un dégagement gazeux s'ensuit dès l'ajout de l'eau. On referme
- 10 directement le flacon jusqu'à la dissolution des réactifs. On entrouvre deux fois le flacon rapidement pour évacuer la surpression liée à la libération de CO₂ et on poursuit le dégazage par une méthode classique, puis l'échantillon ainsi dégazé et hermétiquement fermé est laissé à température
- 15 ambiante le temps du gonflement total du gel soit 4 jours dans le cas présent. Le gel, une fois gonflé, est stérilisé à l'autoclave à une température de 121°C pendant une durée de 15 minutes.
- 20 Après passage à l'autoclave. Le gel conserve son aspect sans différence visuellement significative de texture par rapport au gel commercial. Le gel est également incolore et ne présente pas de coloration jaune.

Exemple 6 (invention): Stabilité d'un gel d'acide hyaluronique avec ajout de vitamine C et de métabisulfite et dégazage avant passage à l'autoclave.

5 Plusieurs échantillons de gels ont été préparés comme décrit dans l'exemple 5 et leur stabilité a été mesurée à température ambiante et à 7°C.

Après 6 mois de conservation dans des flacons hermétiquement
10 fermés, les gels initialement stérilisés et conservés à 7°C ou à température ambiante, dans les 2 cas, restent stables et conservent leur aspect gel sans différence visuellement significative de texture par rapport au gel initial et aucune coloration jaune ne se développe.

15 La teneur en ascorbate dosé sous forme d'acide ascorbique après acidification de l'échantillon reste stable et confirme la stabilité de l'actif dans ces conditions (Figures 1 et 2). Le passage à l'autoclave n'induit pas de modifications significatives d'aspect ni au niveau de la concentration en
20 vitamine C.

Les pourcentages résiduels en vitamine C sont supérieurs à 97% après 5 mois de conservation dans les deux conditions de température. On observe cependant une légère diminution au cours du dernier mois, peu significative avec une variabilité
25 maximale de 3% liée à la méthode, avec un pourcentage résiduel situé autour de 93%.

On constate que le pH des gels n'évolue pas sur une période de 6 mois, ce qui démontre la stabilité des actifs présents dans le gel (Figure 3).

30

Après 6 mois, aucun changement qualitatif d'aspect n'est observé (couleur, viscosité, texture ...), le pH n'a pas varié de manière significative. La concentration en vitamine C

reste stable les 5 premiers mois, et semble décroître très légèrement au cours du dernier mois pour obtenir un taux résiduel après 6 mois qui est supérieur à 94 % et 92 % respectivement à 7°C et à température ambiante.

M

18

Revendications

BE 2013/0295

2013/0295

1. Procédé de fabrication d'un gel aqueux comprenant de l'acide hyaluronique, de la vitamine C et un agent stabilisant qui est du métabisulfite de sodium comprenant les étapes suivantes:

- a) préparation d'un mélange comprenant de l'acide hyaluronique réticulé ou non et/ou l'un de ses sels de masse molaire comprise entre 1000 Da et 10 MDa, de 0.1 à 20.0 % en poids de vitamine C sous forme d'acide ascorbique en poids de vitamine C sous sa forme acide, ou son équivalent en ascorbate provenant d'un sel de vitamine C, de 0.01 à 1.00% en poids de métabisulfite de sodium et d'une solution aqueuse ajoutée de façon à ce que la teneur en acide hyaluronique soit comprise entre 0.01 et 100 mg/ml afin de former un hydrogel.
- b) Dégazage du mélange avant que l'hydrogel en formation ne gonfle complètement.

2. Procédé selon la revendication 1, tel que le mélange de l'étape a) comprend de 2 à 10 % en poids de vitamine C sous sa forme acide, ou son équivalent en ascorbate provenant d'un sel de vitamine C et 0.08 à 1% en poids de métabisulfite de sodium.

3. Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 2, tel que lors de l'étape a) de mélange, l'acide hyaluronique et/ou l'un ses sels, réticulé ou non, la vitamine C sous sa forme acide, ou son équivalent en ascorbate provenant d'un sel de vitamine C et le métabisulfite de sodium, sont utilisés sous une forme solide, puis mélangés à la solution aqueuse.

4. Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 2, tel qu'une solution aqueuse comprenant la vitamine C, sous sa forme acide, ou son équivalent en ascorbate provenant d'un sel de vitamine C et le métabisulfite de sodium est préparée au préalable, puis est ensuite utilisée pour gonfler un gel d'acide hyaluronique préalablement préparé, mais partiellement gonflé

5. Procédé selon une quelconque des revendications précédentes, tel que l'étape de dégazage est réalisée par ultrasons et/ou par alternance de cycles d'aspiration et d'ajout de gaz inerte.

6. Procédé selon une quelconque des revendications précédentes, tel que de l'hydrogénocarbonate de sodium est ajouté dans le mélange.

7. Procédé selon une quelconque des revendications précédentes, tel que qu'au moins un additif sélectionné parmi le groupe consistant en agents anesthésiants, agents anti-ecchymotiques, agents stimulants la production d'acide hyaluronique et les agents stimulant la production de collagène est ajouté dans le mélange.

8. Procédé selon une quelconque des revendications 6 à 7, tel que lors de l'étape a) de mélange, l'acide hyaluronique, la vitamine C sous sa forme acide, ou son équivalent en ascorbate provenant d'un sel de vitamine C, le métabisulfite de sodium, l'additif éventuel et l'hydrogénocarbonate sont utilisés sous une forme solide puis mélangés à la solution aqueuse.

9. Procédé selon une quelconque des revendications 6 à 7, tel que lors de l'étape a) de mélange, la solution aqueuse est préparée au préalable et comprend la vitamine C sous sa forme acide, ou son équivalent en ascorbate provenant d'un sel de vitamine C, le métabisulfite de sodium, l'additif éventuel et l'hydrogénocarbonate ; la solution aqueuse est ensuite utilisée pour gonfler un gel d'acide hyaluronique préalablement préparé, mais partiellement gonflé.

10. Procédé selon une quelconque des revendications précédentes, tel qu'il comprend les étapes supplémentaire suivantes:

- c) maintenir le gel ainsi obtenu sous une atmosphère inerte;
- d) laisser le gel gonfler complètement;
- e) stériliser le gel.

1

20

BZ 2513 / 0295

11. Procédé selon la revendication 10, tel que le gel est stérilisé par autoclave. ^{2013/0295}

12. Composition aqueuse gélifiée susceptible d'être obtenue selon le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

13. Composition aqueuse gélifiée telle que définie dans la revendication 12 pour son utilisation comme gel injectable volumateur en médecine esthétique et reconstructrice.

14. Composition aqueuse gélifiée telle que définie dans la revendication 12 pour son utilisation comme gel injectable contre les problèmes articulaires en rhumatologie.

15. Composition aqueuse gélifiée telle que définie dans la revendication 12 conditionnée en seringue.

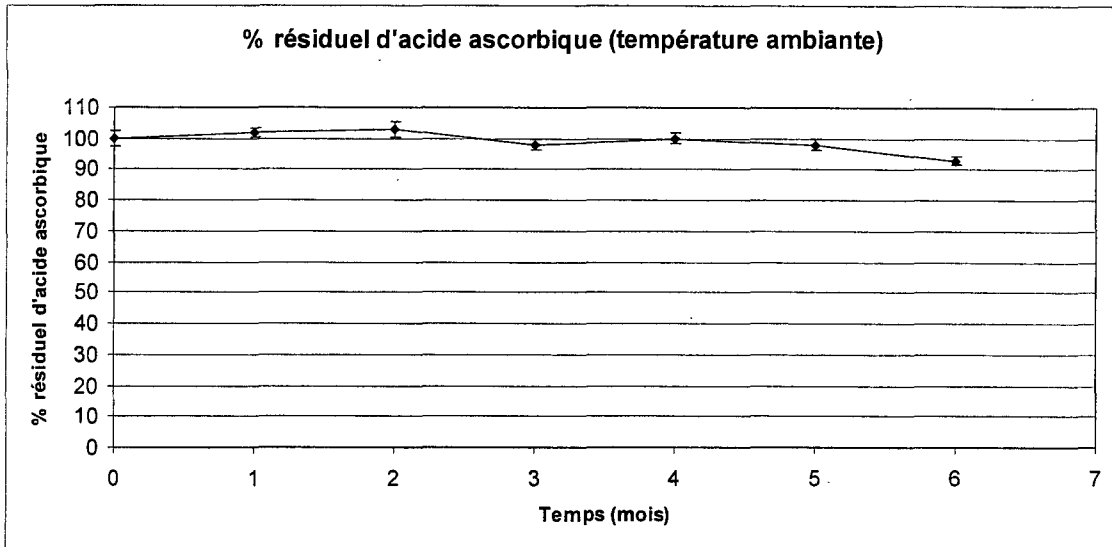
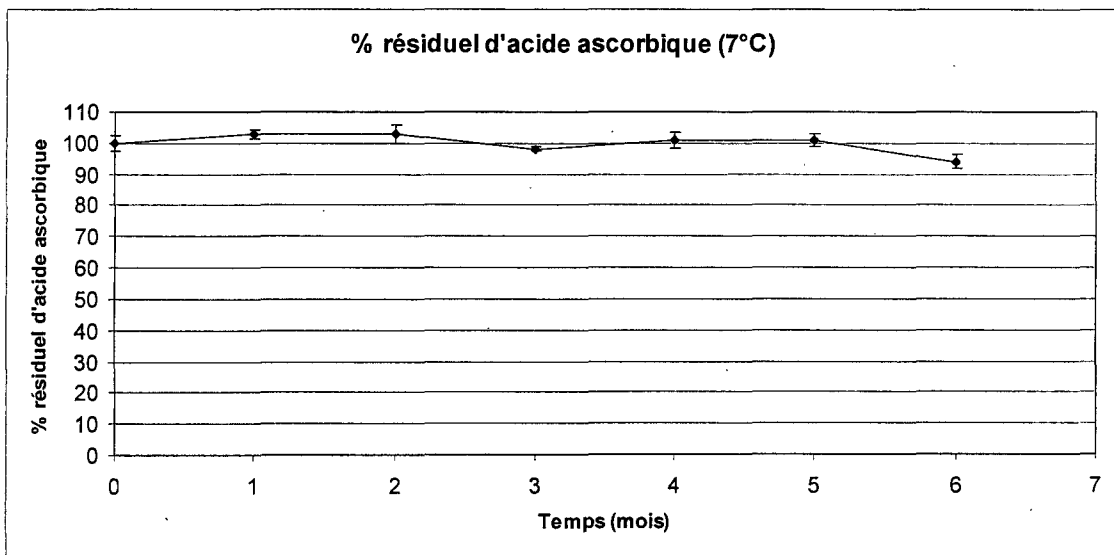


Figure 1



5 Figure 2

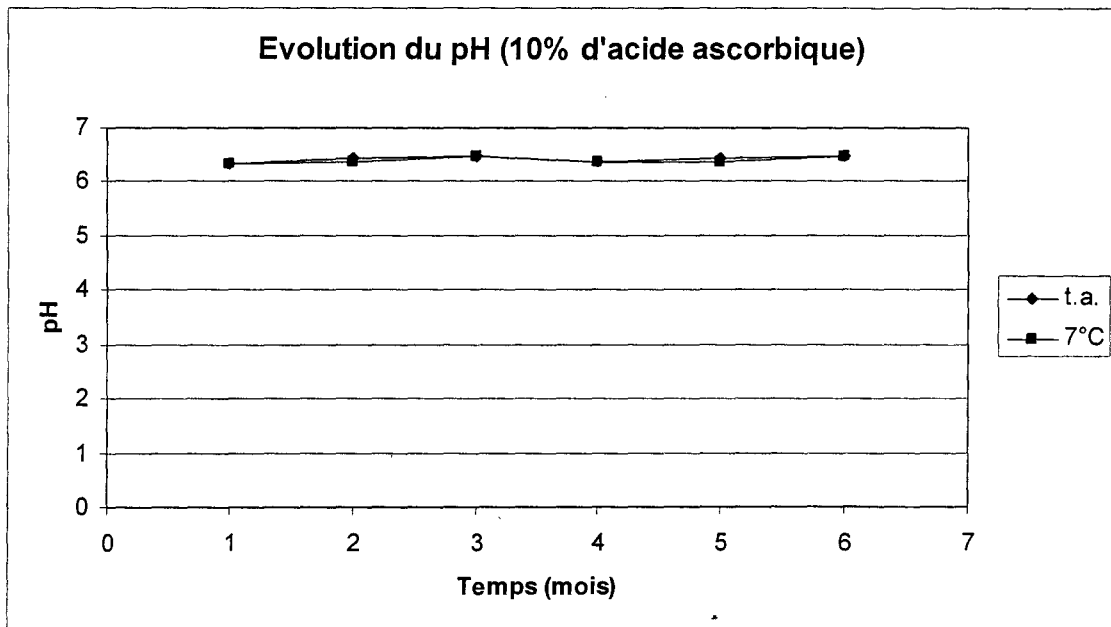


Figure 3

SR-N.NP

Numero de la demande nationale



RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
 de la loi belge sur les brevets d'invention
 du 28 mars 1984

BO 10669
 BE 201300295

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	FR 2 948 286 A1 (THOREL JEAN-NOEL [FR]; GATTO HUGUES [FR]) 28 janvier 2011 (2011-01-28) * page 12, ligne 28 - page 14, ligne 2 * * page 15, ligne 34 - page 16, ligne 16 * -----	1,3-9,14	INV. A61K8/67 A61K8/73 A61K8/04 A61K8/19 A61K8/23
X	DE 10 2009 008940 A1 (LUDL ROLF [DE]; VOSS ECKART [DE]) 19 août 2010 (2010-08-19) * alinéa [0019] * * revendications 1-8,15-16; exemples A,4 * * alinéas [0006] - [0012] * -----	1,3,4,6,7	A61K31/375 A61K31/728 A61K33/08 A61K33/10 A61K9/00 A61Q19/08
X	W0 02/15860 A1 (IOANNIDES TIM [US]) 28 février 2002 (2002-02-28) * page 30, ligne 30-31; revendication 9; tableau 3 * * page 10, ligne 2-3 * -----	1-7	
E	W0 2013/070775 A1 (BARD INC C R [US]) 16 mai 2013 (2013-05-16) * le document en entier * -----	1-16	
X	US 2011/172180 A1 (GOUSSE CECILE [FR] ET AL) 14 juillet 2011 (2011-07-14) * alinéas [0021] - [0026], [0033]; revendications 1-5,7-16; exemples 2-33 * * alinéas [0006] - [0008] * -----	1-16	
X	W0 2011/086458 A1 (ALLERGAN IND SAS [FR]; GOUSSE CECILE [FR]; LEBRETON PIERRE F [FR]; PR0) 21 juillet 2011 (2011-07-21) * alinéa [0134]; exemples 3-7 * * exemples 34-38,40-42 * * alinéas [0009], [0014], [0028] * -----	1-16	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		31 janvier 2014	Nopper, Agathe
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>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</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>..... & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2
 EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 10669
BE 201300295

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

31-01-2014

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2948286 A1	28-01-2011	CN 102497851 A	13-06-2012
		EP 2459162 A2	06-06-2012
		FR 2948286 A1	28-01-2011
		JP 2013500315 A	07-01-2013
		KR 20120089433 A	10-08-2012
		US 2012121534 A1	17-05-2012
		WO 2011015744 A2	10-02-2011

DE 102009008940 A1	19-08-2010	AUCUN	

WO 0215860 A1	28-02-2002	AU 8657801 A	04-03-2002
		WO 0215860 A1	28-02-2002

WO 2013070775 A1	16-05-2013	US 2013116571 A1	09-05-2013
		WO 2013070775 A1	16-05-2013

US 2011172180 A1	14-07-2011	US 2011172180 A1	14-07-2011
		US 2012232030 A1	13-09-2012
		US 2013072453 A1	21-03-2013

WO 2011086458 A1	21-07-2011	AU 2011206389 A1	09-08-2012
		CA 2786968 A1	21-07-2011
		EP 2523701 A1	21-11-2012
		JP 2013517263 A	16-05-2013
		KR 20120125293 A	14-11-2012
		US 2011171310 A1	14-07-2011
		WO 2011086458 A1	21-07-2011

SR-N-NP



OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO10669	Date du dépôt (jour/mois/année) 26.04.2013	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE201300295
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K8/67 A61K8/73 A61K8/04 A61K8/19 A61K8/23 A61K31/375 A61K31/728 A61K33/08 A61K33/10 A61K9/00 A61Q19/08			
Déposant AURIGA INTERNATIONAL			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

	Examineur Nopper, Agathe
--	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201300295

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - un listage de la ou des séquences
 - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - sur papier
 - sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - remis ultérieurement
3. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	10-13, 15, 16
	Non : Revendications	1-9, 14
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-16
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-16
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VI Certains documents cités

 Certains documents publiés**voir le rapport de recherche** Divulgations non écrites

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 FR 2 948 286 A1 (THOREL JEAN-NOEL [FR]; GATTO HUGUES [FR]) 28 janvier 2011 (2011-01-28)
- D2 DE 10 2009 008940 A1 (LUDL ROLF [DE]; VOSS ECKART [DE]) 19 août 2010 (2010-08-19)
- D3 WO 02/15860 A1 (IOANNIDES TIM [US]) 28 février 2002 (2002-02-28)
- D5 US 2011/172180 A1 (GOUSSE CECILE [FR] ET AL) 14 juillet 2011 (2011-07-14)
- D6 WO 2011/086458 A1 (ALLERGAN IND SAS [FR]; GOUSSE CECILE [FR]; LEBRETON PIERRE F [FR]; PRO) 21 juillet 2011 (2011-07-21)

----- [absence de nouveauté] -----

La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications **1-9,14** n'étant pas nouveau.

Interprétation des revendications:

Le terme " ou son *équivalent* en ascorbate" utilisé dans les revendications 1,4,10 manque de clarté et ne permet pas à l'homme du métier d'identifier les composés couverts par cette définition (s'agit-il des sels de l'acide ascorbique, d'esters de l'acide ascorbique?)

Le terme " agent *stabilisant*" utilisé dans les revendications 1,3-6,10,11-12 manque de clarté et ne permet à l'homme du métier d'identifier les composés couverts par cette définition (l'effet *stabilisant* s'applique-t-il pour la composition, l'acide hyaluronique, l'acide ascorbique??)

La revendication (indépendante) 4 définit dans son préambule un produit alors qu'elle se réfère par la suite aux différentes étapes du procédé de fabrication dudit produit. Ce type de revendication est admissible uniquement si le produit est considéré comme nouveau et inventif, ce qui ne semble pas être le cas présentement au vu de l'art antérieur cité (voir plus bas). Dans ce cas de figure, lors de l'examen de la nouveauté, les caractéristiques se référant au procédé ne seront pas prises en compte (la revendication se réfère en fait au produit en tant que tel). A noter que

l'objet de la revendication 10 se référant à la méthode de fabrication du gel tel que défini dans les revendications précédentes est redondant avec l'objet de la revendication 4.

Les revendications 3,5-6,11-12 se réfèrent à la vitamine C et l'acide hyaluronique. Or, dans les revendications principales 1, 4 et 10 auxquelles elles se réfèrent la vitamine C et l'acide hyaluronique englobent plusieurs composés:

- l'acide hyaluronique réticulé **ou** non, **ou** l'un de ses sels de masse molaire comprise entre 1000 Da et 10 MDa;
- la vitamine C sous sa forme acide **ou** son "équivalent" en ascorbate.

Cette discordance engendre un manque de clarté des revendications 3,5-6,11-12.

D1 (voir page 12 ligne 28-page 14 ligne 2; page 15 ligne 34-page 16 ligne 16) dévoile un gel injectable pour le traitement des rides comprenant un milieu de croissance des fibroblastes et de l'acide hyaluronique sous forme de hyaluronate de sodium de poids moléculaire compris entre 1,3 et 1,8 MDa. Le milieu de croissance des fibroblastes comprend du bicarbonate de sodium (0-2000mg/l) et de l'acide ascorbique (0,1-10 mg/l). D1 détruit par conséquent l'objet des revendications 1,3-9,14.

D2 (voir exemples A et 4) dévoile une composition aqueuse gélifiée comprenant un mélange d'acide hyaluronique de courte chaîne (50 kDa)(1% en poids) et longue chaîne (1500kDa)(1% en poids) combiné à un épaississant de type acrylate (Tego® Carbomer 342 ER)(0,5% en poids) permettant de stabiliser la structure du gel (voir D2, §[0019]) (= agent "stabilisant"), et de l'ascorbyl phosphate de magnésium (= "équivalent" en ascorbate de vitamine C)(3% en poids). D2 détruit par conséquent l'objet des revendications 1,3-4,6-7.

D3 (voir tableau 3; revendication 9; page 30 lignes 30-31) dévoile une composition aqueuse gélifiée pour traiter les rides et hydrater la peau (utilisation en médecine esthétique ; voir D3, page 10 lignes 2-4) comprenant du gel d'aloé véra comme base (72% en poids), de l'acide ascorbique (10% en poids) de l'acide hyaluronique (0,5% en poids) et du métabisulfite de sodium (0,25% en poids). D3 détruit par conséquent l'objet des revendications 1-7.

----- [absence d'activité inventive] -----

L'objet des revendications **1-9,14** n'étant pas nouveau, l'activité inventive de ces revendications ne peut être reconnue.

Concernant l'objet des revendications **10-13,15-16**, l'analyse suivante est présentée au Demandeur basée sur une approche "problème-solution".

Le problème technique à la base de la demande est présenté comme la mise au point d'un gel aqueux comprenant de l'acide hyaluronique, réticulé ou non ou l'hyaluronate correspondant et de la vitamine C sous forme libre et/ou de l'un de ses sels suffisamment stable pour être stérilisé par passage à l'autoclave et conditionné pour pouvoir être stocké pendant plusieurs mois sans dégradation notable du gel (voir page 4 lignes 12-19).

D5 et D6 sont considérés de manière équivalente comme l'art antérieur le plus proche de la demande car ils abordent tous les deux le problème de la stabilité de compositions aqueuses gélifiées comprenant l'association d'acide hyaluronique et d'acide ascorbique sous forme libre ou l'un de ses dérivés (voir D5, §[0007-0011]; D6, §[009,014]). D5 et D6 démontrent que de telles compositions ne sont stables que lorsqu'un dérivé de l'acide ascorbique choisi parmi l'ascorbyl phosphate de magnésium ou de sodium et l'acide ascorbique 2-glucoside (AA2G) est utilisé (voir D5, exemples 2-6; D6, exemples 3-7).

L'objet des revendications 10-13,15-16 diffère de D5 et D6 en ce que la composition gélifiée utilisée comprend en plus de l'association d'acide hyaluronique et d'acide ascorbique sous forme acide ou son "équivalent" en ascorbate, un agent "*stabilisateur*" étant préférentiellement le métabisulfite de sodium.

Le demandeur a démontré de manière convaincante par des tests comparatifs (voir page 13 ligne 21- page 17 ligne 24) que la présence de métabisulfite de sodium dans un gel commercial comprenant de l'acide hyaluronique et de l'ascorbate de sodium permettait d'obtenir une meilleure stabilité du gel.

Cet effet n'est toutefois pas démontré pour tous les agents ayant un effet "*stabilisant*" connu. Ces tests ne sont donc pas suffisants pour permettre d'en déduire que l'effet démontré puisse être obtenu sur toute la portée des revendications.

En conséquence l'effet démontré ne peut être pris en considération pour justifier la présence d'une activité inventive et le problème technique doit être reformulé.

Le problème technique objectif résolu par rapport à D5 ou D6 réside en fait en la mise au point ou mise à disposition d'une composition aqueuse gélifiée alternative qui comprend de l'acide hyaluronique et de l'acide ascorbique ou l'un de ses dérivés.

Ce problème est déjà résolu dans D5 et D6 en associant l'acide hyaluronique avec de l'ascorbyl phosphate de magnésium ou de sodium ou de l'acide ascorbique 2-glucoside (AA2G).

Le rajout d'additif, de conservateurs ou d'exipients dans le gel tel que le métabisulfite de sodium est aussi une alternative suggérée dans D6 (voir §[00134]).

Ainsi, la mise au point d'une composition aqueuse gélifiée comprenant au moins l'association d'acide hyaluronique, d'acide ascorbique ou l'un de ses dérivés et du métabisulfite de sodium est l'une des alternatives qui s'offrirait à l'homme du métier pour résoudre le problème objectif posé, sans faire preuve d'esprit inventif.

L'objet des revendications 1-16 n'est donc pas inventif.

Ad point VI

Certains documents cités

Certains documents publiés

N° de demande N° de brevet	Date de publication <i>(jour/mois/ année)</i>	Date de dépôt <i>(jour/mois/ année)</i>	Date de priorité <i>(revendication valable)</i> <i>(jour/mois/ année)</i>
WO 2013/070775 (D4)	16.05.2013	07.11.2012	07.11.2011 23.11.2011

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

Manque de clarté de certaines revendications (voir Point V plus haut)