

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042871**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.30

(21) Номер заявки
202091062

(22) Дата подачи заявки
2018.11.09

(51) Int. Cl. **C08B 37/08** (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

(54) **КАРБОКСИЛХИТОЗАН**

(31) **1761323**

(32) **2017.11.28**

(33) **FR**

(43) **2020.08.07**

(86) **PCT/EP2018/080767**

(87) **WO 2019/105719 2019.06.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КИОМЕД ФАРМА (BE)

(72) Изобретатель:
**Шоссон Микаэль, Дуэтт Пьер, Готье
Сандрин Эмилия, Ваесен Филип,
Шуман Утэ, Рокасальбас Гильермо
(BE)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) Y.F. POON ET AL.: "Cytocompatible Hydrogels Based on Photocrosslinkable Methacrylated O-Carboxymethylchitosan with Tunable Charge: Synthesis and Characterization", *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS*, vol. 17, no. 13, 3 September 2007 (2007-09-03), pages 2139-2150, XP055482200, DE, ISSN: 1616-301X, DOI: 10.1002/adfm.200600420, the whole document
DI MARIO F. ET AL.: "Chitin and chitosan from Basidiomycetes", *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, ELSEVIER BV, NL, vol. 43, no. 1, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 8-12, XP022705839, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2007.10.005 [retrieved on 2008-06-05] the whole document

(57) Изобретение относится к карбоксиалкилхитозану, содержащим его композициям, способу его получения и различным его применениям, в частности, в области терапии, ревматологии, офтальмологии, эстетической медицины, пластической хирургии, хирургии внутренних органов, дерматологии или косметической области.

B1

042871

042871
B1

Изобретение относится к карбоксиалкилхитозану, композициям, его содержащим, способу его получения и разнообразным применениям, в частности, в области терапии, ревматологии, офтальмологии, эстетической медицины, пластической хирургии, хирургии внутренних органов, дерматологии или косметике.

Существующий уровень техники

Производные хитозана уже известны, в частности, раскрыты в патентных заявках Kiomed Pharma, опубликованных под номерами WO 2016/016463 и WO 2016/016464, и соответствующих патентах. Эти патентные заявки нацелены на физические, химические или физико-химические свойства производных хитозана. Тем не менее, остается потребность в улучшении этих композиций, в частности, в контексте терапевтического лечения таким способом, чтобы обеспечить пациентам, которым может потребоваться применение таких композиций, оптимизированный терапевтический эффект и, в частности, увеличить соотношение польза/риск.

Возможно получение растворимого хитозана посредством увеличения степени ацетилирования (DA) путем реацетилирования грибного хитозана. Действительно, можно получить составы, растворимые при физиологическом pH, путем реацетилирования грибного хитозана, однако отмечается следующее:

очень быстрая деградация *in vivo* или в аналогичных условиях;

у субъекта, которому вводят или имплантируют этот хитозан, например, путем инъекции или внутрисуставной имплантации, возникает иммунная реакция;

хитозан не подходит для таргетных применений и, следовательно, не гарантирует достаточно удовлетворительное терапевтическое применение хитозана, в частности, посредством инъекции или внутрисуставной имплантации.

Имеются различные публикации, касающиеся карбоксиалкилирования хитозана и, в частности, карбоксиметилирования хитозана, главным образом, с целью солюбилизации хитозана. В теории, хитозан имеет формулу, не содержащую N-ацетилглюкозаминового звена, но на практике хитозан получают из хитина, который, со своей стороны, содержит N-ацетилглюкозаминовые звенья, и хитозан имеет определенную степень ацетилирования (DA), которая представляет собой долю N-ацетилглюкозаминовых звеньев в хитозане. Степень ацетилирования (DA) хитозана, как правило, является низкой. Выше, особенно выше 30%, это, как правило, реацетилированный хитозан.

Кроме того, китайская патентная заявка CN1431229A касается карбоксиметилированных производных хитозана, в частности, их гидратирующей способности, однако указанная патентная заявка ограничивается этим отличительным признаком.

Карбоксиметилирование хитина, полученного из животных источников, в частности, из ракообразных, также рассматривалось в предшествующем уровне техники. Однако хитин ракообразного происхождения плохо поддается замещению; в частности, необходимо его заморозить и подщелачивать для обеспечения возможности его замещения (см., например, китайскую заявку на патент CN106474569). Этот процесс сложно реализовать и, в частности, осуществить в промышленном масштабе. С другой стороны, такой процесс замещения, основанный на хитине из ракообразных, является затратным с точки зрения энергии, имеет низкую воспроизводимость, и может разлагать полимер и гидролизовать ацетильные группы N-ацетилглюкозаминовых звеньев в значительной степени, при этом являясь также трудно контролируемым.

Цели изобретения

Целью изобретения является решение технической проблемы, связанной с обеспечением соответствующего производного хитозана, которое является подходящим для применения у людей или животных, в частности, в области терапии, ревматологии, офтальмологии, эстетической медицины, пластической хирургии, хирургии внутренних органов, дерматологии или косметики.

Более конкретно, целью изобретения является решение технической проблемы, связанной с обеспечением подходящего производного хитозана, которое является пригодным для применения у людей или животных в терапевтической области, и является, в частности, пригодным в качестве вискозоплемента и, в частности, может быть введено в синовиальную жидкость или смешано с ней.

В частности, целью изобретения является решение технической проблемы, связанной с обеспечением восстановленной синовиальной жидкости, то есть композиции, которая восстанавливает свойства сустава, например, путем надления его способностью смазывать поверхности хряща.

Еще одной целью изобретения является решение технической проблемы, связанной с обеспечением производного хитозана или композиции, содержащей его, которая проявляет хорошие свойства и совместимость в смеси с синовиальной жидкостью и, в частности, с синовиальной жидкостью субъекта человека или животного, например, для лечения артикулярной или суставной патологии, или ухудшения указанной синовиальной жидкости.

Целью изобретения также является решение технической проблемы, связанной с обеспечением производного хитозана или содержащей его композиции, которая ограничивает иммунную реакцию субъекта и, в частности, субъекта человека или животного, который получает такое введение, например, путем инъекции производного хитозана или содержащей его композиции.

Еще одной целью изобретения является также решение технической проблемы, связанной с обеспечением производного хитозана или содержащей его композиции, которая обладает характеристиками, имеющими низкую вариабельность в зависимости от рН.

Целью изобретения также является решение технической проблемы, связанной с обеспечением производного хитозана или содержащей его композиции, которая имеет подходящую осмоляльность и значение рН, которое считается пригодным для ее применения в контакте с тканью субъекта человека или животного, и является приемлемой с точки зрения продолжительности жизни *in situ*, иммунологической реакции и/или реакции на чужеродное тело и биомеханических свойств, в зависимости от целевого терапевтического показания, в частности, в контексте регенеративной медицины.

Описание изобретения

Неожиданно было обнаружено, что производное хитозана в соответствии с настоящим изобретением позволяет решить по меньшей мере одну и предпочтительно все технические проблемы, описанные выше в настоящем документе.

В частности, было обнаружено, что производное хитозана грибного происхождения позволяет решить по меньшей мере одну и предпочтительно все описанные или предложенные технические проблемы. В частности, производное хитозана грибного происхождения обеспечивает средства для ограничения иммунного ответа субъекта, которому вводили производное хитозана или содержащую его композицию, как правило, путем инъекции или имплантации.

Настоящее изобретение относится, в соответствии с первым аспектом, к карбоксиалкилхитозану грибного происхождения, имеющему глюкозаминовые звенья, N-ацетилглюкозаминовые звенья и глюкозаминовые звенья, замещенные карбоксиалкильной группой, причем указанный карбоксиалкилхитозан предпочтительно имеет степень замещения карбоксиалкильной группой, которая составляет более 20%, выраженная в виде количества молей заместителя по отношению к количеству молей всех звеньев.

Внимание также обращается на производное хитозана или замещенное производное хитозана.

В частности, было обнаружено, что производное хитозана, демонстрирующее электростатический заряд (характеризующийся его дзета-потенциалом) в диапазоне рН, приблизительно соответствующем рН среды, в которой его вводят, и, в частности, при рН, равном 7,5, то есть ниже определенного значения, позволило решить по меньшей мере одну и предпочтительно все из описанных или предложенных технических проблем. В частности, такое производное хитозана обеспечивает средства для ограничения иммунного ответа у субъекта, которому вводят производное хитозана или его содержащую композицию, как правило, путем инъекции или имплантации.

Настоящее изобретение относится, в соответствии со вторым аспектом, к производному хитозана, имеющему глюкозаминовые звенья, N-ацетилглюкозаминовые звенья и глюкозаминовые звенья, замещенные карбоксиалкильной группой, при этом указанный карбоксиалкилхитозан имеет дзета-потенциал, измеренный при рН 7,5, который равен -10 мВ или менее, и предпочтительно равен -15 мВ или менее.

Хитозан, например, упоминается в Chemical Abstracts Service под регистрационным номером (номер CAS) 9012-76-4.

Хитозан, используемый для изобретения, преимущественно имеет грибное происхождение и предпочтительно получен из мицелия гриба типа Ascomycetes, и, в частности, из *Aspergillus niger*, и/или из гриба Basidiomycetes, и, в частности, *Lentinula edodes* (шиитакэ) и/или *Agaricus bisporus* (шампиньон). Предпочтительно хитозан получен из *Agaricus bisporus*. Хитозан предпочтительно обладает высокой степенью чистоты, то есть имеет чрезвычайно низкое содержание примесей, обусловленных его грибным происхождением или производственным процессом, и микробиологическим качеством, которое совместимо с его применением в качестве имплантата или фармацевтической композиции. Одним из способов получения хитозана является способ, описанный в патентах WO 03/068824 (EP 1483299; US 7556946).

Как правило, хитин помещают в водную суспензию в присутствии гидроксида натрия, после чего среду нагревают до высокой температуры в течение переменной продолжительности, которая изменяется в зависимости от желаемой молекулярной массы. Затем хитозан очищают путем солиubilизации в кислой среде и осаждают в щелочной среде, затем промывают и сушат.

Предпочтительно хитозан имеет достаточную степень чистоты, подходящую для фармацевтического применения.

Хитозан преимущественно очищают и затем предпочтительно сушат. После очистки способ по изобретению может включать стадию сушки карбоксиалкилхитозана, затем необязательно его измельчение с получением порошка. Карбоксиалкилхитозан может быть высушен, например, путем выпаривания воды, например, с помощью процесса распылительной сушки, процесса с псевдооживленным слоем или с помощью термической сушки в вакууме или при атмосферном давлении, или даже путем лиофилизации.

Карбоксиалкилхитозан может быть солиubilизирован в водном растворе и, например, в воде фармацевтически приемлемого качества, подходящей для инъекции или имплантации в организм и, в частности, в организм человека.

Полученный хитозан может иметь различную молекулярную массу, как правило, находящуюся в диапазоне от 10000 до 500000.

В соответствии с одним вариантом средняя молекулярная масса составляет от 20000 до 60000.

В соответствии с другим вариантом средняя молекулярная масса составляет от 60000 до 100000.

В соответствии с другим вариантом средняя молекулярная масса составляет от 100000 до 120000.

В соответствии с другим вариантом средняя молекулярная масса составляет от 120000 до 150000.

В соответствии с другим вариантом средняя молекулярная масса составляет от 150000 до 220000.

В соответствии с другим вариантом средняя молекулярная масса составляет от 220000 до 300000.

В соответствии с другим вариантом средняя молекулярная масса составляет от 300000 до 500000.

В случае, когда хитозан является поперечно-сшитым, молекулярная масса поперечно-сшитого полимера разумеется может быть гораздо выше.

Можно гидролизовать хитозан, чтобы уменьшить его молекулярную массу.

Предпочтительно в настоящем документе средняя молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу по вязкости (M_v), рассчитанную на основе характеристической вязкости по уравнению Марка-Хаувинка. Характеристическая вязкость измеряется с помощью капиллярной вискозиметрии с использованием капиллярного вискозиметра типа Ubbelohde в соответствии со способом, описанным в монографии 2.2.9 Европейской фармакопеи. Измерение времени протекания раствора через подходящую капиллярную трубку (Lauda, например, капиллярную трубку Ubbelohde 510 01 диаметром 0,53 мм) выполняется с помощью автоматического вискозиметра I-Vise (Lauda), сначала при начальной концентрации хитозана, затем для нескольких разбавлений, например, в соответствии с рекомендациями в монографии 2.2.9. Пониженная характеристическая вязкость выводится для каждой из концентраций. Пониженную вязкость наносят на график в зависимости от температуры, и значение при концентрации 0 экстраполируют, чтобы вывести из нее характеристическую вязкость. Например, необходимо построить график пониженной вязкости ($[\eta]_{red}$ в мл/г) i разбавлений в зависимости от концентрации C i разбавлений (г/мл) в соответствии с формулой 5.

$$\text{Формула 2. } [\eta]_{red} = (t_1 - t_0) - (1 - C).$$

Чтобы рассчитать среднюю вискозиметрическую массу, применяется уравнение Марка-Хаувинка с константами k и α , рекомендованными Rinaudo et al. (в Int J Biol Macromol, 15, 281, 1993), в соответствии со степенью ацетилирования (DA) хитозана, согласно одной из следующих трех формул.

$$\text{Формула 3. } M_v = ([\eta] / 0,082)^{1/0,76}, \text{ для DA 2\%};$$

$$\text{Формула 4. } M_v = ([\eta] / 0,076)^{1/0,76}, \text{ для DA 10\% (например, 11,5\%)};$$

$$\text{Формула 5. } M_v = ([\eta] / 0,074)^{1/0,76}, \text{ для DA 20\% (например, 21\%)}.$$

Для промежуточных значений DA выполняется линейная интерполяция для расчета средней вискозиметрической массы (M_v).

Предпочтительно используемый хитозан имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 120000 до 150000 или даже в диапазоне от 150000 до 220000, или более того даже в диапазоне от 220000 до 300000, или даже выше 300000 и обычно равную до 500000.

Также можно измерить конечную молекулярную массу карбоксиалкилхитозана: например, можно измерить его характеристическую вязкость с помощью капиллярной вязкости, получая из ее среднюю молекулярную массу (M_w) (предварительно определив параметры K и α карбоксиалкилхитозана), или хроматографическим методом, например, гель-проникающей хроматографией.

Как правило, в карбоксиалкилхитозане в соответствии с изобретением глюкозаминовые звенья представляют собой D-глюкозаминовые звенья (D-глюкозаминовые звенья, N-ацетил-D-глюкозаминовые звенья и при этом по меньшей мере одно из D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозаминовых звеньев является замещенным).

В соответствии с одним вариантом замещенный хитозан имеет замещение только D-глюкозаминовых звеньев.

В соответствии с другим вариантом замещенный хитозан имеет замещение D-глюкозаминовых и N-ацетил-D-глюкозаминовых звеньев одновременно, в которых карбоксиалкильная группа ковалентно связана с аминогруппами только хитозана в соответствии с одним вариантом или одновременно с аминогруппами и гидроксильными группами хитозана в соответствии с другим вариантом.

Замещение является, как правило, только частичным, не все звенья являются обязательно замещенными.

В соответствии с одним вариантом осуществления степень замещения D-глюкозаминовых звеньев, выраженная в количестве молей D-глюкозаминовых звеньев по отношению к количеству молей всех звеньев (D-глюкозаминовых и N-ацетил-D-глюкозаминовых звеньев, замещенных или незамещенных) замещенного хитозана, составляет от 30% до 250%.

В соответствии с одним вариантом осуществления степень замещения карбоксиалкильной группой составляет более 50%, выраженная в количестве молей заместителя по отношению к количеству молей всех звеньев.

В соответствии с одним вариантом осуществления степень замещения D-глюкозаминовых звеньев, выраженная в количестве молей D-глюкозаминовых звеньев по отношению к количеству молей всех звеньев (D-глюкозаминовых и N-ацетил-D-глюкозаминовых звеньев, замещенных или незамещенных) замещенного хитозана, составляет от 50% до 200% и более предпочтительно более 70%.

В соответствии с одним вариантом осуществления степень замещения карбоксиалкильной группой

составляет менее 80%, выраженная в количестве молей заместителя по отношению к количеству молей всех звеньев.

Как правило, замещение осуществляется путем связывания ковалентной связью.

В соответствии с одним вариантом карбоксиалкилхитозан представляет собой N,O-карбоксиалкилхитозан. Доля звеньев, замещенных карбоксиалкильной группой в O-положении (O3 или O6 глюкозаминных и/или N-ацетилглюкозаминных звеньев) и/или в N-положении (глюкозаминных звеньев) варьируется. Степень замещения может, таким образом, составлять более 100%.

Предпочтительно степень замещения (DS) и степень ацетилирования (DA) карбоксиалкилхитозана измеряют с помощью твердофазной углерод-13 спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с использованием спектрометра Bruker Spectrometer (Avance III HD 400 МГц), оснащенного датчиком P1H MAS VTN 400SB BL4 NP / H. Например, спектр регистрируют при температуре окружающей среды, при этом время релаксации составляет от 1 до 8 с и количество сканирований составляет от 64 до 512. Площади сигналов углерода определяют после деконволюции. Рассматриваются следующие атомы углерода: "ацетил CH3" (металльный углерод ацетильной группы N-ацетилглюкозаминных звеньев, замещенных или незамещенных), "C1" (углерод в положении 1 глюкозаминных и N-ацетилглюкозаминных звеньев) и "C=O" (карбонильный углерод карбоксиметильного заместителя и карбонильный углерод C=O ацетильной группы N-ацетилглюкозаминных звеньев, замещенных или незамещенных). Чтобы определить DS заданного карбоксиалкилхитозана, необходимо также регистрировать спектр ЯМР на ядрах углерода 13 предшественника хитозана этого карбоксиалкилхитозана. На основании спектра предшественника хитозана рассчитывается "отношение CSU", то есть отношение площади сигнала группы "ацетил CH3" (металльный углерод ацетильной группы N-ацетилглюкозаминных звеньев) к площади сигнала "C=O" (карбонильный углерод ацетильной группы N-ацетил-D-глюкозаминных звеньев). DA карбоксиалкилхитозана рассчитывают по формуле 1, и DS по формуле 2, где I представляет площадь сигнала рассматриваемого углерода.

$$\text{Формула 1: } DA = \frac{I_{\text{acetyl CH}_3}}{I_{C_1}}$$

$$\text{Формула 2: } DS = \frac{I_{C=O} \cdot I_{\text{CH}_3} / \text{CsU Ratio}}{I_{C_1}}$$

DA и DS могут быть определены с помощью других известных способов для карбоксиалкилхитозанов, например, с помощью протонного ЯМР в водной среде, с использованием магнитно-резонансного спектрометра, например, в соответствии со способом, описанным Liu et al. (в Carb Polym 137, 600, 2016), например, с помощью предварительного гидролиза карбоксиалкилхитозана путем добавления к нему концентрированного раствора дейтерированной соляной кислоты перед анализом.

Если существует другой способ ЯМР, который является более выгодным для надежной оценки степени замещения, следует использовать этот альтернативный способ. Вышеуказанные способы должны быть адаптированы специалистом в данной области в отношении подготовки образца и интегрируемых сигналов, в частности, в зависимости от разрешения, устойчивости и положения протонов сигналов, используемых для расчета степени замещения.

Степень карбоксиалкилирования хитозана может предпочтительно варьироваться от 20% до 250%, предпочтительно от 50% до 200% и, например, от 70% до 170%, выраженная в количестве молей карбоксиалкила по отношению к количеству молей всех звеньев.

В соответствии с одним вариантом степень карбоксиалкилирования хитозана может предпочтительно варьироваться от 40% до 130% и, например, от 70% до 130%, выраженная в количестве молей карбоксиалкила по отношению к количеству молей всех звеньев.

Степень замещения хитозана обычно коррелирует с массовым соотношением исходных реагентов по отношению к хитозану в начале реакции. В качестве карбоксиалкилирующих агентов можно упомянуть хлориды кислот (или их соли, например, монохлорацетат натрия), например, те, которые несут одну или несколько карбоксиметильных, карбоксиэтильных, карбоксипропильных, карбоксибутильных групп и т.д.

В соответствии с одним вариантом настоящее изобретение относится к карбоксиалкилхитозану, в котором алкильная часть карбоксиалкила представляет собой (C₁-C₅)алкильную группу, линейную или разветвленную.

В соответствии с одним вариантом настоящее изобретение относится к карбоксиметилхитозану.

В соответствии с этим вариантом замещенный хитозан представляет собой N-карбоксиалкилированный хитозан.

В соответствии с этим вариантом замещенный хитозан представляет собой O-карбоксиалкилированный хитозан.

В соответствии с этим вариантом замещенный хитозан представляет собой N-карбоксиалкилированный и O-карбоксиалкилированный хитозан.

Предпочтительно дзета-потенциал, измеренный при pH 7,5, равен -18 мВ или менее.

Предпочтительно карбоксиалкилхитозан имеет дзета-потенциал, измеренный при pH 7,5, который равен -22 мВ или менее, и предпочтительно равен -24 мВ или менее.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу от 150000 до 220000 и степень замещения в диапазоне от 50% до 200%, при этом молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с другим конкретным вариантом замещенный хитозан имеет среднюю молекулярную массу от 120000 до 150000 и степень замещения в диапазоне от 70% до 200%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу от 220000 до 300000 и степень замещения в диапазоне от 70% до 200%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с другим конкретным вариантом замещенный хитозан имеет среднюю молекулярную массу от 220000 до 300000 и степень замещения в диапазоне от 50% до 200%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с другим конкретным вариантом замещенный хитозан имеет среднюю молекулярную массу от 300000 до 500000 и степень замещения в диапазоне от 50% до 200%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с другим конкретным вариантом замещенный хитозан имеет среднюю молекулярную массу от 300000 до 500000 и степень замещения в диапазоне от 70% до 200%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу от 120000 до 150000 и степень замещения в диапазоне от 20% до 50%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с другим конкретным вариантом замещенный хитозан имеет среднюю молекулярную массу от 220000 до 300000 и степень замещения в диапазоне от 20% до 50%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с другим конкретным вариантом замещенный хитозан имеет среднюю молекулярную массу от 300000 до 500000 и степень замещения в диапазоне от 20% до 50%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан имеет степень замещения в диапазоне от 20% до 80% и предпочтительно от 40% до 60%, и степень ацетилирования в диапазоне от 20% до 80% и предпочтительно от 30% до 75%.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан имеет степень замещения в диапазоне от 50% до 200% и предпочтительно от 70% до 200%, и степень ацетилирования в диапазоне от 20% до 80% и предпочтительно от 30% до 75%.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан имеет степень замещения в диапазоне от 50% до 200% и предпочтительно от 70% до 200%, и степень ацетилирования в диапазоне от 20% до 50% и предпочтительно от 20% до 40%.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан имеет степень замещения в диапазоне от 50% до 200% и предпочтительно от 70% до 200%, и степень ацетилирования в диапазоне от 50% до 75%.

В соответствии с другим конкретным вариантом замещенный хитозан имеет степень замещения в диапазоне от 90% до 200% и предпочтительно от 90% до 150%, и степень ацетилирования в диапазоне от 20% до 80%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан имеет степень замещения в диапазоне от 90% до 200% и предпочтительно от 90% до 150%, и степень ацетилирования в диапазоне от 20% до 50% и предпочтительно от 20 до 40%.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан имеет степень замещения в диапазоне от 90% до 200% и предпочтительно от 90% до 150%, и степень ацетилирования в диапазоне от 50% до 75%.

В соответствии с одним конкретным вариантом замещенный хитозан предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу от 220000 до 300000, степень замещения в диапазоне от 90% до 200% и предпочтительно от 90% до 150%, и степень ацетилирования в диапазоне от 50% до 75%, причем молекулярная масса предпочтительно записана до замещения.

В соответствии с одним вариантом карбоксиалкилхитозан является поперечно-сшитым. Таким образом, несколько цепей хитозана могут быть поперечно сшиты, например, путем реакции со сшивающим агентом, таким как, например, сшивающие агенты, используемые для поперечного сшивания полисахаридов, такие как, например, генипин, бутилглицидиловый эфир, глутаральдегид, эпихлоргидрин, 1-бром-3,4-эпоксипропан, 1-бром-4,5-эпоксипентан, 1-хлор-2,3-эпитиопропан, 1-бром-2,3-эпитио-пропан, 1-бром-3,4-эпитиобутан, 1-бром-4,5-эпитиопентан, 2,3-дибромпропанол, 2,4-дибромпропанол, 2,5-дибромпентанол, 2,3-дибромпропантоиол, 2,4-дибромбутантоиол и 2,5-дибромпентантоиол эпихлоргидрин, 2,3-дибромпропанол, 1-хлор-2,3-эпитиопропан, диметиламинопропилкарбодимид, окисленный декстран, галловая

кислота, эпигаллокатехин галлат, куркумин, дубильная кислота или даже диизоцианатные соединения, такие как гексаметилендиизоцианат или толуолдиизоцианат.

При использовании поперечно-сшитого карбоксиалкилхитозана молекулярная масса может быть очень высокой.

Путем замещения хитозана можно приготовить раствор карбоксиалкилхитозана, который является растворимым в водном растворе, рН которого варьируется в широких пределах, тогда как незамещенный хитозан растворим только при рН ниже 5,5-6,5. Таким образом, карбоксиалкилхитозан обладает способностью солюбилизироваться при различных значениях рН благодаря присутствию карбоксиалкильных групп, которые модифицируют его профиль растворимости, и, в частности, при физиологическом рН или при рН физиологических жидкостей, которые модифицированы патологией, например, воспалительной патологией. Известно, что рН физиологических жидкостей, таких как синовиальная жидкость сустава, водянистая влага, стекловидное тело и слезы, могут значительно различаться у разных людей из-за различных факторов, таких как возраст, патология и т.д. Следовательно, предпочтительно, чтобы карбоксиалкилхитозан мог оставаться растворимым в широком диапазоне рН, например, от 6,0 до 8,5, или даже от 5,0 до 8,5, или даже от 4,5 до 8,5.

В соответствии с одним вариантом осуществления состав замещенного хитозана имеет осмоляльность от 100 до 700 мОсм/кг, предпочтительно от 200 до 500 мОсм/кг.

Предпочтительно осмоляльность состава замещенного хитозана составляет от 250 до 400 мОсм/кг и предпочтительно от 275 до 325 мОсм/кг.

В соответствии с одним вариантом состав замещенного хитозана имеет осмоляльность, которая совместима с суставом.

В соответствии с одним вариантом состав замещенного хитозана имеет осмоляльность, которая совместима с глазной или внутриглазной поверхностью.

Предпочтительно, чтобы осмоляльность состава замещенного хитозана составляла от 250 до 400 и более конкретно от 250 до 380 мОсм/кг.

Термин "растворимый в воде" означает, что карбоксиалкилхитозан не проявляет какой-либо мутности, видимой невооруженным глазом, при его помещении в водный раствор. В частности, можно подтвердить растворимость, то есть отсутствие какой-либо мутности, раствора карбоксиалкилхитозана при концентрации, например, 1% (мас./мас.) в воде или буфере, например, фосфатном буфере, с оптической плотностью/для оптической плотности менее 0,5 и предпочтительно менее 0,2, измеренной с помощью спектрометрии в видимой УФ-области на длине волны 500 нм, со ссылкой на эталонный резервуар, содержащий только водный растворитель, используемый для измеренного образца, но в отсутствие замещенного хитозана. Другой способ состоит в визуальном осмотре в соответствии с монографией 2.9.20 Европейской фармакопеи. Когда хитозан является недостаточно замещенным, композиция не растворима в удовлетворительном диапазоне рН, например, в диапазоне от 6,0 до 8,5 при температуре окружающей среды.

Степень ацетилирования (DA) хитозана определяют, как, например, описано в патентных заявках WO 2017009335 и WO 2017009346, посредством потенциометрического титрования. Альтернативно, степень ацетилирования (DA) может быть измерена другими способами, известными для хитозана, такими как спектроскопия протонного ядерного магнитного резонанса (ЯМР), твердотельная спектроскопия ЯМР углерод-13, инфракрасная спектрометрия.

Предпочтительно карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования в диапазоне от 5% до 80%, выраженную в количестве молей N-ацетилглюкозаминовых звеньев по отношению к количеству молей всех звеньев. Степень ацетилирования выражается в количестве N-ацетил-D-глюкозаминовых звеньев по отношению к количеству всех присутствующих N-ацетил-D-глюкозаминовых и D-глюкозаминовых звеньев.

Предпочтительно карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования, составляющую от 40% до 80%, выраженную в количестве молей N-ацетилглюкозаминовых звеньев по отношению к количеству молей всех звеньев.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 5% до 20%.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 15% до 25%.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 20% до 45%.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 20% до 30%.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 25% до 40%.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 40% до 50%.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 50% до 60%.

В соответствии с одним вариантом степень ацетилирования составляет от 60% до 75%.

Степень ацетилирования определяют с помощью спектроскопии ЯМР на ядрах углерода-13 или протонного ЯМР в соответствии с тем же самым способом, который используют для определения степени замещения (DS). Карбоксиалкилхитозан предпочтительно имеет контролируруемую степень ацетилирования. Термин "хитозан, имеющий контролируемую степень ацетилирования" следует понимать как относящийся к продукту, для которого степень ацетилирования, то есть доля N-ацетилглюкозаминовых

звеньев, может регулироваться контролируемым образом, в частности, посредством реакции ацетилирования.

Согласно одному варианту, композиция в соответствии с изобретением может быть представлена в форме раствора и не может быть превращена в гель при изменении температуры (не способна к термогелированию).

Согласно одному варианту, реологические характеристики раствора в соответствии с изобретением могут изменяться с температурой, но без прохождения золь-гель перехода. Реологические характеристики раствора в соответствии с изобретением могут, в частности, быть подтверждены модулем упругости (G') и/или модулем потерь (G''), или даже комплексным модулем G^* .

Согласно одному варианту, реологические характеристики раствора в соответствии с изобретением являются по существу постоянными независимо от температуры.

Согласно одному варианту, композиция в соответствии с изобретением может быть представлена в форме раствора и быть способной к термогелированию.

Согласно одному варианту, композиция в соответствии с изобретением может быть представлена в форме геля и не способна к термогелированию.

Таким образом, изобретение позволяет, согласно одному варианту, приготовить композицию, способную к термогелированию, которая является текучей при температуре ниже температуры использования, обычно при температуре ниже, чем физиологическая температура, например 37°C , но которая находится в форме геля при температуре использования, обычно при физиологической температуре, например 37°C , при нейтральном pH (pH 7) или при физиологическом pH и, например, от 7 до 8,5, с осмоляльностью, которая является подходящей для предполагаемого применения. Это, например, физиологическая осмоляльность.

Согласно одному варианту, композиция, способная к термогелированию, имеет термообратимый золь-гель-переход.

Предпочтительно настоящее изобретение позволяет обеспечить композицию с низкой концентрацией замещенного хитозана.

Предпочтительно концентрация карбоксиалкилхитозана составляет менее 10%, например, равна 5% или менее по массе по отношению к общей массе композиции (мас./мас.).

В соответствии с одним вариантом концентрация хитозана составляет менее 4%, например, равна 3% или менее, или даже, например, равна 2% или менее по массе по отношению к общей массе композиции (мас./мас.).

Предпочтительно композиция по изобретению также может содержать биополимер, отличный от замещенного хитозана. В соответствии с одним предпочтительным вариантом биополимер представляет собой полисахарид, независимо от того, является ли он окисленным или нет, поперечно-сшитым или не сшитым ковалентными связями, например, гиалуроновая кислота или гиалуронат натрия.

Гиалуроновая кислота может иметь молекулярную массу до 5 миллионов Да. Молекулярная масса гиалуроновой кислоты может быть определена по ее характеристической вязкости или ее динамической вязкости в растворе. Гиалуроновая кислота может иметь плотность в диапазоне от 1 до $4\text{ м}^3/\text{кг}$ и, например, может характеризоваться как имеющая низкую (например, приблизительно от 1 до $2\text{ м}^3/\text{кг}$) или высокую (например, приблизительно от 2 до $4\text{ м}^3/\text{кг}$) молекулярную массу.

Предпочтительно концентрация гиалуроновой кислоты составляет менее 4%, например, равна 3% или менее, или даже, например, равна 2% или менее по массе по отношению к общей массе композиции (мас./мас.).

В соответствии с одним конкретным вариантом концентрация гиалуроновой кислоты составляет менее 1,9% (мас./мас.), выраженная в массе по отношению к массе конечной композиции. Предпочтительно концентрация гиалуроновой кислоты составляет от 0,5% до 1,5% (мас./мас.), выраженная в массе по отношению к массе конечной композиции. В соответствии с одним конкретным вариантом концентрация гиалуроновой кислоты составляет приблизительно 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,5% (мас./мас.), выраженная в массе по отношению к массе конечной композиции.

Соотношение между хитозаном и гиалуроновой кислотой может, например, варьироваться от 5% до 95%, например, от 10% до 90%, и даже, например, от 30% до 70% замещенного хитозана, и от 5% до 95%, например, от 10% до 90% и даже, например, от 30% до 70%, соответственно, гиалуроновой кислоты, при этом проценты выражены по отношению к: сухой массе замещенного хитозана/сухой массе гиалуроновой кислоты. В соответствии с одним вариантом это соотношение между хитозаном и гиалуроновой кислотой составляет 1/1 (то есть 50% хитозана и 50% гиалуроновой кислоты). В соответствии с другим вариантом соотношение между хитозаном и гиалуроновой кислотой составляет 1,5/0,5 (то есть 75% хитозана и 25% гиалуроновой кислоты).

В соответствии с одним вариантом гиалуроновая кислота может быть сшита между различными цепями гиалуроновой кислоты

Настоящее изобретение также относится к способу получения карбоксиалкилхитозана.

В соответствии с одним вариантом способ получения карбоксиалкилхитозана в соответствии с изо-

бретением включает получение хитозана грибного происхождения, реацетилирование хитозана и карбоксиалкилирование реацетилированного хитозана. Таким образом, изобретение относится к реацетилированному хитозану или реацетилированному карбоксиалкилхитозану.

В соответствии с одним вариантом осуществления можно, таким образом, растворить хитозан в водной среде, предпочтительно слегка подкисленной (например, pH 6). В раствор хитозана один или несколько раз может быть добавлен уксусный ангидрид. Затем добавляют основной агент, такой как, например, гидроксид натрия и/или мочевины. После этого добавляют алкилирующий агент, такой как, например, монохлорацетат натрия (то есть натриевая соль хлоруксусной кислоты) или хлоруксусная кислота, затем замещенный хитозан очищают, восстанавливают и сушат.

В соответствии с одним вариантом способ получения карбоксиалкилхитозана в соответствии с изобретением включает получение хитозана, карбоксиалкилирование хитозана, затем реацетилирование карбоксиалкилированного хитозана. Предпочтительно такой способ обеспечивает точный контроль степени ацетилирования конечного карбоксиалкилхитозана и, в частности, получение высокой степени ацетилирования, например, выше 40%. Таким образом, изобретение относится к реацетилированному, а затем карбоксиалкилированному хитозану или реацетилированному карбоксиалкилхитозану.

В соответствии с одним вариантом способ получения карбоксиалкилхитозана в соответствии с изобретением включает получение хитина грибного происхождения, карбоксиалкилирование хитина и обязательно реацетилирование карбоксиалкилированного хитина для получения карбоксиалкилхитозана в соответствии с изобретением.

В соответствии с одним вариантом способ получения карбоксиалкилированного хитозана в соответствии с изобретением включает получение хитина грибного происхождения, деацетилирование хитина, карбоксиалкилирование хитина и optionally реацетилирование карбоксиалкилированного хитина для получения карбоксиалкилхитозана в соответствии с изобретением.

В соответствии с одним вариантом осуществления стадия карбоксиалкилирования включает стадию подщелачивания для подщелачивания гидроксильных групп хитозана, чтобы способствовать высокой степени замещения и, например, как в N-положении глюкозаминных звеньев, так и в O-положении глюкозаминных и N-ацетилглюкозаминных звеньев.

В соответствии с одним вариантом осуществления способ по изобретению включает стадию подщелачивания, включающую диспергирование хитозана в растворе спирта, таком как изопропанол, в присутствии щелочного агента, такого как, например, гидроксид натрия, и перемешивание в течение периода времени, составляющего по меньшей мере один час при температуре минимум -32°C и предпочтительно максимум 15°C . К этой суспензии затем добавляют алкилирующий агент, такой как, например, монохлоруксусная кислота. После этого замещенный хитозан очищают, выделяют и затем сушат.

В соответствии с одним вариантом способ получения карбоксиалкилированного хитозана в соответствии с изобретением включает получение хитозана, карбоксиалкилирование хитозана и затем реацетилирование карбоксиалкилированного хитозана.

В соответствии с одним вариантом осуществления стадия карбоксиалкилирования не включает стадию подщелачивания.

Стадия реацетилирования карбоксиалкилхитозана может, например, включать одно или несколько добавлений уксусного ангидрида к раствору карбоксиалкилхитозана.

Конечные стадии очистки, фильтрации и сушки для сбора очищенного карбоксиалкилхитозана проводят в соответствии с известными способами с целью получения карбоксиалкилхитозана в соответствии с желаемой степенью чистоты, которая в целом зависит от предполагаемого применения, например, с помощью циклов осаждения и солюбилизации или путем диализа.

В соответствии с одним вариантом отношение уксусный ангидрид/хитозан (об./мас.) изменяется от 0,1 до 10 и предпочтительно от 0,1 до 2 в время стадии реацетилирования.

В соответствии с одним вариантом массовое отношение карбоксиалкилирующий агент/хитозан изменяется от 1 до 50 и предпочтительно от 2,5 до 25 во время стадии карбоксиалкилирования.

В соответствии с одним вариантом используют массовое отношение реагентов, которые обеспечивают карбоксиалкильную группу (то есть алкилирующего агента), по отношению к основному агенту, которое является необходимым и достаточным для получения желаемой степени замещения. Например, массовое отношение алкилирующего агента к основному агенту составляет больше 1 и меньше 10, и предпочтительно находится в диапазоне от 1,4 до 3,3.

Изобретение также относится к способу получения композиции в соответствии с изобретением.

В соответствии с одним вариантом способ обычно включает растворение замещенного хитозана в водном растворе, предпочтительно в забуференном растворе, предпочтительно имеющем pH в диапазоне от 6,2 до 8,5 и предпочтительно от 6,5 до 7,5;

необязательно доведение pH до желаемого значения pH, как правило, до физиологического pH для целевого применения, например, путем добавления буферного агента, кислоты или основания;

необязательно добавление других вспомогательных веществ, таких как, например, восстанавливающий сахар, например, сорбит или маннит;

необязательно регулирование конечной осмоляльности композиции.

Предпочтительно способ также включает дополнительную стадию наполнения для наполнения устройства для инъекции или имплантации, такого как, например, шприц, карбоксиалкилхитозаном или содержащей его композицией. Предпочтительно инъекционное устройство, такое как, например, шприц, может быть затем подвергнуто процессу стерилизации паром. Это устройство, например, шприц, может быть затем упаковано, предпочтительно стерильным способом. Это может быть также пакет, флакон или бутылка, которая служит для инстилляций раствора карбоксиалкилхитозана.

Предпочтительно использовать хитозан, имеющий достаточную степень чистоты для предполагаемого применения.

Предпочтительно способ также включает дополнительную стадию наполнения для наполнения устройства для инъекции, имплантации или инстилляций, такого как, например, шприц, композицией в соответствии с изобретением. Предпочтительно инъекционное устройство, такое как, например, шприц, может быть затем подвергнуто процессу стерилизации паром. Это устройство, например, шприц, может быть затем упаковано, предпочтительно стерильным способом.

В соответствии с одним вариантом карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением стерилизуют путем фильтрации и/или стерилизации паром перед наполнением им устройства для инъекции, имплантации или инстилляций, такого как, например, шприц или флакон.

Предпочтительно использовать хитозан, имеющий достаточную степень чистоты для предполагаемого применения.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к инъекцируемой композиции, содержащей карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один карбоксиалкилхитозан, определенный в соответствии с изобретением.

В соответствии с одним вариантом карбоксиалкилхитозан или содержащую его композицию используют в качестве фармацевтической композиции, которая может быть инъекцируемой, имплантируемой или пригодной для инстилляций, или медицинского устройства, которое является инъекцируемым, имплантируемым или подходящим для инстилляций.

Изобретение также охватывает карбоксиалкилхитозан или содержащую его композицию в сухой форме, в частности, в лиофилизированной форме. В частности, можно (ре)диспергировать и предпочтительно сольубилизовать лиофилизированный продукт перед применением.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в терапевтическом лечении, например, включающем инъекцию указанной композиции подкожным, внутрикожным, внутриглазным или внутрисуставным путем, например, для восстановления, регенерации или заполнения по меньшей мере одной ткани организма, требующей восстановления или заполнения.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением проявляет иммуносовместимость составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения при использовании модели "воздушный мешок" у мышей, через 24 ч после инъекции, и выражается в количестве белых кровяных клеток, которое составляет менее 10×10^6 клеток/мл и предпочтительно менее 8×10^6 клеток/мл.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением проявляет иммуносовместимость составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения при использовании модели "воздушный мешок" у мышей, через 24 ч после инъекции, и выражается концентрацией интерлейкина 1 бета (IL1-бета), которая составляет менее 10×10^{-9} г/мл и предпочтительно менее 5×10^{-9} г/мл.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением проявляет иммуносовместимость составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения при использовании модели "воздушный мешок" у мышей, через 24 ч после инъекции, и выражается концентрацией хемокинового лиганда 1, содержащего C-X-C мотив (KC/CXCL1), которая составляет менее 50×10^{-9} г/мл и предпочтительно менее 30×10^{-9} г/мл.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением проявляет иммуносовместимость составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения при использовании модели "воздушный мешок" у мышей, через 24 ч после инъекции, и выражается концентрацией фактора некроза опухоли альфа (TNF-альфа), которая составляет менее 150×10^{-9} г/мл и предпочтительно менее 125×10^{-9} г/мл.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением проявляет иммуносовместимость составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения при использовании модели "воздушный мешок" у мышей, через 24 ч после инъекции, и выражается концентрацией хемокинового лиганда 1, содержащего мотив C-X-C (KC/CXCL1), которая составляет менее 50×10^{-9} г/мл и предпочтительно менее 30×10^{-9} г/мл.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления карбоксиалкилхитозан в соот-

ветствии с изобретением проявляет иммуносовместимость составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения при использовании модели "воздушный мешок" у мышей, через 24 ч после инъекции, одновременно удовлетворяя максимальным пределам, указанным в настоящем документе выше в отношении количества белых кровяных клеток и концентраций IL1-бета, KC/CXCL1 и TNF-альфа.

Измерения количества белых кровяных клеток и концентраций IL1-бета, KC/CXCL1 и TNF-альфа осуществляют в соответствии с протоколами, указанными в примерах.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением имеет период полужизни в присутствии смеси ферментов лизоцима и гиалуронидазы при 37°C, который составляет более 500 мин согласно протоколу измерения в примере 6.

Предпочтительно в соответствии с одним вариантом осуществления, в частности, при внутрисуставном применении, карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением имеет коэффициент трения (COF₀) менее 5 и предпочтительно равен 4 или менее (согласно протоколу в примере 9).

Настоящее изобретение относится, в частности, к композиции в соответствии с изобретением для применения в лечении в областях ревматологии, офтальмологии, эстетической медицины, пластической хирургии, хирургии внутренних органов, например, для предотвращения образования послеоперационных спаек тканей, в косметической или дерматологической хирургии.

В соответствии с одним вариантом ткань организма выбрана из тканей, принадлежащих голосовым связкам, мышцам, связкам, сухожилиям, хрящам, половым органам, костям, суставам, глазам, дерме, эпидермису, одному или нескольким слоям кожи, мезодерме или любой из их комбинаций и, более конкретно, принадлежащих глазам, дерме и артикулярным суставам.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в терапевтическом лечении синдрома сухого глаза, повреждения или травмы роговицы, или воспаления суставов.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению композиции в соответствии с изобретением посредством инстилляции на поверхность глаза для предупреждения или борьбы с повреждением или травмой роговицы, или синдромом сухого глаза, в частности, с целью смазывания или регенерации глазной поверхности.

Таким образом, изобретение также относится к композиции глазных капель, содержащей карбоксиалкилхитозан, определенный в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с одним вариантом субъект поражен воспалительной патологией (например, остеоартрозом).

Более конкретно настоящее изобретение относится к композиции в соответствии с изобретением для лечения артроза (остеоартрита), артрита или восстановления дефекта хряща, например, путем инъекции в синовиальную полость или путем имплантации в участке дефекта хряща.

Более конкретно настоящее изобретение относится к медицинскому устройству, например, медицинскому имплантату, отличающемуся тем, что оно содержит или состоит из композиции в соответствии с изобретением.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом изобретение, таким образом, относится к медицинскому устройству, содержащему камеру, содержащую карбоксиалкилхитозан в сухой форме, в частности, в лиофилизированной форме, и необязательно одну или несколько других камер, содержащих один или несколько активных продуктов, добавок или вспомогательных веществ.

Композиция в соответствии с настоящим изобретением может также содержать одну или несколько добавок или вспомогательных веществ, которые позволяют модулировать ее свойства.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в способе терапевтического лечения, например, включающем инстилляцию или инъекцию указанной композиции подкожным, внутрикожным, глазным, внутриглазным или внутрисуставным путем, например, для восстановления или заполнения по меньшей мере одной ткани организма, требующей восстановления или заполнения.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для ее применения в способе лечения остеоартрита или для восстановления дефекта хряща, например, путем инъекции в синовиальную жидкость или после смешивания с кровью и имплантации в хрящ.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в способе лечения или способе эстетической помощи, оказываемой путем заполнения дермы ("дермальное заполнение"). В частности, это включает, например, инъекцию композиции в соответствии с изобретением подкожно или внутрикожно.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в способе лечения для лечения поверхности кожи посредством многократных инъекций внутрикожным путем. Такие композиции, как правило, могут быть использованы в дерматологии в качестве лечения в эстетических целях. Такой способ, например, предназначен для увеличения объема кожи, чтобы она потеряла свой морщинистый вид (лечение морщин и/или тонких линий). Такое лечение может применяться у субъекта, который хочет улучшить вид своей кожи путем омоложения.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для приме-

нения в способе лечения, в котором композиция представляет собой агент вискосупплементации. В этом случае, например, он включает введение композиции по изобретению в участок внутри сустава, в частности, для ограничения трения хрящевых поверхностей сустава.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в качестве клеточного вектора, для одного или нескольких типов клеток, и/или одного или нескольких активных агентов. Это могут быть активные агенты с фармацевтической или биологической точки зрения. Композиция по изобретению может быть фактически совместимой с присутствием клеток, предпочтительно живых клеток. Среди представляющих интерес живых клеток можно упомянуть, например: хондроциты (суставной хрящ), фиброхондроциты (мениск), фибробласты связок (связка), фибробласты кожи (кожа), теноциты (сухожилия), миофибробласты (мышцы), мезенхимальные стволовые клетки, красные кровяные клетки (кровь) и кератиноциты (кожа). Композиция по изобретению также может рассматриваться в качестве терапевтического вектора для таргетной доставки и/или контролируемого высвобождения по меньшей мере одного терапевтического агента.

В соответствии с одним вариантом добавление в композицию по изобретению крови или плазмы, или лизата тромбоцитов, или обогащенной тромбоцитами плазмы, или любой биологической жидкости позволяет тем самым, например, улучшить характеристики продукта.

В соответствии с одним вариантом композиция в соответствии с изобретением составлена в твердой форме (например, пленка или пористая пена), которая солибилизируется после имплантации.

В соответствии с одним вариантом композиция составлена в форме распыляемой с помощью небулайзера (распыляемой) композиции.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в способе лечения или способе эстетического ухода за одной или несколькими тканями или органами, которые находились под воздействием чрезмерной температуры, как в случае ожога.

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в способе лечения хряща для восстановления хряща (например, путем имплантации в дефект хряща, чтобы способствовать регенерации такого хряща).

Настоящее изобретение также относится к композиции в соответствии с изобретением для применения в способе лечения для предотвращения спаек тканей после операции: продукт наносят на ткани в конце операции, например, гинекологической хирургии, абдоминальной хирургии и т.д.

Настоящее изобретение также относится к композиции, предназначенной в качестве искусственной синовиальной жидкости, которая содержит карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением.

Композиция в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает способность имитировать здоровую синовиальную жидкость или улучшать здоровую или дефектную, или дегенеративную синовиальную жидкость, например, путем улучшения ее смазывающей способности для уменьшения трения в суставе и/или его демпфирующей способности (определяемой модулем упругости G'), при этом является легко вводимой, например, для наполнения шприца или для инъекции в организм человека или животного. Только в иллюстративных целях модуль упругости G' здоровой синовиальной жидкости составляет от 40 до 100 Па, и его модуль потерь G'' составляет от 1 до 10 Па.

В соответствии с одним вариантом карбоксиалкилхитозан или содержащую его композицию вводят в форме раствора. Предпочтительно в соответствии с этим вариантом карбоксиалкилхитозан или содержащую его композицию легко вводят через тонкую иглу, например, иглу диаметром 21 калибра при комнатной температуре. Термин "легкое" введение означает, что предпочтительно сила, прикладываемая к такому шприцу, под действием которой композиция в соответствии с изобретением протекает через иглу 21 калибра, составляет менее 50 Н, предпочтительно сила составляет менее 20 Н.

Настоящее изобретение также относится к композиции для применения в качестве искусственных слез, которая содержит карбоксиалкилхитозан в соответствии с изобретением.

Как правило, диапазоны значений осмоляльности и рН, необходимые в биомедицинских применениях, близки к следующим диапазонам:

осмоляльность:

изоосмолярность с плазмой: 285-295 мОсм/кг;

изоосмолярность с синовиальной жидкостью: 404 ± 57 мОсм/кг в соответствии с "Clin Orthop Relat Res, 235, 289-95, 1988" и "Biochem Biophys Res Comm, 422, 455-461, 2012";

от 280 до 350 мОсм/кг.

рН.

Как правило, физиологическое значение рН составляет выше 6,8, в частности, выше 7,0 и, в частности, равно 7,4 (как для плазмы или синовиальной жидкости).

Как правило, значение рН плазмы равно 7,4. Как правило, значение рН синовиальной жидкости равно $7,768 \pm 0,044$ в соответствии с "J Bone Joint Surg Br, 41-B (2), 388-400, 1959"; или 7,3 в соответствии с "Acta Orthop Scand 634-641, 1969", или также в соответствии с "Clin Rheumatol 25, 886-888, 2006".

Как правило, полагают, что значение рН синовиальной жидкости при остеоартрите или артрите является более низким, чем при здоровой синовиальной жидкости.

Таким образом, настоящее изобретение относится к смеси синовиальной жидкости с композицией в соответствии с настоящим изобретением, например, на основе объемного соотношения между (i) карбоксиалкилхитозаном или содержащей его композицией и (ii) синовиальной жидкостью, которое находится в диапазоне от 20/80 до 80/20 (об./об.) и составляет, например, 50/50 (об./об.).

Предпочтительно композиция в соответствии с настоящим изобретением является стерильной. В высокой степени предпочтительно композицию в соответствии с настоящим изобретением стерилизуют путем повышения температуры, предпочтительно в автоклаве.

В соответствии с одним вариантом композиции по изобретению являются прозрачными или просвечивающимися.

Термин "просвечивающаяся" означает, что объект может быть различим, когда композицию помещают между глазом наблюдателя и указанным объектом. Термин "прозрачная" означает, что можно различать буквенно-цифровые символы, когда композицию помещают между глазом наблюдателя и наблюдаемыми символами. Как правило, эту оценку проводят на композиции толщиной приблизительно 1 см. Также можно следовать способу, описанному в монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи, для визуального осмотра. Также можно измерить оптическую плотность композиции, например, с помощью спектрометрии в видимой УФ-области при 500 нм и убедиться, что оптическая плотность составляет менее 0,5, предпочтительно 0,2 по сравнению с эталонным растворителем.

Согласно одному варианту композиции по изобретению не являются или являются лишь слегка опалесцирующими.

Термин "опалесцирующий" означает, что раствор приводит к дифракции света, видимой невооруженным глазом, например, путем визуального осмотра согласно способу, такому как в монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи, и путем сравнения с эталонными растворами, имеющими различные уровни опалесценции, из Европейской фармакопеи. В соответствии с одним вариантом композиция по изобретению является бесцветной, то есть, в частности, наблюдатель, наблюдающий невооруженным глазом, не приписывает какой-либо конкретный цвет композиции. В соответствии с одним вариантом опалесценция ниже максимально допустимого уровня для предполагаемого применения.

Изобретение относится, в частности, к изделиям или упаковке, предпочтительно стерильной, содержащей одно или несколько устройств для инстиляции или инъекции, предварительно наполненных композицией в соответствии с изобретением. Как правило, это устройства, которые позволяют вводить продукт в форме капель или в предварительно наполненных шприцах.

Композиция по изобретению может быть предпочтительно стерилизована. Таким образом, изобретение относится к стерилизованному карбоксиалкилхитозану. Таким образом, карбоксиалкилхитозан является стерильным, в частности, для применений, в которых это требуется.

В соответствии с одним вариантом композицию по изобретению стерилизуют паром, например, путем повышения температуры до температуры выше 100°C и предпочтительно выше 120°C, например, в интервале от 121°C до 138°C в автоклаве, в течение периода времени, достаточного для стерилизации, например, как правило, в течение от 15 до 20 мин. В соответствии с другим вариантом композиция может быть стерилизована путем фильтрации с использованием фильтров, приспособленных для этой цели, например, фильтров с пористостью, меньшей или равной 0,2 мкм.

Преимущество состоит в том, что в соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления потеря характеристической вязкости карбоксиалкилхитозана во время процесса стерилизации паром составляет менее 40%.

Изобретение также охватывает композицию по изобретению в сухой форме, в частности, в лиофилизированной форме.

В частности, возможно (ре)диспергировать эту лиофилизированную композицию перед применением.

Настоящее изобретение также охватывает способ терапевтического лечения, включающий инъекцию композиции в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение также охватывает применение композиции в соответствии с изобретением для изготовления фармацевтической композиции, в частности, для терапевтического лечения, например, как определено более конкретно изобретением.

Настоящее изобретение также охватывает способ эстетического ухода, другими словами, нетерапевтический способ, включающий инъекцию композиции в соответствии с изобретением. Это включает, например, заполнение морщин или заполнение одной или нескольких областей поврежденной видимой ткани, например, после несчастного случая или хирургического вмешательства, в эстетических целях.

Ткань представляет собой набор клеток, которые являются схожими и имеют одинаковое происхождение, сгруппированных вместе как функциональная единица, то есть способствуют одной и той же заданной функции. Среди тканей можно упомянуть: эпителиальную ткань, соединительную ткань, мышечную ткань и нервную ткань.

Термин "композиция в соответствии с изобретением" или эквивалентные термины следует понимать как относящиеся к композиции, определенной в настоящем изобретении, в том числе в соответст-

вии с любым из вариантов, конкретных или специфических вариантов осуществления, независимо или в соответствии с любой из их комбинаций, в том числе в соответствии с предпочтительными отличительными признаками.

Другие объекты, отличительные признаки и преимущества изобретения станут очевидными для специалиста в данной области после прочтения пояснительного описания, в котором делается ссылка на примеры, приведенные исключительно в качестве иллюстрации, и которые никоим образом не ограничивают объем изобретения.

Примеры образуют неотъемлемую часть настоящего изобретения, и любой отличительный признак, который представляется новым по сравнению с любым документом предшествующего уровня техники на основе описания, рассматриваемым в целом, включая примеры, образует неотъемлемую часть изобретения в отношении его функции и применимости.

Таким образом, каждый пример является общим по сфере применения.

С другой стороны, в примерах все процентные доли рассчитаны по массе, если не указано иное, температура приведена в градусах Цельсия, если не указано иное, и давление является атмосферным давлением, если не указано иное.

Примеры

Хитозаны-предшественники замещенных хитозанов в соответствии с изобретением имеют среднюю молекулярную массу по вязкости (определенной при помощи капиллярной вискозиметрии) и степень ацетилирования (DA, содержание звеньев N-ацетил-D-глюкозамина, определенная с помощью потенциометрического титрования), находящиеся в диапазонах, указанных в табл. 1. Молекулярная масса хитозана может быть также определена по динамической вязкости раствора, имеющего концентрацию 1% (мас./мас.) хитозана в уксусной кислоте, имеющей концентрацию 1% (об./об.), измеренную при помощи вискозиметра с вращающимся шпинделем, например, вискозиметра Брукфильда, как описано в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики хитозанов-предшественников

Диапазон	Диапазон средней молекулярной массы (капиллярная вискозиметрия)	Диапазон вязкости при 1% (мПа.с)	Диапазон DA (мол.%)
«Сверхнизкий»	прибл. 20000 - 60000	5 - 20	5 - 20%
«Низкий»	прибл. 60000 - 120000	20 - 50	15 - 25%
«Средний»	прибл. 120000 - 150000	50 - 80	20 - 30%
«Высокий»	прибл. 150000 - 220000	80 - 120	25 - 40%
«Сверхвысокий»	прибл. 220000 - 300000	120 - 200	25 - 40%
«400k»	прибл. 300000 - 500000	200 - 600	35 - 50%

В настоящем изобретении использовали следующие способы, если не указано иное.

Способ измерения дзета-потенциала.

Состав, подлежащий анализу, разбавляли в фосфатном буфере с целью получения конечной концентрации полимера 0,05%, затем слегка перемешивали до достижения гомогенизации. Затем раствор разделяли на разные фракции, и pH каждой из фракций доводили до желаемого значения, находящегося в диапазоне pH 4-8, либо путем добавления 0,1N раствора гидроксида натрия, либо путем добавления 0,1N раствора соляной кислоты. Дзета-потенциал каждой фракции измеряли с помощью прибора "Nano-Z" (диапазон Zeta-Sizer, Malvern Instruments).

Способ измерения диапазона растворимости хитозановых полимеров.

Диапазон растворимости устанавливали путем приготовления раствора подлежащего тестированию полимера при концентрации 1% и pH 9, путем деления его на несколько фракций, pH которых доводили до различных значений pH в диапазоне от 9 до 1. Для каждой фракции полимер проверяли, чтобы убедиться в том, что он растворился -то есть он не образует какого-либо помутнения - в соответствии со способом визуального контроля, описанным в монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи. Отмечали диапазон pH, в котором полимер является растворимым или нерастворимым.

Модель подкожного "воздушного мешка" у мышей.

Модель подкожного "воздушного мешка" у мышей использовали для оценки реакции на чужеродные тела и иммуносовместимости нескольких различных полимеров, полученных из хитозана грибного происхождения. В этой модели полость "воздушного мешка" получали путем повторных подкожных инъекций стерильного воздуха в спину мыши. Мешок, создаваемый надувания воздуха, имитирует синовиальную полость, обеспечивая тем самым локализованную среду, в которой можно изучать стимуляцию воспалительного ответа в жидкости, вытекающей из воздушного мешка и окружающих тканей, как описано Segwick et al. (в J Pathol 141, 483, 1983) и Sin et al. (в Ann Rheum Dis 45, 873, 1986). Полость воздушного мешка позволяет вводить до 1 мл продукта животному весом около 30 г. Согласно протоколу, описанному Dawson et al. (в Int J Tiss Reac 8, 171, 1991), воздушный мешок устанавливали у неродственных самцов мышей-альбиносов линии CD-1 Swiss (беспатогенные, масса тела при поступлении 25-35 г) согласно графику на День 0 и День 4 путем повторной инъекции 5 мл, а затем 3 мл стерильного воздуха. На день 7 однократную подкожную инъекцию 1 мл продукта вводили непосредственно

в полость воздушного мешка. Инъекции 1 мл физиологического раствора и 1% раствора каррагинана служили в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. Животных регулярно наблюдали в течение нескольких часов после инъекции, чтобы обнаружить возможные клинические признаки системной или местной токсичности, и набор массы тела и температуру измеряли на момент инъекции и умерщвления. Животных умерщвляли после 24-часового контакта с продуктом (3 животных на продукт). Иммунологические оценки промыточной жидкости, извлеченной из мешка, включали цитологический анализ (подсчет и распределение белых и красных кровяных клеток) и количественную оценку основных медиаторов воспаления (IL-1-бета, TNF-альфа и KC/CXCL1) с использованием наборов "ELISA" (AbCam), осуществляемую в соответствии с инструкциями. Проводили макроскопический анализ и гистопатологический анализ путем окрашивания гематоксилином/эозином окружающих тканей кожи. Особое внимание уделялось локализации продукта на окружающих тканях, а также его резорбции в жидкости.

Модель для оценки локальной переносимости внутрисуставного введения в овечьей модели.

Согласно литературным данным и рекомендациям Международного общества по изучению остеоартрита (Osteoarthritis Research Society International, OARSI), овцы признаны хорошо охарактеризованной моделью для оценки эффектов внутрисуставной инъекции инновационных средств для лечения (Little et al. In: Osteoarthritis Cartilage 18, S80, 2010 ; Edouard et al. In: Phys Ther Sport 14, 116, 2013 ; McCoy et al. In: Vet Pathol 52, 803, 2015). Овечья модель обеспечивает средства для инъекции внутрисуставным путем некоторого объема состава, который имитирует клиническое применение вискоэластичной терапии у людей (Fraser et al. In: Semin Arthritis Rheum 22, 9, 1993). Измерения локальной переносимости включают клинические признаки синовиального воспаления (выпот, хромота, дискомфорт) путем использования валидизированных полуколичественных клинических шкал, описанных Shafford et al. (в Vet Anaesth Analg 31, 20, 2004) и Kaler et al. (в Vet J 180, 189, 2009), а также цитологического исследования синовиальной жидкости. В некоторых случаях эти анализы могут быть дополнены анатомической и гистологической оценкой подвергнутой инъекции конечности. Объем 2 мл состава инъецировали в сустав (колени) здоровой овцы (возраст от 2 до 6 лет; вес от 60 до 80 кг). После инъекции клинические признаки у животных регистрировали ежедневно в течение 15 дней на основе полуколичественной шкалы от 0 до 4 для выпота (путем пальпации коленного сустава) и хромоты. Сообщалось о ряде признаков для каждой из оценок за весь период наблюдения. Чтобы оценить эффекты повторной инъекции того же самого заданного состава, через 1 месяц проводили вторую инъекцию в сустав тех же животных, и животных наблюдали в соответствии с тем же протоколом, что и для первой инъекции. Кроме того, пункцию синовиальной жидкости выполняли на 15 день, и макроскопические (цвет, вязкость), цитологические (количество и распределение белых и красных кровяных клеток) параметры, а также количество общих сывороточных белков определяли в соответствии с обычными способами. Синовиальная жидкость считалась нормальной, если она имела прозрачный, вязкий и слегка желтоватый внешний вид, и цитологический анализ показал, что количество белых кровяных клеток составляет менее 1×10^5 клеток/мл, и что концентрация общих белков составляет приблизительно 25 мг/мл.

Пример 1-N-сукцинил-хитозаны.

N-Сукцинил-хитозаны, имеющие различную молекулярную массу и молекулярную структуру (степень ацетилирования (DA) и степень замещения сукцинильной группой (DS)), получали и характеризовали в соответствии с общим способом, описанным в заявке на патент WO 2016/016463 или WO 2016/016464 (патент EP 3016663). Первую стадию ацетилирования путем добавления уксусного ангидрида проводили для увеличения степени ацетилирования, за исключением полимера CSS-1 (табл. 1а).

Составы готовили с этими N-сукцинил-хитозанами (CSS) при концентрации 2% при физиологическом pH и осмолярности, и упаковывали в стеклянные шприцы. Шприцы стерилизовали в автоклаве с использованием стандартного цикла (15 мин при 121°C). Составы проверяли, чтобы удостовериться в том, что они не проявляют присутствия какого-либо нерастворимого вещества или мутности в широком диапазоне pH вблизи физиологического pH (pH от 6,5 до 7,5) путем визуального осмотра согласно способу, описанному в монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи. Проводили проверку того, чтобы уровень бактериальных эндотоксинов в составах составлял менее 20 ЕЭ/мл согласно способу, описанному в монографии 2.6.14 (D) Европейской фармакопеи, и чтобы микробиологическая нагрузка составляла менее 100 КОЕ/г согласно способу, описанному в монографии 2.6.12 Европейской фармакопеи, до проведения оценки их иммуносовместимости *in vivo*.

Таблица 1а

Характеристики N-сукцинил-хитозанов

No	Диапазон молекулярной массы	DA* (мол.%)	DS* (мол.%)
CSS-1	Средняя	12	62
CSS-6	Низкая	50	34
CSS-8	Низкая	49	32
CSS-10	Высокая	61	37

* Молекулярная масса хитозана-предшественника согласно табл. 1;

** DA и DS измеряли методом протонного ЯМР согласно способу, описанному в патенте EP 3016663.

Иммуносовместимость составов CSS оценивали с помощью модели подкожного "воздушного мешка" у мышей (табл. 1b). Наблюдаемую реакцию сравнивали с реакцией, наблюдаемой после инъекции физиологического раствора (отрицательный контроль), высоко реакционного положительного контроля (1% раствор каррагенана) и коммерчески доступного продукта на основе Hylan GF-20, частично сшитой гиалуроновой кислоты (Synvisc®, Sanofi).

Таблица 1b

Иммуносовместимость составов N-сукцинил-хитозана с использованием модели "воздушного мешка" у мышей, через 24 ч после инъекции*

№	Кол-во белых кровяных клеток (10 ⁶ клеток/мл)	Концентрация IL1-бета (10 ⁹ г/мл)**	Концентрация KC/CXCL1 (10 ⁹ г/мл)	Концентрация TNF-альфа (10 ⁹ г/мл)**
CSS-1	1,5	/	/	/
CSS-6	0,7	< 3	137	< 125
CSS-8	3,7	/	/	/
CSS-10	2,1	< 3	>700	< 125
Контроли				
Отрицательный контроль (физиологич. раствор)	0,2	17	23	272
Положительный контроль (1% каррагенан)	33,2	28	700	767
Synvisc® (Hylan GF-20)	0,7	4	46	< 125

* Среднее значение по 3 животным;

** Предел обнаружения: 3,10⁹ г/мл для IL1-бета и 125,10⁹ г/мл для TNF-альфа.

В целом, было обнаружено, что эти составы на основе CSS вызывают иммунологическую реакцию типа реакции на чужеродное тело, о чем свидетельствует количество белых кровяных клеток в клеточном инфильтрате, которое является более высоким, чем для отрицательного контроля, однако не таким высоким, как для положительного контроля (1% каррагинан). Реакция, индуцированная составами, отличается активацией нейтрофилов, о чем свидетельствует более высокая концентрация маркера KC/CXCL1 по сравнению с отрицательным контролем и продуктом Synvisc®.

Что касается маркеров IL1-бета и TNF-альфа, их уровни являются низкими.

Модификация DA и/или DS CSS или фактически модификация его молекулярной массы не приводит к каким-либо различиям в иммунологической реакции. Хотя составы CSS не оказывают какого-либо вредного воздействия на ткани локально, необходимо иметь возможность получить более высокий уровень иммуносовместимости в случае терапевтических применений, которые нацелены на ткани, которые ослаблены соответствующей патологией, например, такой как синдром сухого глаза, повреждение роговицы или воспаление, связанные с патологиями суставов.

Пример 2. Карбоксиметилхитозаны животного происхождения.

Возможно получение двух карбоксиметилхитозанов животного происхождения для фармацевтического или медицинского применения, которые являются имплантируемыми или инъекцируемыми (СС-1 и СС-2 в табл. 2a).

Тестировали два других карбоксиметилхитозана:

один СС, полученный путем карбоксиметилирования хитина животного происхождения (СС-3);

один СС, полученный путем карбоксиметилирования хитозана животного происхождения, причем хитозан получали путем деацетилирования хитина животного происхождения (СС-4).

Карбоксиметилхитозаны (СС) характеризовали с помощью ЯМР на ядрах углерода-13, чтобы подтвердить их идентичность и определить значения DA (степень ацетилирования) и DS (степень замещения карбоксиметильной группой) с погрешностью, оцененной приблизительно в $\pm 10\%$ (табл. 2a). Электростатический заряд полимера характеризовали путем измерения его дзета-потенциала при концентрации 0,05% (мас./мас.) в диапазоне pH от 8 до 4, и регистрировали значение дзета-потенциала при pH 7,5 (табл. 2a). Наблюдалось, что значение дзета-потенциала при pH 7,5 относительно хорошо коррелирует со значением DS, определенным с помощью ЯМР на ядрах углерода-13. Например, полимер СС-3 замещен в большей степени, чем полимер СС-4, анионной карбоксиметильной группой (в карбоксилатной форме при pH 7,5) и имеет аналогичный DA, поэтому его общий отрицательный заряд является более высоким (-28 мВ против -11 мВ при pH 7,5).

Наблюдается, что полимеры СС-1 и СС-2 не очень растворимы в физиологическом диапазоне pH (pH 6,5-7,5). Невозможно оценить их иммуносовместимость, используя модель подкожного "воздушного мешка" у мышей. Полимеры СС-3 и СС-4 фактически растворимы во всем широком диапазоне pH 1-9.

Таблица 2а

**Характеристики карбоксиметилхитозанов
животного происхождения и их составов**

№ (концентрация)	DA * (мол.%)	DS * (мол.%)	Диапазон растворимости полимера	Стерилизуемость состава в автоклаве	Дзета- потенциал при pH 7,5 (мВ)
СС-1 (2%)	8	124	Нерастворим в диапазоне pH 3,6-8,1	/	/
СС-2 (2%)	/	/	Нерастворим при pH ниже 6,6	/	/
СС-3 (2%)	71	149	Растворим при всех значениях pH	Нет	-28
СС-4 (1,5%)	69	24	Растворим при всех значениях pH	Да	- 11

* Значения DA и DS для карбоксиметилхитозановых полимеров определяли с помощью твердофазной спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах углерода-13.

Составы СС-3 (2%) и СС-4 (1,5%) затем получали таким же способом, что и в примере 1, упаковывали в стеклянные шприцы и затем стерилизовали в автоклаве в соответствии со стандартным циклом, составляющим 15 мин, при 121°C (табл. 2а). Было обнаружено, что 2% состав полимера СС-3 не выдерживает конечной стерилизации в автоклаве, что подтверждается потерей его характеристической вязкости приблизительно на 60%, свидетельствуя о гидролизе полимера, а также потерей на 98% его модуля хранения G'. В качестве альтернативы конечной стерилизации в автоклаве состав СС-3 затем фильтровали перед упаковкой в шприц, чтобы получить состав, который можно оценить, используя модель "воздушного мешка" у мышей.

Составы СС-3 (2%, фильтрованные) и СС-4 (1,5%, стерилизованные в автоклаве) проверяли, чтобы убедиться, что уровень эндотоксинов и микробиологическая нагрузка составляют ниже 20 ЕЭ/мл и 100 КОЕ/г, и затем оценивали их иммуносовместимость с использованием модели подкожного "воздушного мешка" у мышей (табл. 2b).

Таблица 2b

**Имуносовместимость составов карбоксиметилхитозана животного
происхождения с использованием модели подкожного
"воздушного мешка" у мышей через 24 ч после инъекции***

№	Кол-во белых кровяных клеток ($\times 10^6$ клеток/мл)	Концентр. IL1-бета ($\times 10^9$ г/мл)**	Концентр. KC/CXCL1 ($\times 10^9$ г/мл)	Концентр. TNF-альфа ($\times 10^9$ г/мл)**
СС-3	0,7	< 3	49	< 125
СС-4	1,0	5	115	184
Контроли				
Отрицательный контроль (физиологический раствор)	0,2	17	23	272
Положительный контроль (1 % каррагенан)	33,2	28	> 700	767
Synvisc® (Hylan GF20)	0,7	4	46	< 125

* Среднее значение по 3 субъектам;

** предел обнаружения: 3×10^9 г/мл для IL1-бета и $125,10^9$ г/мл для TNF-альфа.

Состав СС-4 вызывал значительную реакцию, характеризующуюся высокой концентрацией в инфильтрате двух маркеров одновременно, KC/CXCL1 (активация нейтрофилов) и TNF-альфа. Маркер TNF-альфа не был обнаружен после инъекции составов ССС, описанных в примере 2, или Synvisc® (Hylan GF-20). Однако нежелательно вызывать реакцию, характеризующуюся маркером TNF-альфа. Поскольку желательнее иметь хорошую иммуносовместимость в случае терапевтических применений, в отношении которых ожидается, что состав будет находиться в контакте с тканями, ослабленными основной патологией, такой как, например, синдром сухого глаза, повреждение или травма роговицы, или воспаления суставов, и избежать активации нейтрофилов и TNF-альфа, карбоксиметилхитозан животного происхождения СС-4 является не подходящим.

Состав СС-3 индуцирует более низкую реакцию, характеризующуюся количеством белых кровяных клеток и умеренной концентрацией маркера KC/CXCL1, аналогичных уровням продукта сравнения Synvisc®, но выше уровней отрицательного контроля (физиологический раствор). Таким образом, состав СС-3, по-видимому, является менее иммунореактивным, чем составы ССС и состав СС-4. Однако состав СС-3 имеет недостаток в том, что он имеет концентрацию маркера KC/CXCL1, которая может оказаться

неподходящей для способа терапевтического лечения, когда субъекту требуется очень хорошая иммуно-совместимость, и в том, что он подвергается очень значительному гидролизу макромолекулярных цепей под действием тепла, что, таким образом, делает невозможной его стерилизацию в автоклаве на конечной стадии в конце производственного процесса, то есть после заполнения шприца составом.

Пример 3. Карбоксиметилхитозаны грибного происхождения.

Чтобы получить карбоксиметилхитозаны из табл. 3а и 3б, начиная с хитина или хитозана грибного происхождения, проводят следующие реакции:

реацетилирование с последующим карбоксиметилированием грибного хитозана со "сверхвысокой" молекулярной массой (СС-5 в табл. 3а);

карбоксиметилирование с последующим реацетилированием грибного хитозана со "сверхвысокой" молекулярной массой (от СС-5 до СС-9);

карбоксиметилирование грибного хитозана со "сверхвысокой" молекулярной массой (СС-11);

карбоксиметилирование грибного хитина (СС-10).

Например, СС-8 получали следующим образом: 10 г хитозана со "сверхвысокой" молекулярной массой диспергировали в 220 мл изопропанола и 68 мл 40% гидроксида натрия (масса/объем). 45 г алкилирующего агента монохлоруксусной кислоты (МСА) растворяли в 45 мл изопропанола и добавляли к суспензии хитозана. Реакции позволяли протекать в течение 16 ч при 25°C. Полимер выделяли осаждением в этаноле, затем очищали с помощью циклов солюбилизации/осаждения в этаноле. Осадок сушили в вентилируемой печи. Массу 15 г осадка диспергировали в воде и добавляют к нему 3,75 мл уксусного ангидрида. После 30 мин перемешивания при комнатной температуре рН среды доводили до 6, и к нему добавляли 3,75 мл ангидрида кислоты (АС). После 30 мин перемешивания при комнатной температуре среду нейтрализовали и осаждали в этаноле. Полученный таким образом осадок повторно растворяли и затем снова осаждали. Конечный осадок карбоксиметилхитозана (СС-8) сушили в вентилируемой печи.

Параметры синтеза, применяемые для получения других СС, описаны в табл. 3а и 3б.

Таблица 3а

Параметры для синтеза карбоксиалкилхитозана, начиная с грибного хитозана

Параметры	СС-5	СС-6	СС-7	СС-8	СС-9	СС-11
Стадия карбоксиметилирования						
Алкилирующий агент (МСА или SCA)*	SCA	MCA	MCA	MCA	MCA	MCA
NaOH/хитозан (масса/масса)	11	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Мочевина	Да	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Алкилирующий агент/хитозан (масса/масса)	11,2	9	9	4,5	4,5	6,8
Изопропанол/алкилирующий агент (% , масса/масса)	0%	80%	80%	80%	80%	80%
Температура (°C)	15°C	15°C	25°C	25°C	35°C	60°C
Длительность (ч)	22 ч	16 ч	16 ч	16 ч	4 ч	1 ч
Стадия реацетилирования						
До и после карбоксиметилирования	до	после	после	после	после	/
АС/хитозан (объем/масса) -первое добавление	0,3	0,25	0,25	0,25	0,25	/
-второе добавление	0,3	0,25	0,25	0,25	0,25	/
Длительность и температура реакции	0,5 ч при 25°C	/				

* МСА: монохлоруксусная кислота; СА: натриевая соль монохлоруксусной кислоты.

Таблица 3б

Параметры для синтеза карбоксиалкилхитозана, начиная с грибного хитина

Параметры	СС-10
Хитин/сода/вода (масса/масса)	1/11,4/28,5
Длительность и температура контакта с содой	16 ч при 4°C
Алкилирующий агент (МСА или SCA)	MCA
Хитин/изопропанол/алкилирующий агент (масса/масса/масса)	1/28,5/4,5
Длительность и температура реакции	16 ч при 25°C

Полученные карбоксиметилхитозаны (СС) грибного происхождения характеризовали ЯМР на ядрах углерода-13, чтобы подтвердить их структуру и определить значение DA и DS (табл. 3с). Принимая во

внимание стандартное отклонение, присущее методу спектрометрии ЯМР на ядрах углерода-13 (приблизительно $\pm 10\%$), наблюдалось, что значение дзета-потенциала при pH 7,5 коррелирует с молекулярной структурой, в частности, с DS.

Таблица 3с

Характеристики карбоксиметилхитозанов
грибного происхождения и их составы

№ (концентрация)	DA * %	DS * %	Раствори- мость полимера	Стерилизу- емый в автоклаве **	Дзета- потенциал при pH 7.5 (мВ)
СС-5 (1,5%)	67	18	Растворим при любом pH	Да	-12,5
СС-6 (2%)	71	42	Растворим при любом pH	Да	-15
СС-7 (2%)	57	70	Растворим при любом pH	Да	-18
			при любом pH		
СС-8 (2%)	50	80	Растворим при любом pH	Да	-26
СС-9 (2%)	41	101	Растворим при pH > 3,1	Да	-22
СС-10 (2%)	46	167	Растворим при любом pH	Да	-24,5
СС-11 (2%)	23	130	Растворим при pH > 3,5	Да	-26

* DA и DS, как определено 13С-ЯМР;

** считается стерилизуемым, если потеря характеристической вязкости до/после стерилизации составляет менее 40%.

Все полученные СС являются растворимыми в широком диапазоне pH, в частности, в диапазоне pH 4,0-8,5, без опалесценции.

Составы получали при концентрации СС, равной 1,5% или 2%, упаковывали в стеклянные шприцы, затем стерилизовали в автоклаве в соответствии со стандартным 15-минутным циклом при 121°C. Чтобы оценить, можно ли стерилизовать составы в автоклаве, характеристическую вязкость полимеров измеряли до и после автоклавирования с помощью капиллярной вискозиметрии после разбавления в 25 раз фосфатным буфером. Потеря характеристической вязкости СС составила менее 40%, что указывает на приемлемую устойчивость, в отличие от состава СС-3, описанного в примере 2 (который потерял приблизительно 60% своей характеристической вязкости).

Визуальный осмотр стерилизованных составов, включенных в табл. 3с, показал, что они являются прозрачными и не опалесцирующими. Затем их проверяли, чтобы удостовериться в том, что уровень эндотоксинов и микробиологическая нагрузка составляют менее 20 ЕЭ/мл и 100 КОЕ/г, и после этого оценивали их иммуносовместимость, используя модель подкожного "воздушного мешка" у мышей.

Таблица 3d

Иммуносовместимость составов карбоксиметилхитозана
грибного происхождения с использованием модели подкожного
"воздушного мешка" у мышей через 24 ч после инъекции*

№	Кол-во белых кровяных клеток ($\times 10^6$ клеток/мл)	Конц. IL-1-бета ($\times 10^9$ г/мл)	Конц. KC/CXCL1 ($\times 10^{-9}$ г/мл) **	Конц. TNF-альфа ($\times 10^{-9}$ г/мл) **
СС-5	1,9	6	28	391
СС-6	17	12	20	< 125
СС-7	9,0	12	20	< 125
СС-8	2,6	< 3	20	< 125
СС-9	6,5	7	20	< 125
СС-10	2,4	< 3	16	< 125
Контроли				
отрицательный контроль (физиологич. раствор)	0,2	17	23	272
положительный контроль (1% каррагенан)	33,2	28	> 700	767
Synvisc® (Hylan GF20)	0,7	4	46	< 125

* Среднее значение по 3 объектам;

** предел обнаружения: 3×10^{-9} г/мл для IL1-бета и 125×10^{-9} г/мл для TNF-альфа.

В целом, отмечается наличие хорошей иммуносовместимости составов СС грибного происхождения с ослаблением или даже подавлением иммунной реакции по сравнению с составами N-

сукцинилхитозана, описанными в примере 1, и с составами карбоксиметилхитозан животного происхождения, описанными в примере 2.

Отмечается, что низкая концентрация маркера KC/CXCL1 индуцирована составами СС грибного происхождения, на том же уровне, что и для отрицательного контроля (физиологический раствор), и ниже, чем для продукта Synvisc®. Это свидетельствует о незначительной или даже отсутствующей активации нейтрофилов, в отличие от уровня, о котором сообщалось после введения составов CSS (пример 1) и СС животного происхождения (пример 2).

Кроме того, отмечается, что для некоторых составов СС грибного происхождения (а именно СС-8 и СС-10) четыре параметра иммунной реакции являются одновременно ослабленными или подавленными, то есть общее количество белых кровяных клеток, маркер IL1-бета, маркер KC-CXCL1 и маркер TNF-альфа. Этого не происходило с составами CSS или с составами СС животного происхождения.

По-видимому, для составов СС грибного происхождения, составы, которые демонстрируют это одновременное ослабление четырех параметров, представляют собой составы с самым высоким отрицательным зарядом (например, -26 мВ для СС-8 и -24,5 мВ для СС-10 при pH 7,5).

Наблюдается, что составы СС-4 животного происхождения, описанные в примере 2, и СС-5 грибного происхождения, слабо замещенные карбоксиалкильной группой, вызывают определенную активацию маркера TNF-альфа, и что, с другой стороны, только состав СС-4 животного происхождения приводит к значительной секреции маркера KC/CXCL1. Также наблюдается, что состав СС-10 (грибного происхождения) не приводил к активации нейтрофилов, в отличие от состава СС-3 животного происхождения, описанного в примере 2.

Пример 4. Оценка локальной переносимости внутрисуставного введения составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения с использованием овечьей модели.

Составы с 2% двух карбоксиметилхитозанов грибного происхождения (СС-8 и СС-10), описанные в примере 3, готовили для оценки их возможного применения посредством внутрисуставной инъекции на модели овец (овца). Объем 2 мл двух составов вводили овце, и местную реакцию, вызванную внутрисуставной инъекцией, оценивали в течение 2 недель. Также, оценивали эффекты второй инъекции состава СС-8 в том же самом суставе через 1 месяц после даты первой инъекции. Продукт Synvisc® вводили таким же способом в объеме 1 мл или 2 мл.

Клинические признаки ежедневно контролировали путем пальпации сустава и наблюдения за возникновением хромоты в течение 15 дней и оценивали на основе полуколичественной оценки от 0 (нет сигнала) до максимального балла 3 для хромоты и 5 для хромоты. Общий клинический результат за период 15 дней представляли в виде частоты случаев возникновения в баллах (табл. 4), а также в виде характеристики синовиальной жидкости, продуцированной на 15 день.

Таблица 4

Оценка локальной переносимости составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения и Synvisc® с использованием модели овцы путем внутрисуставной инъекции

№ состава Объем (N : кол-во животных)	Частота случаев возникновения хромоты за 15 дней (балл от 0 до 3)	Частота случаев возникновения хромоты за 15 дней (балл от 0 до 5)	Характеристика синовиальной жидкости, взятой путем пунктирования на день 15
СС-8 Первая инъекция 2 мл (N = 4)	Балл 0: 100% Баллы 1-3: 0%	Балл 0: 100% Баллы 1-5: 0%	Нормальная
СС-8 Вторая инъекция 2 мл (N = 2)	Балл 0: 100% Баллы 1-3: 0%	Балл 0: 100% Баллы 1-5: 0%	Нормальная
СС-10 Одна инъекция 2 мл (N = 4)	Балл 0: 100% Баллы 1-3: 0%	Балл 0: 100% Баллы 1-5: 0%	Нормальная
Synvisc® (Hylan GF-20) N = 8, из которых : - одна инъекция 1 мл (N = 4), - одна инъекция 2 мл (N = 4)	Балл 0: 62,5% Балл 1: 37,5% Баллы 2-3: 0%	Балл 0: 62,5% Балл 1: 37,5% Баллы 2-5: 0%	Нормальная

Пример 5. Оценка локальной переносимости составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения после внутрикожной инъекции у кроликов.

Составы трех карбоксиметилхитозанов грибного происхождения при физиологическом значении pH и осмоляльности готовили для оценки возможности их внутрикожного введения на модели кролика (табл. 5а). СС-12, СС-13, СС-14 и СС-15 грибного происхождения готовили путем карбоксиметилирования с последующим реацетилированием в соответствии с общим способом, описанным в примере 3 для СС-8, при этом модулируя параметры синтеза таким образом, чтобы вызвать варьирование DA и DS (табл. 5а). СС-13 и СС-14 показали низкое значение DS, равное 41% и 51%, соответственно, и высокое значение DA, равное 74% и 69%, соответственно.

Составы упаковывали в стеклянный шприц объемом 1 мл и затем стерилизовали в автоклаве в соответствии со стандартным циклом (15 мин при 121°C). Три состава оказались устойчивыми к стерилизации в автоклаве, при этом потеря характеристической вязкости составила менее 40%. В заключение, составы проверяли, чтобы удостовериться, что уровень бактериальных эндотоксинов составляет менее 40 ЕЭ/мл, и микробиологическая нагрузка составляет менее 100 КОЕ/мл.

Состав в объеме 200 мкл вводили кроликам путем внутрикожной инъекции через иглу с диаметром, соответствующим 27 калибру (игла с очень маленьким диаметром), согласно протоколу, который соответствует стандарту ISO10993 (часть 10) для оценки первичного раздражения, вызванного внутрикожным имплантатом. Шесть кроликов получали по три инъекции каждого состава. Коммерчески доступный продукт дермального филлера на основе сшитой гиалуроновой кислоты, Juvéderm® Voluma (Allergan), также вводили через иглу диаметром 27 калибра. Макроскопические сигналы раздражения кожи регистрировали для всех инъекцированных через 12, 24 и 48 ч животных и участков для определения балла первичного раздражения путем оценки возможного появления эритемы, язвы, отека и уплотнения по количественной шкале, основанной на баллах от 0 (нет сигнала) до 4 (максимальный сигнал). Балл первичного раздражения для каждого продукта определяли следующим образом: складывали средние значения баллов эритемы для 18 участков, инъекцированных через 24, 48 и 72 ч. Сумму средних значений балла отека рассчитывали аналогичным образом. Складывали 2 суммы (эритема и отек), и затем делили на 54 с получением среднего балла первичного раздражения. Такой же подход к методике применяли для продукта сравнения. Баллы раздражения представлены в табл. 5b. Наблюдалось, что составы СС показали отсутствие признаков отека и несколько признаков эритемы, при этом балл оказался ниже, чем у кроликов, индуцированных Juvéderm® Voluma во всех случаях. Можно сделать вывод о том, что составы являются нераздражающими и менее раздражающими, чем Juvéderm® Voluma.

Таблица 5a

**Характеристики карбоксиметилхитозанов
грибного происхождения и их составов**

№ (концентрация)	DA* (мол.%)	DS* (мол.%)	Растворимость полимера	Стерилизуемость в автоклаве*	Дзета-потенциал при pH 7.5 (мВ)
СС-12 (3%)	41	50	Нерастворим в интервале pH 3,1-6,6	Да	-17
СС-13 (3%)	74	45	Растворим при любом pH	Да	-20
СС-14 (3%)	69	51	Растворим выше pH 3,6	Да	-17***
СС-15 (2%)	55	100	Растворим выше pH 3,1	Да	-27,5

* Как определено методом 13С-ЯМР;

** считается стерилизуемым, если потеря характеристической вязкости до/после стерилизации в автоклаве составляет 40% или менее;

*** значение, оцененное из полиномиальной регрессии кривой дзета-потенциала при pH 7,5 как функция DS ($\pm 20\%$).

Таблица 5b

**Оценка балла первичного раздражения составов
карбоксиметилхитозана и Juvéderm® Voluma
после внутрикожной инъекции у кроликов**

№ (концентрация)	Балл первичного раздражения через 72 ч Общий балл (и средний балл)
СС-12 (3%)	0,11 (0,002)
СС-13 (3%)	0,22 (0,004)
СС-13 (3%)	0,17 (0,003)
СС-14 (2%)	0 (0)
Juvéderm® Voluma	2,67 (0,049)

Затем период наблюдения продлевали до 2 недель после инъекции, при этом клинические сигналы оценивали на дни 5, 7, 9, 11 и 14. Для проведения возможного гистологического анализа 2 животных умерщвляли на день 3, день 7 и день 14 после инъекции. Общие оценки представлены в табл. 5с. Наблюдалось, что четыре состава показали превосходную локальную переносимость в течение периода, составляющего 2 недели, после внутрикожной инъекции, при этом баллы были ниже по сравнению с баллами, наблюдаемыми для продукта Juvéderm® Voluma по всем общим или макроскопическим признакам, и без признаков язвы или отека. Составы СС-12 и СС-13 показали некоторые признаки эритемы с низким баллом (максимум 1), которые исчезли на день 11. Состав СС-13 показал некоторые признаки эритемы с максимальным баллом 2, при этом 33% случаев возникновения наблюдалось на день 9, которые также исчезли на день 11 и не оказывали вредного воздействия на ткань.

Таблица 5с

Оценка локальной переносимости составов карбоксиметилхитозана после внутривенной инъекции у кроликов (2 недели) (выраженная в виде частоты случаев возникновения в баллах)

№ (концентрация)	Период времени (кол-во участков)*	День 3 (18)	День 5 (12)	День 7 (12)	День 9 (6)	День 11 (6)	День 14 (6)
Балл эритемы							
СС-12 (3%)	Балл 0-1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	0%	0%	0%	0%
СС-13 (3%)	Балл 0-1	100%	100%	83%	67%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	17%	33%	0%	0%
СС-14 (3%)	Балл 0-1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	0%	0%	0%	0%
СС-15 (2%)	Балл 0-1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Juvéderm® Voluma	Балл 0-1	6%	17%	17%	17%	33%	33%
	Балл 2-4	94%	83%	83%	83%	67%	67%
Баллы язвы и отека							
СС-12 (3%)	Балл 0-1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	0%	0%	0%	0%
СС-13 (3%)	Балл 0-1	100%	100%	83%	67%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	17%	33%	0%	0%
СС-14 (3%)	Балл 0-1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	0%	0%	0%	0%
СС-15 (2%)	Балл 0-1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Juvéderm® Voluma	Балл 0-1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Балл 2-4	0%	0%	0%	0%	0%	0%

* Количество участков, оцененных макроскопически в каждый период времени после инъекции.

Кроме того, четыре композиции (СС-12, СС-13, СС-14 и СС-15) могут быть легко введены через тонкую иглу 27 калибра, подходящую для внутривенного введения.

Пример 6. Подверженность ферментативной деградации *in vitro*.

В этом примере проводили сравнение скорости, с которой состав разлагается в присутствии смеси двух ферментов лизоцима и гиалуронидазы, присутствующих в биологических жидкостях (например, синовиальной жидкости, слезах или интерстициальной жидкости соединительных тканей). Фермент лизоцим в целом известен своей способностью гидролизовать биоматериалы на основе хитозана.

Грибной карбоксиметилхитозан СС-16 получали таким же способом, как СС-8, указанный в примере 3, путем модулирования параметров синтеза для регулирования DA и DS. 2% составы СС-16, СС-8 (пример 3) и СС-10 (пример 3) готовили в фосфатном буфере с 3,5% сорбита. Также, проводили оценку 2% состава СС-3 животного происхождения (пример 2) и двух коммерчески доступных продуктов вискозапленментации на основе несшитой гиалуроновой кислоты (НА-1 и НА-2).

Состав разбавляли в 25 раз в фосфатном буфере. Затем раствор перемешивали в течение 12 ч и в разбавленный раствор добавляли смесь ферментов лизоцима и гиалуронидазы в дозах 184 единиц/мл и 2,6 единиц/мл, соответственно. Измерение характеристической вязкости проводили через регулярные интервалы с помощью автоматического капиллярного вискозиметра I-Visc (Lauda), оснащенного капилляром типа Ubbelohde (модель 0a). Затем рассчитывали период полужизни каждого состава, то есть время, необходимое для того, чтобы характеристическая вязкость полимера достигла половины своего первоначального значения (табл. 6).

Таблица 6

Период полужизни составов в присутствии смеси ферментов лизоцима/гиалуронидазы при 37°C

	СС-8 (2%)	СС-10 (2%)	СС-16 (2%)	СС-3 (2%)	НА-1	НА-2
DA/DS (мол. %)*	50/80	46/167	67/115	71/149	/	/
период полужизни (мин)	1200 мин	958 мин	612 мин	88 мин	73 мин	11 мин

* Определено с помощью твердофазной спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах углерода-13.

На основании полученных результатов становится понятно, что составы карбоксиметилхитозана гидролизуются смесью лизоцима/гиалуронидазы, и что кинетика гидролиза может быть модулирована посредством молекулярной структуры карбоксиметилхитозана. Это позволяет регулировать продолжительность нахождения продукта в соответствии с целевым терапевтическим применением. Отсюда также следует, что карбоксиметилхитозаны грибного происхождения разлагаются менее быстро, чем карбоксиметилхитозаны животного происхождения (СС-3), а также два коммерчески доступных продукта на основе гиалуроновой кислоты.

Пример 7. Воздействие тепла.

В этом примере шприцы, содержащие составы, помещали в печь при температуре, поддерживаемой при 60°C, на период 11 дней, что позволяет оценить их теплостойкость при температуре, которая выше,

чем обычная температура хранения. В каждом временном интервале шприц извлекали, и характеристическую вязкость полимера измеряли в соответствии со способом, описанным в примере 6. Представлено соотношение между вязкостью в заданном временном интервале и начальной вязкостью (в % от начальной вязкости).

Два карбоксиметилхитозана грибного происхождения, СС-17 и СС-18, получали таким же способом, как СС-8 в примере 3, путем модулирования параметров синтеза таким образом, чтобы регулировать DA и DS, и характеризовали с помощью ЯМР на ядрах углерода-13 (табл. 7). Их составляли при концентрации 2% в присутствии восстанавливающего сахара, сорбита или маннита, соответственно. Также, проводили оценку 2% состава СС-3 животного происхождения, указанного в примере 2 (с 3,5% сорбита), а также коммерчески доступного продукта вискозупплементации на основе несшитой гиалуроновой кислоты, указанной в примере 6 (НА-2).

Таблица 7

Изменение характеристической вязкости составов, хранящихся при 60°C (в % от начальной характеристической вязкости)

№ (концентрация, восстанавливающий сахар)	DA/DS (мол. %) *	День 3	День 7	День 11
СС-17 (2%, 3,5% сорбита)	71/49	96%	95%	91%
СС-18 (2%, 3,5% маннита)	71/49	100%	92%	91%
СС-3 (2%, 3,5% сорбита)	71/149	84%	80%	70%
НА-2	/	94%	92%	81%

* Как определено твердофазной спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах углерода-13.

Можно сделать вывод о том, что составы карбоксиметилхитозана грибного происхождения являются термостойкими и менее чувствительными, чем состав животного происхождения (СС-3) и коммерчески доступный продукт на основе гиалуроновой кислоты.

Пример 8. Способы снижения микробиологической нагрузки карбоксиметилхитозана.

Карбоксиметилхитозан грибного происхождения, СС-19, получали в соответствии со способом, используемым для получения СС-8 в примере 3, начиная с хитозана со "сверхвысокой" молекулярной массой. Он имеет следующие характеристики: DA 67% и DS 115% (по данным ЯМР на ядрах углерода-13), растворим при любом pH, прозрачный, неопалесцирующий. Дзета-потенциал состава при pH 7,5 согласно оценкам составляет -27 мВ (из полиномиальной регрессии кривой зависимости дзета-потенциала от DS). Готовили 2% состав СС-19 в фосфатном буфере с 3,5% сорбита, как описано в примере 3. Он имеет следующие характеристики: pH 7,3 и осмоляльность 279 мОсм/кг. Для тестирования их применимости и влияния на конечные характеристики состава, эффективно применяли два известных способа с целью уменьшения микробиологической нагрузки водных составов, и характеристическую вязкость состава (разбавленного в 25 раз) сравнивали с использованием капиллярного вискозиметра I-Visc (Lauda, капилляр 0а), и его показатель преломления измеряли с помощью рефрактометра HI88713 (Hanna) до и после процесса (табл. 8). Эти два способа представляли собой следующие:

автоклав: состав помещали в стеклянный шприц и затем шприц автоклавировали в соответствии со стандартным процессом (15 мин при 121°C);

фильтрация: объем 300 мл состава фильтровали, используя пористый фильтр 0,2 мкм (капсульный фильтр Prewflow, Pall).

Процесс фильтрации на 0,2-мкм фильтре происходил соответствующим образом при постоянном давлении, равном 2 бара, и постоянной скорости потока, равной приблизительно 6 л в 1 ч.

Таблица 8

Влияние способов фильтрации и автоклавирования на состав 2% СС-19

Показатель	Способ фильтрации (0,2 мкм)	Способ автоклавирования (15 мин 121°C)
Различие в характеристической вязкости (%)	14% снижение начальной вязкости	20% снижение начальной вязкости
Различие в показателе преломления	Нет различия	Нет различия

Можно сделать вывод, что оба способа оказывают слабое влияние в отношении восстановления материала (показатель преломления) и деградации полимера (характеристическая вязкость). Поэтому они применимы в промышленности для получения медицинских устройств и фармацевтических продуктов на основе составов карбоксиметилхитозана.

Пример 9. Смазывающая способность составов карбоксиметилхитозана грибного происхождения, in vitro.

Целью данного примера является иллюстрация смазывающей способности составов двух карбоксиметилхитозанов грибного происхождения, СС-8, указанного в примере 3 (2% и 1%), и СС-19, указанного в примере 8 (2%), в отношении их возможного применения в качестве внутрисуставного вискозуппле-

мента или в качестве офтальмологических капель для поверхности глаза. Смазывающую способность оценивали с использованием модели *in vitro*, которая позволяет оценить уменьшение трения между двумя поверхностями. Также, характеризовали состав СС-3 (2%) животного происхождения, указанный в примере 2, и коммерчески доступные продукты на основе гиалуроновой кислоты:

внутриуставные вискозосуппленменты: Synvisc® (Sanofi) и два вискозосуппленмента на основе несшитой гиалуроновой кислоты, HA-2, указанной в примерах 6 и 7, и HA-3;

глазные капли: два продукта на основе несшитой гиалуроновой кислоты (HA-4 и HA-5).

Кроме того, образец синовиальной жидкости брали из колена пациента, страдающего остеоартрозом, перед хирургической процедурой по установке коленного протеза. Жидкость хранили при -20°C , затем доводили до 25°C до анализа коэффициента трения.

Коэффициент трения измеряли по следующей методике. Два диска, изготовленные из биоматериала полиакрилатного типа, используемого для изготовления гидрофобных интраокулярных линз (как описано в патенте EP 1830898), имеющие диаметр 16,15 мм, предварительно гидратировали путем погружения в воду при температуре 60°C на период приблизительно 2 ч, затем фиксировали к верхней и нижней геометрии реометра Discovery Hybrid Rheometer-2 (DHR-2) (TA Instruments). Тестируемую жидкость в объеме приблизительно 100 мкл помещали на нижний диск, затем верхнюю геометрию опускали до достижения контакта между двумя дисками, до прилагаемой нормальной силы 5 Н. Измерения коэффициента трения проводили при 25°C в течение 150 с, при постоянной нормальной силе (5 Н), частоте колебаний 1,256 рад/с и угле деформации приблизительно 0,05 радиан, в соответствии с протоколом, адаптированным из протокола, описанного Waller et al. (в J Rheumatol 39, 7, 1473, 2012). Опция "соответствие нулевой точке начала колебательного движения" активирована. В каждой точке измерения записывали значение крутящего момента и затем рассчитывали коэффициент трения (COF) по формуле: $\text{COF} = \text{крутящий момент} / (1/3 \times \text{диаметр диска} \times \text{нормальная сила})$. Для каждого состава измерение повторяли 5 раз. Значение коэффициента трения получали путем экстраполяции точки пересечения в начале каждой кривой COF в зависимости от времени (COF0, табл. 7).

Таблица 9

Смазывающая способность составов
карбоксиметилхитозана грибного происхождения

№ (концентрация)	Коэффициент трения (COF ₀)		
	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3
Синовиальная жидкость от пациента с артритом	20	40	12
СС-8 (2%)	1,2	1,7	1,3
СС-8 (1%)	2,4	3,7	3,9
СС-19 (2%)	4,0	3,2	3,0
СС-3 (2%)	6,2	6,1	6,0
Synvisc®	3,2	3,1	3,8
HA-2	6,7	6,3	6,6
HA-3	5,3	5,6	4,5
HA-4	6,8	6,7	6,0
HA-5	29,4	13,3	26,1

В присутствии составов 2% и 1% карбоксиметилхитозана коэффициент трения является низким, того же порядка или даже ниже по сравнению с коммерчески доступными продуктами для внутрисуставного и офтальмологического применения, и значительно слабее по сравнению с пораженной артритом синовиальной жидкостью, в условиях измерения. Из этого следует, что составы на основе карбоксиметилхитозана обладают потенциалом действовать в качестве смазки путем уменьшения трения между двумя поверхностями, например, поверхностями хряща сустава после внутрисуставной инъекции или поверхностями глаза после закапывания в форме капель. Составы СС грибного происхождения являются более эффективными в отношении уменьшения трения по сравнению с составами СС-3 животного происхождения.

Пример 10. Применение тонких игл для введения состава карбоксиметилхитозана грибного происхождения внутрикожным путем.

Цель данного примера состоит в том, чтобы показать, что состав 2% карбоксиметилхитозана грибного происхождения может быть легко введен в дерму, в частности, путем использования очень тонких игл, предназначенных для инъекции в поверхностные слои дермы. Тест состоит в измерении силы, необходимой для вытеснения продукта из шприца, снабженного иглой, при заданной скорости введения на стенде для испытания на сжатие. В эмпирическом смысле полагают, что введение продукта является легким и удобным для врача и пациента, когда сила выталкивания, измеренная с помощью этого теста, составляет менее 50 ньютонов, и введение происходит равномерным и плавным образом. Полезно вводить продукт с помощью игл, имеющих диаметр менее 0,3 мм (30G), чтобы свести к минимуму боль и кровотечение при инъекции, а также последующий риск образования гематом и покраснения кожи.

Эталонный карбоксиметилхитозан грибного происхождения СС-20 получали в соответствии с общим способом СС-8, указанным в примере 3, начиная с хитозана "сверхвысокого" типа, со следующими модификациями: для 10 г хитозана использовали 228 мл изопропанола, 57 мл 40% гидроксида натрия и 47 г МСА. Реакцию проводили при 35°C в течение 23 ч. Для 15 г промежуточного карбоксиметилхитоза-

на использовали 7,5 мл уксусного ангидрида при каждом добавлении, и 3 дополнительных цикла очистки применяли перед сушкой и извлечением конечного карбоксиметилхитозана. СС-20 имеет следующие характеристики: DA 53% и DS 85% (определенные методом ЯМР на ядрах углерода-13), растворим в воде при любом pH (в соответствии со способом, описанным в настоящем документе выше), образует прозрачный и неопалесцирующий раствор, с дзета-потенциалом при pH 7,5, равным -24 мВ (из полиномиальной регрессии кривой дзета-потенциала в зависимости от DS).

Состав 2% (мас./мас.) СС-20 получали, как описано в примере 3. Состав упаковывали в стеклянный шприц объемом 1 мл (BD-Medical), на котором установлена игла. На стенде для испытаний на сжатие MultiTest 2.5-i (Mecmesin), оснащенном датчиком силы, работающим на сжатие, нагрузка 100Н, силу, необходимую для выталкивания продукта, измеряли путем применения постоянной скорости выталкивания 80 мм/мин. Максимальная сила, допустимая оборудованием, составляет приблизительно 70 ньютонов. Тестировали следующие иглы: 30G, 32G, 33G и Invisible Needle™ (TSK Laboratory), размеры которых (внешний диаметр x длина) приведены в табл. 10.

Для сравнения коммерчески доступные продукты на основе несшитой гиалуроновой кислоты (продукты сравнения HA-6, HA-7) и сшитой гиалуроновой кислоты (HA-8), предназначенные для омоложения кожи посредством внутрикожного введения, оценивали таким же способом в оригинальном шприце. Результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10
Сила выталкивания (в ньютонах) для выталкивания состава карбоксиметилхитозана грибного происхождения и коммерчески доступных продуктов для омоложения кожи через иглы для внутрикожной инъекции (скорость 80 мм/мин)

Игла Обозначение	TSK PRC-300131	TSK PRE-32009	TSK PRE-3304	TSK LDS-02009
Размеры	30G 0,3 x 13 мм	32G 0,26 x 9 мм	33G 0,24 x 4 мм	Invisible 0,2 x 9 мм
СС-20 (2 %)	12 Н	26 Н	27 Н	39 Н
HA-6	/	30 Н	30 Н	44 Н
HA-7	23 Н	29 Н	32 Н	40 Н
HA-8	22 Н	45 Н	46 Н	67 Н

Из этого примера можно сделать вывод о том, что аналогично продуктам для омоложения на основе несшитой гиалуроновой кислоты, состав СС-20 легко инъецируется путем использования тонких игл диаметром менее 0,3 мм. Отмечается, что измеренная сила выталкивания систематически даже ниже, чем у продуктов для омоложения на основе несшитой гиалуроновой кислоты. Продукт для омоложения на основе сшитой гиалуроновой кислоты требует систематически более высокого усилия, превышающего допустимый предел для иглы наименьшего диаметра (0,2 мм, Invisible Needle™). Кроме того, эти результаты были подтверждены узкими специалистами с помощью качественного теста, заключающегося во введении состава СС-20 и продуктов для омоложения в кожу ноги свиньи.

Пример 11. Составы с низкой концентрацией карбоксиметилхитозана грибного происхождения на предмет применения в качестве глазных капель.

Цель данного примера заключается в том, чтобы показать, что раствор карбоксиметилхитозана грибного происхождения с низкой концентрацией можно применять для изготовления глазных капель, предназначенных для применения для уменьшения симптомов нарушений глазной поверхности или для их защиты. В дополнение к физиологическим характеристикам, то есть предпочтительному значению pH около 7,2 и осмоляльности около 200 мОсм/кг, офтальмологические капли должны предпочтительно обладать следующими физико-химическими свойствами: низким показателем преломления (близким к 1,33) и способностью сводить к минимуму трение между поверхностью глаза и конъюнктивой и веками (смазывающей способностью). Наконец, его реологический профиль таков, что продукт является не слишком жидким, чтобы его можно было нанести на глаз, а скорее распространяется равномерно и не является липким. Его реологический профиль также должен быть таким, чтобы трепетание или моргание век было легким, без накопления, то есть низкая вязкость при высокой скорости сдвига. В частности, Orobia et al. считают, что вязкость при движении глаз (исключая трепетание век) предпочтительно превышает 10 мПа·с, например, составляет около 20 мПа·с (в *Clinical Ophthalmology* 12, 453, 2018). Здесь следует отметить, что значение вязкости может варьироваться в зависимости от способа измерения и, в частности, оборудования, режима измерения и параметров, температуры и скорости сдвига, применяемых к тестируемому продукту.

Сравнительный карбоксиметилхитозан СС-21 грибного происхождения получали в соответствии с тем же способом, что и СС-20, указанный в примере 10. Проводили сравнение молекулярных структур СС-20 и СС-21 в кислотной форме с помощью ИК-Фурье-спектроскопии с использованием спектрометра Nicolet iS5, оснащенного ID7-ATR (Thermo Scientific), в соответствии со способом, описанным Chen et al. Chen et al. (*Carbohydrate Polymers* 53, 355, 2003). Установлено, что их молекулярные структуры являются идентичными на 99% в области длин волн 1200-1800 см⁻¹ и, как следствие, являются схожими их DA и DS.

Готовили два состава карбоксиметилхитозана СС-21 с концентрацией 0,7% и 0,4% (мас./мас.) в фосфатном буфере с глицерином. Значение рН довели до $7,2 \pm 0,2$ и осмоляльность до 200 ± 20 мОсм/кг, и затем составы фильтровали, после чего их смазывающую способность и профиль вязкости характеризовали в соответствии со способами, описанными ниже. Офтальмологические капли переменного состава на основе гиалуроновой кислоты (НА) характеризовали в соответствии с теми же способами (от НА-5 до НА-9). Результаты представлены в табл. 11b.

Способ измерения коэффициента трения (подходит для глазных капель).

Способность смазывать, то есть уменьшать трение между двумя контактирующими поверхностями, оценивали путем измерения коэффициента трения между двумя дисками, изготовленными из полиакрилатного биоматериала, который идентичен материалам, указанным в примере 9. Два диска фиксировали к верхней и нижней геометрии реометра DHR-2 (TA Instruments), тестируемый продукт в объеме приблизительно 100 мкл помещали на нижний диск, затем верхнюю геометрию опускали до приведения в контакт двух дисков, до приложенной нормальной силы 5 ньютонов. Измерение коэффициента трения проводили при 25°C в течение 60 с при постоянной нормальной силе (5 Н), частоте колебаний 6 рад/с и угле деформации приблизительно 1,71 радиан в соответствии с протоколом, адаптированным из Waller et al. (J Rheumatol 39, 7, 1473, 2012), и параметрами, имитирующими кинематические условия моргания век, описанные Kwon et al. (J Royal Society Interface 10, 2, 2013). Опция "соответствие нулевой точке начала колебательного движения" активирована. В каждой точке измерения записывали значение крутящего момента и затем рассчитывали коэффициент трения (COF) по формуле: $COF = \text{крутящий момент} / (1/3 \times \text{диаметр диска} \times \text{нормальная сила})$. Было определено, что среднее значение COF находится в диапазоне между 0 и 60 с. Таким образом рассчитывали средний коэффициент трения, а также стандартное отклонение 5 последовательных измерений. Минимальное значение COF равно 52 в случае, когда две поверхности не соприкасаются. Верхний предел COF соответствует случаю, когда два диска больше не находятся в движении относительно друг друга.

Учитывая, что значение COF колеблется от одной серии к другой, необходимо охарактеризовать продукты, подлежащие сравнению, в одних и тех же сериях, используя одни и те же диски и в случайном порядке. Шкалу сравнительных баллов затем использовали для классификации продуктов, протестированных в одной и той же серии, от наиболее эффективных (балл 1) до наименее эффективных (балл 3) в соответствии с критериями, представленными в табл. 11a. Пределы "COF_A" и "COF_B" определяются COF двух коммерчески доступных глазных капель, взятых в качестве сравнения для каждой серии: капли А (состоящие из 0,15% НА и 0,25% карбомера) и капли В (0,15% НА). Согласно этой шкале предпочтительно, чтобы балл уменьшения трения был равен 1 или 2 и предпочтительно 1 для применения в качестве смазывающей капли для смазывания глазной поверхности. Для продуктов с баллом 3 смазывающая способность не является удовлетворительной, и отклонения при измерении являются значительными.

Таблица 11a

Шкала оценки смазывания (снижение трения)	
Балл	Пределы COF
1	$\leq 1,1 \times COF_A$
2	$> 1,1 \times COF_A$ и $\leq 1,1 \times COF_B$
3	$> 1,1 \times COF_B$

Методы измерения вязкости как функции сдвига.

Simmons et al. определили, что скорость сдвига при движениях открытого глаза составляет около 10 с^{-1} , а скорость сдвига при трепетании век составляет около 10000 с^{-1} (в Clinical Ophthalmology 11, 1637, 2017). Метод реометрических измерений выбирали в зависимости от диапазона подлежащих изучению скоростей сдвига и с учетом того, что продукты представляют собой жидкие растворы с низкой вязкостью:

Диапазон сдвига, соответствующий движению глаза. Вязкость измеряли во вращательном режиме путем испытания на текучесть "flow sweep test" при помощи реометра DHR-2 с регулируемым напряжением (TA Instruments), оснащенного пластиной Пельтье и геометрией типа "конус" диаметром 60 мм и углом усечения 2°. Продукт уравнивали в течение 1 мин до 37°C, температуру контролировали при помощи элемента Пельтье. Для того, чтобы избежать испарения система оснащена ловушкой для растворителя и металлической крышкой. Затем запускали испытание "flow sweep test" и вязкость измеряли как функцию скорости сдвига, от $0,001 \text{ с}^{-1}$ до 100 с^{-1} . Показано значение вязкости при 10 с^{-1} .

Диапазон сдвига, соответствующий трепетанию век. Вязкость измеряли во вращательном режиме с помощью испытания "flow sweep test" при помощи реометра DHR-2 с регулируемым напряжением (TA Instruments), оснащенного геометрией типа "двойной зазор Куэтта (цилиндрический)" и концентрическим цилиндром Пельтье, и оснащенного ловушкой для растворителя и металлической крышкой. Продукт уравнивают в течение 1 мин до 37°C, а затем применяли переменную скорость сдвига, варьирующуюся от $0,001 \text{ с}^{-1}$ до 10000 с^{-1} . Значение вязкости при 10000 с^{-1} , таким образом, затем сравнивали со значением при 10 с^{-1} .

Таблица 11b

Характеристики составов с низкой концентрацией карбоксиметилхитозана грибного происхождения и глазных капель на основе гиалуроновой кислоты

Продукт сравнения	Показатель преломления	Вязкость		Балл снижения трения
		при 10 с ⁻¹ (мПа.с)	при 10000 с ⁻¹ (мПа.с)	
Фосфатный буфер с глицерином	1,3348	нет данных	нет данных	не поддается измерению
СС-21 0,7%	1,3358	27	Ниже, чем вязкость при 10 с ⁻¹	1
СС-21 0,4%	1,3353	10		1
НА-5	1,3343	6	Ниже, чем вязкость при 10 с ⁻¹	2
НА-10	1,3386	3		2
НА-11	1,3350	6		2
НА-12	1,3346	50		2

Результаты подтверждают, что два состава грибного карбоксиметилхитозана СС-21 соответствуют техническим характеристикам офтальмологических капель: они имеют низкий показатель преломления, удовлетворительный коэффициент трения (балл 1, то есть такие же эффективные, как большинство смазывающих коммерчески доступных капель), вязкость 10-30 мПа с в условиях движения глаз и более низкую вязкость в условиях трепетания век. Без карбоксиметилхитозана фосфатный буфер, дополненный глицерином, не отвечал техническим характеристикам офтальмологических капель. Наконец, следует отметить, что вязкость может быть уменьшена путем снижения концентрации карбоксиметилхитозана (например, от 0,7% до 0,4%) без неблагоприятного изменения способности уменьшать трение (балл 1).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Карбоксиалкилхитозан грибного происхождения, имеющий глюкозаминовые звенья, N-ацетилглюкозаминовые звенья и глюкозаминовые звенья, замещенные карбоксиалкильной группой, причем указанный карбоксиалкилхитозан имеет степень замещения карбоксиалкильной группой, которая составляет более 50%, выраженная в виде количества молей заместителя по отношению к количеству молей всех звеньев.

2. Карбоксиалкилхитозан по п.1, в котором степень замещения карбоксиалкильной группой составляет более 70%, выраженная в виде количества молей заместителя по отношению к количеству молей всех звеньев.

3. Карбоксиалкилхитозан по п.1 или 2, в котором степень замещения карбоксиалкильной группой составляет менее 200%, выраженная в виде количества молей заместителя по отношению к количеству молей всех звеньев.

4. Карбоксиалкилхитозан по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что хитозан получен из мицелия грибов, выбранных из группы, состоящей из типа Ascomycetes и Basidiomycetes.

5. Карбоксиалкилхитозан по любому из пп.1-4, в котором карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования в диапазоне от 40 до 80%, выраженную в количестве молей N-ацетилглюкозаминовых звеньев по отношению к количеству молей всех звеньев.

6. Карбоксиалкилхитозан по любому из пп.1-5, который является реацетилированным.

7. Карбоксиалкилхитозан по любому из пп.1-6, который является стерилизованным.

8. Иммуносовместимая композиция, которая содержит по меньшей мере один карбоксиалкилхитозан, определенный по любому из пп.1-7.

9. Инъецируемая композиция, которая содержит по меньшей мере один карбоксиалкилхитозан, определенный по любому из пп.1-7.

10. Фармацевтическая композиция, которая содержит по меньшей мере один карбоксиалкилхитозан, определенный по любому из пп.1-7.

11. Композиция по п.9 или 10, которая представляет собой фармацевтическую композицию или медицинское устройство, которое является инъецируемым, имплантируемым или подходящим для инстилляций.

12. Применение композиции по п.11 в способе терапевтического лечения, включающем инстилляцию или инъекцию указанной композиции подкожным, внутрикожным, глазным, внутриглазным или внутрисуставным путем.

13. Применение по п.12, отличающееся тем, что ткань тела выбрана из тканей, принадлежащих го- лосовым связкам, мышцам, связкам, сухожилиям, хрящам, половым органам, костям, суставам, глазам, коже, эпидермису, артикулярным суставам или любой из их комбинаций.

14. Применение по п.12 или 13, где способ терапевтического лечения представляет собой способ лечения остеоартрита или способ восстановления дефекта хряща.

15. Применение по п.14, где способ лечения включает инъекцию указанной композиции в синовиальную жидкость или имплантацию указанной композиции в хрящ после смешивания с кровью.

16. Медицинское устройство, отличающееся тем, что оно содержит или состоит из композиции, определенной по любому из пп.8-11.

17. Медицинский имплант, отличающийся тем, что содержит или состоит из композиции, определенной по любому из пп.8-11.

18. Способ получения композиции, содержащей карбоксиалкилхитозан, определенный по любому из пп.8-11, причем указанный способ включает

- растворение карбоксиалкилхитозана, определенного в любом из пп.1-9, в водном растворе;
- доведение рН до желаемого рН;
- добавление других вспомогательных веществ;
- регулирование конечной осмоляльности композиции.

