

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193053 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.21

(51) Int. Cl. C08B 37/08 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.20

(54) ХИТОЗАН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) FR1905504

(32) 2019.05.24

(33) FR

(86) PCT/EP2020/064159

(87) WO 2020/239591 2020.12.03

(71) Заявитель:
КИОМЕД ФАРМА (BE)

(72) Изобретатель:

Шоссон Микаэль (BE), Эрмит Лоранс
(FR), Амер Венсан, Готье Сандрин,
Дуэтт Пьер (BE)

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

(57) Изобретение относится к сшитому карбоксиалкилхитозану, образующему матрицу, композициям, включающим его, способу его изготовления и его различным применениям, в частности, в области терапии, ревматологии, офтальмологии, эстетической медицины, пластической хирургии, открытых операций, дерматологии, гинекологии и косметики. Изобретение относится, в частности, к матрице, включающей по меньшей мере один карбоксиалкилхитозан, имеющий глюкозаминные звенья, N-ацетилглюкозаминные звенья и глюкозаминные звенья, замещенные карбоксиалкильной группой, причем карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования, колеблющуюся от 40 до 80%, выраженную в числе молей N-ацетильных групп относительно числа молей всех глюкозаминных звеньев, причем карбоксиалкилхитозан сшит ковалентными связями между цепями карбоксиалкилхитозана.

A1

202193053

202193053

A1

ХИТОЗАН И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к сшитому карбоксиалкилхитозану, образующему матрицу, композициям, включающим его, способу его получения и его различным применениям, в частности, в области терапии, ревматологии, офтальмологии, эстетической медицины, пластической хирургии, открытых операций, дерматологии, гинекологии и косметики.

Уровень техники

Производные хитозана известны, особенно в применениях Kiomed Pharma, опубликованных в WO 2016/016463 и WO 2016/016464 и соответствующих патентах. От Kiomed Pharma также известны преимущества производных хитозана, таких как карбоксиалкилхитозаны, описанные в заявках на патент от Kiomed Pharma, зарегистрированных как PCT/EP2018/080763 и PCT/EP2018/080767 и родственных им, включенных в настоящее изобретение в качестве ссылок.

Согласно авторам настоящего изобретения, может быть выгодной возможность регулирования биохимического поведения композиций карбоксиалкилхитозанов или даже увеличивать время или эффект лечения за счет присутствия карбоксиалкилхитозана. Однако для специалистов в данной области техники не очевидно, чтобы такие композиции обладали улучшенными биомеханическими свойствами, в частности, когда желательно получить гидрогель. Среди композиций биополимеров и в особенности гидрогелей на известном уровне техники одна из технических проблем композиций на основе биополимеров, известных специалистам в данной области техники, заключается в факте, что некоторые композиции не находятся в форме когезивного гидрогеля, т.е., гидрогель спонтанно распадается на отдельные части в присутствии водной среды, образуя таким образом частицы, фрагменты. Это также известно как фрагментированный гель или гидрогель.

Признано, что такие некогезивные гидрогели представляют опасность длительного воспалительного образования узелков или гранулематозной реакции, когда продукт имплантируется в ткани человека или животного, что считается нежелательным для многих медицинских применений (Bergerey-Galley, Aesth. Surf. J., 24, 33, 2004). Поэтому с точки зрения безопасности для здоровья субъекта или пациента важна возможность избежать образования разрозненных фрагментов и получать композиции в форме когезивных гидрогелей.

Кроме того, в некоторых случаях по нескольким причинам желательно избежать таких агрегатов для улучшения эстетического (визуального и/или на ощупь) внешнего вида тканей, заполняемых такой композицией, должным образом интегрированной в ткань или ткани, позволяющей гомогенное заполнение.

Таким образом, для многих применений предпочтителен когезивный гидрогель, который остается в одном блоке, например, когда к нему добавляется водная среда. Это также называют «гомогенным» гидрогелем. Кроме того, для большинства применений предпочтителен гидрогель, который называют «гладким» гидрогелем из-за его внешнего вида без комков или с их небольшим количеством.

Кроме когезии композиция согласно изобретению, и в частности гидрогель, должна подходить для применения людьми или животными, особенно с точки зрения безопасности, иммуносовместимости, биорезорбируемости, биомеханических свойств и продолжительности жизни или активности. Однако не все композиции известного уровня техники удовлетворительно проявляют такие свойства и, следовательно, не соответствуют настоящему изобретению.

Известны различные способы осуществления перевода карбоксиалкилхитозанов в форму гидрогеля. В частности, Rufato et al. (Intechopen., 81811, 2018), Upadhyaya et al. (J. Controlled Release, 2014), и Fonseca-Santos et al. (Mater. Sci. Engineering C 77, 1349, 2017) идентифицировали несколько гидрогелей на основе хитозанов, в том числе карбоксиалкилхитозанов, для медицинских или фармацевтических применений. Однако ни один из этих гидрогелей не является тем, который ищут авторы изобретения, поскольку они не соответствуют ожиданиям, в частности, одновременно с точки зрения когезии, безопасности, иммуносовместимости, биомеханических свойств, биорезорбируемости и продолжительности жизни или активности. Ни один из карбоксиалкилхитозанов, используемых для получения известных гидрогелей согласно уровню техники, не проявляет хорошей иммуносовместимости согласно авторам изобретения, кроме композиций Kiomed Pharma, соответствующих вышеуказанным заявкам РСТ/ЕР2018/080763 и РСТ/ЕР2018/080767. Далеко не любой хитозан можно использовать для образования гидрогелей, приемлемых для использования для людей или животных.

Известные на сегодня гидрогели на основе хитозанов получают, комбинируя хитозан или одно из его производных с другими полимерами, например, альгинатом, изопропилакриламидом, полиуретаном, полиакрилонитрилом, желатином, полиэтиленгликолем (ПЭГ), поливиниловым спиртом (PVA). Однако такие полимеры или не являются биорезорбируемыми или являются иммунореактивными, что не соответствует целям изобретения.

Например, Huang et al. (RCS Adv., 2016 D01:10.1039/C5RA26160K) получили гидрогель гликольхитозана и гиалуронана, однако такой гликольхитозан неприемлем для людей, поскольку он является иммунореактивным. Song et al. (Sci. Rep., 6, 37600, 2016) получили гидрогель на основе карбоксиметилхитозана и окисленного гиалуронана через взаимодействие Шиффова основания с аминогруппами карбоксиметилхитозана и гиалуроновыми альдегидами. Однако, по опыту авторов настоящего изобретения, используемый карбоксиметилхитозан не имеет молекулярную структуру, требуемую для удовлетворения целям настоящего изобретения. В частности, описанный гидрогель резорбирует очень быстро согласно тому, что показывают испытания *in vitro* и *in vivo*. Поэтому такой гидрогель нуждается в улучшении, особенно в отношении продолжительности жизни, для того, чтобы применяться в широком диапазоне показаний.

Кроме того, предшествующие продукты часто не очень разносторонние для соответствия потребностям для различных показаний, особенно различных терапевтических показаний. Поэтому существует необходимость в предоставлении продукта, который достаточно разносторонний с точки зрения свойств, особенно биомеханических свойств, для легкой

адаптации к различным применениям.

Например, в восстановительной медицине или хирургии, как правило, стремятся восстановить измененную ткань или жидкость и/или предотвратить изменение тканей, заполнить ткань или даже разделить ткани, чтобы избежать спаек. Причиной изменения ткани может быть естественное старение, внешняя агрессия (травма, УФ-излучение, операция...), патология, например, воспаление, аутоиммунная патология, и т.д. Но наибольшие изменения тканей включают стресс окисления, иногда называемый окислительным стрессом, характеризующийся высоким содержанием видов свободных радикалов, способных повреждать ткань или клетки. Уменьшение количества свободных радикалов позволяет ткани предотвращать/замедлить ее старение и уменьшить его вредные последствия. Существует несколько путей уменьшения количества свободных радикалов в ткани, например, путем введения антиоксидантов, таких как витамины С, В, Е, и/или убихинона. С другой стороны, можно использовать композицию, способную поглощать свободные радикалы, причем таким образом снижается их содержание и распространение в ткани.

Хитозан и некоторые его производные показывают способность поглощать окислительные свободные радикалы, что описано для многих препаратов для применения в биомедицине, перечисленных в обзоре Ngo et al. (Adv. Food Nutrition Res., 73, 15, 2014). Например, карбоксиметилхитозаны различной структуры и молекулярной массы исследованы на их способность поглощать различные типы свободных радикалов с использованием методов *in vitro*, как описано в частности Ujang et al. (The Development, Characterization and Application of Water Soluble Chitosan; in Biotechnology of Biopolymers, InTech, 2011. ISBN: 978-953-307-179-4).

Однако затруднительно предоставить композиции для применения благоприятного действия хитозана, особенно его способности поглощать свободные радикалы, в форме лечения, позволяющего как уменьшать воздействие окислительного стресса на ткани, так и лучше регулировать биомеханическое поведение продукта или даже увеличивать продолжительность жизни или действия лечения за счет присутствия такого полимера экзогенного происхождения.

Таким образом, уровень техники очевидно не позволяет специалистам в данной области техники предоставить удовлетворительную композицию для преодоления проблем, указанных в настоящем изобретении.

Задачи изобретения

Одной из задач изобретения является решение технической проблемы предоставления производного хитозана или композиции, включающей его, подходящих для применения для человека или животного, в частности, в областях терапии, хирургии и косметологии.

Одной из задач изобретения является решение технической проблемы, состоящей в предоставлении производного хитозана или композиции, включающей его, для использования благоприятного действия хитозана, особенно его способности поглощать свободные радикалы, в форме лечения, делающей возможным как уменьшение воздействия окислительного стресса на ткани, так и лучшего регулирования биомеханического поведения продукта и увеличение

продолжительности жизни или действия лечения за счет присутствия такого полимера экзогенного происхождения.

В частности, одной из задач изобретения является решение технической проблемы предоставления композиции, особенно в форме биорезорбируемого гидрогеля, адаптированного для использования в контакте с тканью человека или животного, приемлемого с точки зрения биомеханических свойств, продолжительности жизни *in situ* или продолжительности действия, безопасности для здоровья (в частности, отсутствия иммунологической реакции и/или посторонней реакции на организм небольшое или длительное время) и наличия благоприятного действия, в частности, в контексте восстановительной медицины или антивозрастной медицины, например, в терапевтической, ревматологической, ортопедической, гинекологической, офтальмологической областях, эстетической медицины, пластической хирургии, открытой операции, дерматологической или косметической областях.

Одной из задач изобретения является решение технической проблемы предоставления композиции с хорошими биомеханическими свойствами, и в частности, биомеханическими свойствами, которые регулируются в соответствии с показаниями.

Одной из задач изобретения является решение технической проблемы предоставления продукта на основе производного хитозана, позволяющего получить ряд продуктов с изменяющимися биомеханическими свойствами, адаптированных к каждому предполагаемому показанию.

Одной из задач изобретения является решение технической проблемы предоставления композиции, обеспечивающей, предпочтительно одновременно, когезию, безопасность (включая иммуносовместимость), биомеханические свойства, биорезорбируемость, достаточные для введения человеку или животному, и предпочтительно с соответствующей продолжительностью жизни или продолжительностью активности.

Одной из задач изобретения является решение технической проблемы, поставленной в настоящем изобретении, путем предоставления, в частности, производного хитозана или композиции, содержащей его, уровня, приемлемого для человека или животного при предполагаемом показании.

Раскрытие изобретения

Для того, чтобы решить проблемы, поставленные в изобретении, авторы изобретения стремились разработать хитозан, имеющий как хорошие антиоксидантные свойства, так и хорошие механические свойства для предполагаемого применения для людей и животных (называемых биомеханическими свойствами).

Авторам изобретения известно из их собственного опыта о замещенном хитозане, в частности, карбоксиалкилхитозане. В частности, Kiomed Pharma подала заявки РСТ/ЕР2018/080763 и РСТ/ЕР2018/080767. Они пытаются применить эти идеи для решения технических проблем, поставленных в изобретении.

Авторами изобретения отмечено, что карбоксиалкилхитозановый гидрогель,

образовавшийся с помощью ионных (т.е., нековалентных) поперечных связей, не сохраняет свои биомеханические свойства достаточно долго после имплантации в случае некоторых предполагаемых применений; в особенности, такая технология не предусматривает широкую модуляцию продолжительности жизни или активности. Кроме того, карбоксиалкилхитозановые гидрогели, образованные катализированным ферментативно сшиванием, имеют опасность ферментативной иммунореактивности из-за своей белковой природы и осложнений при финальной очистке полученного сшитого продукта.

В заявке на патент CN 107325306 (Imeik Technology Development) описывается получение гелей на основе полученного из ракообразных карбоксиметилхитозана путем сшивания с помощью BDDE в нескольких последовательных стадиях сшивания (множественное сшивание). Однако такой способ не обеспечивает гидрогель, соответствующий критериям изобретения, в частности, полученный гель не является когезивным, так как он образуется частицами сшитых производных хитозана, которые диспергированы в растворе карбоксиметилхитозана, причем все они снова сшиты с образованием геля. Операцию сшивания повторяют несколько раз («множественное сшивание»). Такой продукт вероятно должен образовывать гранулемы и таким образом отрицательно воздействует на иммуносовместимость после контакта с организмом человека или животного, чего именно и стремится избежать изобретение. Изобретение дополнительно выгодно допускает большее разнообразие показаний, особенно когда желателен когезивный (т.е., остающийся в одном блоке и не распадающийся, например, при контакте с водой) и/или «гладкий» по внешнему виду гидрогель. Согласно CN 107325306, используемый карбоксиметилхитозан имеет низкую DA (степень деацетилирования 60-99%, предпочтительно 80-95%, т.е., на практике степень ацетилирования (DA) значительно ниже 40%). Карбоксиметилхитозановые гидрогели с низкой степенью ацетилирования также описаны Czechowska-Biskup et al. (D01: 10.15259.PCACD.21.03). Однако такие гидрогели не являются когезивными и не соответствуют целям настоящего изобретения.

Авторы изобретения раскрывают, что сшитая матрица карбоксиметилхитозана согласно изобретению или композиция, особенно гидрогель, включающий ее, делает возможным решение по меньшей мере одной, а предпочтительно всех технических проблем, поставленных в изобретении.

Таким образом, изобретение относится к матрице, включающей по меньшей мере один карбоксиалкилхитозан, имеющий глюкозаминные звенья, N-ацетилглюкозаминные звенья и глюкозаминные звенья, замещенные карбоксиалкильной группой, причем указанный карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования, колеблющуюся от 40% до 80%, выраженную в числе молей N-ацетильных групп относительно числа молей всех глюкозаминных звеньев, причем указанный карбоксиалкилхитозан сшит ковалентными связями между цепями карбоксиалкилхитозана.

Действительно, обнаружено, что сшитый карбоксиалкилхитозан с DA меньше 40% не позволяет получить гидрогель с желательной когезией, при этом он фрагментируется на

отдельные фрагменты во время увлажнения, что нежелательно для многих применений.

Согласно настоящему изобретению, когезивный гидрогель следует понимать как гидрогель, который сохраняет свою когезию согласно следующему испытанию на когезию, названному «водный тест», с помощью методов адаптации, обычно используемых для характеристики гидрогелей для интрадермального применения, например, описанного Micheels et al. (J. Clin. Aesth. Dermatol., 10, 29, 2017, и J. Drugs Dermatol., 15, 1092, 2016).

Для испытания 1 г гидрогеля помещают в центр стеклянной чашки Петри диаметром 5 см. По периферии чашки добавляют 1 мл дистиллированной воды. Чашку Петри осторожно покачивают, пока вода не покроет гидрогель, и затем возвращают в горизонтальное положение. Наблюдают, остается ли гидрогель целым сразу после контакта матрицы с водой и предпочтительно после контакта в течение 15-25 секунд, и предпочтительно после контакта в течение по меньшей мере 30 секунд, т.е., образуется ли единый кусочек, когда он когезивный, или образуются частицы, видимые невооруженным глазом, когда он некогезивный.

Кроме того, обнаружено, что выгодно, что матрицы в соответствии с изобретением способны поглощать виды свободных радикалов. Сохранение такого свойства хитозана вовсе не очевидно для специалистов в данной области техники. Хотя известно, что молекулярная структура (DS) и молекулярная массы карбоксиалкилхитозана влияют на его способность поглощать свободные радикалы, опубликованы противоречивые результаты. Следовательно, не было ясно, что сшитый карбоксиалкилхитозан проявляет способность поглощать свободные радикалы.

Кроме того, гидрогели согласно изобретению показывают такую антиоксидантную активность в то время, обладая в то же время соответствующими когезией, биомеханическим профилем, долговечностью и безопасностью.

Кроме того, не было ясно, что сшитый карбоксиалкилхитозан, полученный в виде гидрогеля, будет когезивным, предпочтительно гладким, т.е., без отдельных, видимых или различимых на ощупь фрагментов, и иметь соответствующую безопасность, в частности, иммуносовместимость, биомеханический профиль и долговечность. Изобретение делает возможным предоставление такой матрицы или композиции, в частности, в форме гидрогеля. В случае сшитой матрицы, являющейся иммуносовместимой, т.е., не являющейся иммунореактивной, и которая по существу не активирует иммунную реакцию, ее следует по меньшей мере получать из не являющегося иммунореактивным полимера или полимеров. Для подтверждения того, что полимер не является иммунореактивным, используют специфические и стандартизированные испытания, например, анализ цельной крови человека (*in vitro*) и подкожную инъекцию в воздушный мешок у мышей.

Можно согласиться с тем, что гидрогель, образованный матрицей согласно изобретению, не является полностью гладким и имеет, например, видимые или ощутимые на ощупь комки, при условии, что он является когезивным согласно вышеуказанному водному тесту.

Матрица согласно настоящему изобретению может быть охарактеризована исходным карбоксиалкилхитозаном, который сшит с образованием матрицы согласно изобретению.

Согласно первому аспекту, используют карбоксиалкилхитозан грибного происхождения, имеющего карбоксиалкилзамещенные глюкозаминные звенья, N-ацетилглюкозаминные звенья и глюкозаминные звенья, причем указанный карбоксиалкилхитозан предпочтительно имеет степень замещения карбоксиалкильной группой больше 20%, выраженной числом молей заместителя относительно числа молей всех звеньев.

Это также относится к производному хитозана или замещенному хитозану.

Карбоксиалкилхитозан получают путем замещения в хитозане. Типично карбоксиалкилхитозан получают согласно заявкам на патент от Kiomed Pharma, зарегистрированным как РСТ/EP2018/080763 и семейство ее аналогов (особенно FR 17 61314 и EP 18799772.1) и РСТ/EP2018/080767 и семейство ее аналогов (особенно FR 17 61323 и EP 18799773.9), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок, в частности, для иллюстрации получения карбоксиалкилхитозана.

Хитозан, например, условно обозначен в CAS под номером 9012-76-4.

Хитозан, используемый для изобретения, преимущественного грибного происхождения и предпочтительно получен из мицелия гриба типа *Ascomycete*, и в частности *Aspergillus niger*, и/или гриба *Basidiomycete*, и в частности *Lentinula edodes* (шиитаке) и/или *Agaricus bisporus* (белый гриб). Предпочтительно хитозан получают из *Agaricus bisporus*. Хитозан предпочтительно имеет высокую степень чистоты, т.е., содержит мало примесей из своего грибного источника или из процесса изготовления, и по микробиологическим показателям совместим с его применением в виде имплантата или фармацевтической композиции. Один из способов получения хитозана описан в заявке на патент WO 03/068824 (EP 1483299; US 7 556 946).

Как правило, хитин суспендируют в водной среде в присутствии гидроксида натрия, затем среду греют при высокой температуре в течение различного времени в зависимости от желательной молекулярной массы. Затем хитозан очищают, растворяя в кислой среде и высаживая в щелочной среде, промывают и сушат.

Предпочтительно хитозан имеет степень чистоты, достаточно высокую для фармацевтического применения.

Преимущественно хитозан очищают и затем, предпочтительно, сушат. После очистки способ по изобретению может включать стадию сушки карбоксиалкилхитозана и затем необязательное измельчение его в порошок. Карбоксиалкилхитозан можно сушить, например, выпаривая воду, например, распылительной сушкой (атомизация), способом в ожиженном слое или сушкой нагреванием в вакууме или при атмосферном давлении, или путем лиофилизации.

Карбоксиалкилхитозан можно растворить в водном растворе и, например, в воде фармацевтического сорта, приемлемой для инъекции или имплантации в организм, и в частности, в организм человека.

Затем такой карбоксиалкилхитозан сшивают и получают матрицу согласно изобретению.

DA и DS сшитого карбоксиалкилхитозана можно выразить как функцию DA и DS не являющегося сшитым карбоксиалкилхитозана, поскольку DA и DS по существу не изменяются

после сшивания. Однако, если сшивающий агент предоставляет N-ацетильные или карбоксиалкильные группы, такие группы, которые являются инородными для исходного не являющегося сшитым карбоксиалкилхитозана, не учитываются в DA и DS сшитого карбоксиалкилхитозана. Величины DA и DS известны для специалистов в данной области техники, как поясняется ниже. Поэтому DA и DS относятся к карбоксиалкилхитозану как до, так и после сшивания.

Степень ацетилирования (DA) хитозана определяют, например, потенциометрическим титрованием, как описано, например, в заявках на патент WO2017009335 и WO2017009346. С другой стороны, DA можно измерить другими методами, известными для хитозана, такими как жидкофазный протонный ЯМР, твердофазный углерод-13 ЯМР, инфракрасная спектроскопия.

Преимущественно карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования от 40 до 80%, выраженную как число молей N-ацетилглюкозаминных звеньев относительно числа молей всех звеньев. Степень ацетилирования выражают как число N-ацетильных групп (D-глюкозаминных звеньев) относительно числа всех глюкозаминных звеньев, присутствующих в хитозане (N-ацетил-D-глюкозамина, замещенного N-ацетил-D-глюкозамина, D-глюкозамина и замещенного D-глюкозамина).

Преимущественно карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования от 40 до 80%, выраженную как число молей N-ацетильных групп относительно числа всех глюкозаминных звеньев.

Согласно одному варианту, степень ацетилирования колеблется от 40 до 50%. Согласно одному варианту, степень ацетилирования колеблется от 50 до 60%.

В одном воплощении степень ацетилирования колеблется от 60 до 75%.

Степень ацетилирования карбоксиалкилхитозана можно определить твердофазным углерод-13 ЯМР или жидкофазным протонным ЯМР. Выгодно, что карбоксиалкилхитозан имеет регулируемую степень ацетилирования. Выражение «карбоксиалкилхитозан, имеющий регулируемую степень ацетилирования» обозначает продукт, степень ацетилирования которого, т.е., долю N-ацетилглюкозаминных звеньев, можно регулировать, особенно с помощью реакции ацетилирования.

Предпочтительно карбоксиалкилхитозан реацетилируют.

Согласно одному варианту, способ получения карбоксиалкилхитозана согласно изобретению включает получение хитозана грибного происхождения, реацетилирование хитозана и карбоксилирование реацетилированного хитозана. Таким образом, изобретение относится к реацетилированному карбоксиалкилхитозану. В частности, изобретение относится к анионному карбоксиалкилхитозану.

Согласно одному воплощению, хитозан таким образом можно растворить в водной, предпочтительно слегка подкисленной, среде (например, с pH 6). К раствору хитозана на одной или нескольких стадиях можно добавить уксусный ангидрид. Затем добавляют щелочной агент, такой как сода и/или мочевины. Затем добавляют алкилирующий агент, такой как, например,

моноклорацетат натрия (т.е., натриевую соль хлоруксусной кислоты) или хлоруксусную кислоту. Затем замещенный хитозан очищают, извлекают и сушат.

Согласно одному варианту, способ получения карбоксиалкилхитозана согласно изобретению включает получение хитозана, карбоксилирование хитозана и затем реацетилирование карбоксилированного хитозана. Выгодно, что такой способ допускает точный контроль степени ацетилирования конечного карбоксиалкилхитозана и, в частности, получение высокой степени ацетилирования, например, выше 40%. Таким образом, изобретение относится к реацетилированному и затем карбоксилированному хитозану или реацетилированному карбоксиалкилхитозану.

Согласно одному варианту, способ получения карбоксиалкилхитозана согласно изобретению включает получение хитина грибного происхождения, карбоксилирование хитина и, необязательно, реацетилирование карбоксилированного хитина для получения карбоксиалкилхитозана согласно изобретению.

Согласно одному варианту, способ получения карбоксиалкилированного хитозана согласно изобретению включает получение хитина грибного происхождения, деацетилирование хитина, карбоксилирование хитина и, необязательно, реацетилирование карбоксилированного хитина для получения карбоксиалкилхитозана согласно изобретению.

Согласно одному варианту, карбоксиалкилхитозан имеет среднюю молекулярную массу меньше 400000.

Согласно одному варианту, средняя молекулярная масса составляет от 20000 до 60000.

Согласно другому варианту, средняя молекулярная масса составляет от 60000 до 120000.

Согласно другому варианту, средняя молекулярная масса составляет от 100000 до 400000.

Согласно другому варианту, средняя молекулярная масса составляет от 120000 до 400000.

Согласно другому варианту, средняя молекулярная масса составляет от 180000 до 400000.

Предпочтительно в настоящем описании средняя молекулярная масса представляет собой средневязкостную молекулярную массу (M_v), вычисленную из характеристической вязкости. Такое выражение обычно для специалистов в данной области техники. Характеристическую вязкость (η) измеряют методом капиллярной вискозиметрии с помощью капиллярного вискозиметра типа вискозиметра Уббелюде согласно методу в монографии 2.2.9 Европейской фармакопеи. Измеряют время течения раствора через адаптированную капиллярную трубку (Lauda, например, капиллярную трубку Убеллюде 510 01 диаметром 0,53 мм) с использованием автоматического вискозиметра I-Visc (Lauda). Затем, для того, чтобы вычислить среднюю вискозиметрическую массу карбоксиалкилхитозана, применяют уравнение Марка-Хаувинка ($\eta = K * M_v^\alpha$), где

- M_v представляет собой средневязкостную молекулярную массу карбоксиалкилхитозана,

- η представляет собой характеристическую вязкость карбоксиалкилхитозана,

- константы K и α имеют величины 0,0686 и 0,7638 соответственно, как определено ранее для (незамещенного) хитозана методом стерической эксклюзионной хроматографии с детектором

MALLS.

Таким образом обычно можно выразить характеристическую вязкость карбоксиалкилхитозана:

можно гидролизовать хитозан, чтобы уменьшить его молекулярную массу.

Типично в не являющемся сшитым карбоксиалкилхитозане глюкозаминными звеньями являются D-глюкозаминные звенья (D-глюкозаминные звенья, N-ацетил-D-глюкозаминные звенья и по меньшей мере одно из D-глюкозаминных звеньев и N-ацетил-D-глюкозаминных звеньев, являющихся замещенными).

Согласно одному варианту, замещенный хитозан имеет замещение только в D-глюкозаминных звеньях.

Согласно другому варианту, замещенный хитозан имеет замещение одновременно в D-глюкозаминных и N-ацетил-D-глюкозаминных звеньях, и при этом карбоксиалкильная группа ковалентно связана, согласно одному варианту, только с аминогруппами хитозана, или, согласно другому варианту, с аминогруппами и гидроксильными группами хитозана одновременно.

Замещение обычно является только частичным, так как нет необходимости в замещении всех звеньев.

Согласно одному воплощению, степень замещения D-глюкозаминных звеньев, выраженная в виде числа молей D-глюкозаминных звеньев относительно числа молей всех звеньев (D-глюкозаминные и N-ацетил-D-глюкозаминные звенья, замещенные или незамещенные) замещенного хитозана, колеблется от 30% до 250%.

Согласно одному воплощению, указанный карбоксиалкилхитозан имеет степень замещения карбоксиалкильной группой больше 20%, например, больше 50%, например, меньше 200%, выраженную в виде числа молей заместителя относительно молей всех звеньев.

Согласно одному воплощению, степень замещения карбоксиалкильной группой составляет больше 50%, выраженная в виде числа молей заместителя относительно молей всех звеньев.

Согласно одному воплощению, степень замещения D-глюкозаминных звеньев, выраженная в виде числа молей D-глюкозаминных звеньев относительно числа молей всех звеньев (D-глюкозаминные и N-ацетил-D-глюкозаминные звенья, замещенные или незамещенные) замещенного хитозана, колеблется от 30% до 200% и предпочтительно превышает 70%.

Согласно одному воплощению, степень замещения карбоксиалкильной группой составляет меньше 80%, выраженная в виде числа молей заместителя относительно молей всех звеньев.

Типично замещения достигают с помощью ковалентной связи.

Согласно одному варианту, 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) изменяется. Степень замещения поэтому может превышать 100%.

Преимущественно степень замещения (DS) и степень ацетилирования (DA) карбоксиалкилхитозана измеряют твердофазным углерод-13 ЯМР с использованием спектрометра

Bruker (Avance III HD 400 МГц), снабженного зондом PH MAS VTN 400SB BL4 N-P/H. Например, спектр регистрируют при комнатной температуре, время релаксации от 1 до 8 секунд, число сканирований от 64 до 512. Площади сигналов атомов углерода определяют после деконволюции. Считают, что атомы углерода из «CH₃ ацетила» (углерод метила ацетильной группы N-ацетилглюкозаминных звеньев, замещенных или незамещенных), «C×» (углерод в положении × глюкозаминных и N-ацетилглюкозаминных звеньев, причем × колеблется от 1 до 6) и «C=O» (углерод карбонила карбоксиалкильного заместителя, и углерод карбонила C=O ацетильной группы N-ацетилглюкозаминных звеньев, замещенных или незамещенных). Для определения DS данного карбоксиалкилхитозана также следует регистрировать спектр углерод-13 ЯМР хитозана-предшественника данного карбоксиалкилхитозана. Из спектра хитозана-предшественника вычисляют «отношение CSU», т.е., отношение площади сигнала группы «CH₃ ацетил» (углерод метила ацетильной группы N-ацетилглюкозаминных звеньев) к площади сигнала «C=O» (углерод карбонила ацетильной группы N-ацетил-D-глюкозаминных). DA карбоксиалкилхитозана вычисляют согласно формуле 1, а DS согласно формуле 2, где I представляет собой площадь сигнала рассматриваемого углерода.

Формула 1

[мат. 1]

$$DA = \frac{I_{CH_3 \text{ acetyl}}}{\sum I_{Cx}/6}$$

acetyl – ацетил

Формула 2

[мат. 2]

$$DS = \frac{I_{C=O} - I_{CH_3 \text{ acetyl}} / CSU \text{ ratio}}{\sum I_{Cx}/6}$$

acetyl – ацетил, CSU ratio – отношение CSU

DA и DS можно определить с использованием других методов, известных для карбоксиалкилхитозанов, например, протонным ЯМР в жидкой среде с использованием спектрометра магнитного резонанса, например, согласно методу, описанному Liu et al. (Carb. Polym., 137, 600, 2016), например, с предварительным гидролизом карбоксиалкилхитозана, добавляя к нему перед анализом концентрированный раствор дейтерированной хлороводородной кислоты.

Если другой метод ЯМР более выгоден для надежной оценки DA и/или DS, такой метод подходит для применения. Вышеуказанные методы специалисту следует адаптировать относительно получения образца и сигналов, которые интегрируют, особенно в отношении разрешения, устойчивости и положения протонов сигналов, используемых для вычисления

степени замещения.

Степень карбоксиалкилирования хитозана может выгодно колебаться от 20 до 250%, предпочтительно от 50 до 200% и, например, от 70 до 170%, выраженная в виде числа молей карбоксиалкила относительно числа молей всех звеньев.

Согласно одному варианту, степень карбоксиалкилирования хитозана может выгодно колебаться от 40 до 130% и, например, от 70 до 130%, выраженная в виде числа молей карбоксиалкила относительно числа молей всех звеньев.

Степень замещения хитозана типично коррелирует с отношением масс реагентов к хитозану после начала реакции. Примеры карбоксиалкилирующих агентов включают хлорангидриды кислот (или их соли, например, монохлорацет натрия), таких как несущих одну или несколько карбоксиметильных, карбоксиэтильных, карбоксипропильных, карбоксибутильных групп, и т.д..

Согласно одному варианту, настоящее изобретение относится к карбоксиалкилхитозану, причем алкильная часть карбоксиалкила представляет собой линейную или разветвленную группу C1-C5.

Согласно одному воплощению, настоящее изобретение относится к карбоксиметилхитозану.

Согласно такому варианту, замещенный хитозан представляет собой N-карбоксиалкилхитозан.

Согласно такому воплощению, замещенный хитозан представляет собой O-карбоксиалкилхитозан.

Согласно такому варианту, замещенный хитозан представляет собой N-карбоксиалкилированный и O-карбоксиалкилированный хитозан.

Согласно второму аспекту, настоящее изобретение относится к производному хитозана, имеющему глюкозаминные звенья, N-ацетилглюкозаминные звенья и глюкозаминные звенья, замещенные карбоксиалкильной группой, причем указанный карбоксиалкилхитозан имеет дзета-потенциал, измеренный при pH 7,5, меньше или равный -10 мВ, и предпочтительно меньше или равный -15 мВ. В особенности, такое производное хитозана делает возможным ограничение иммунной реакции субъекта, которому вводят производное хитозана или композицию, включающую его, типично путем инстилляций, инъекции или имплантации.

Преимущественно дзета-потенциал, измеренный при pH 7,5, меньше или равен -18 мВ.

Преимущественно карбоксиалкилхитозан имеет дзета-потенциал, измеренный при pH 7,5, меньше или равный -22 мВ, и предпочтительно меньше или равный -24 мВ.

Согласно одному конкретному варианту, замещенный хитозан предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу 150000-220000 и степень замещения, колеблющуюся от 50 до 200%, причем молекулярная масса предпочтительно показана до замещения.

Согласно другому конкретному варианту, замещенный хитозан имеет среднюю молекулярную массу 120000-150000 и степень замещения, колеблющуюся от 70 до 200%, причем

Согласно одному конкретному варианту, замещенный хитозан предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу 220000-300000, степень замещения, колеблющуюся от 90 до 200% и предпочтительно 90-150%, и степень ацетилирования 50-75%, причем молекулярная масса предпочтительно показана до замещения.

Путем замещения хитозана возможно получить раствор карбоксиалкилхитозана, растворимого в водном растворе, рН которого изменяется в пределах широкого диапазона, в то время как незамещенный хитозан растворяется только при рН ниже 5,5-6,5. Таким образом, замещенный хитозан показывает способность к замещению при различных рН в силу присутствия карбоксиалкильных групп, которые модифицируют профиль его растворимости, и в частности, при физиологическом рН или при рН физиологических жидкостей, модифицированных патологией, например, воспалительной патологией.

«Водорастворимый» означает, что в водном растворе карбоксиалкилхитозана не видно невооруженным глазом никакой мути. Конкретнее, растворимость, т.е., отсутствие мути в растворе карбоксиалкилхитозана при концентрации, например, 1% (мас./мас.) в воде или буфере, например, фосфатном буфере, можно подтвердить по оптической плотности меньше 0,5 и предпочтительно меньше 0,2, измеренной спектрометрией в УФ- и видимой области при длине волны 500 нм относительно кюветы для сравнения, включающей только водный растворитель, используемый для измеряемого образца, но в отсутствие замещенного хитозана. Другой метод состоит в визуальной проверке согласно монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи. Когда хитозан замещен недостаточно, композиция не растворяется при рН в удовлетворительном диапазоне, например, колеблющемся от рН 5,5 до рН 8,5, при комнатной температуре.

Согласно одному воплощению, карбоксиалкилхитозан является стерильным.

В особенности, под «сшитым ковалентными связями между цепями карбоксиалкилхитозана» следует понимать, что главная цепь хитозана (также называемая основной цепью хитозана) ковалентно связывается с одной или несколькими главными цепями хитозана. Преимущественно таким образом получается трехмерная сетка молекул хитозана. Изобретение не ограничивается определенным способом ковалентного образования сшитой структуры, но способ с использованием химической молекулы в качестве сшивающего агента, также известной как сшивающий агент, является предпочтительным.

Согласно изобретению, карбоксиалкилхитозан является сшитым.

Согласно одному варианту, поперечные связи формируются сшивающим агентом, образуя указанные ковалентные связи.

Таким образом, некоторые цепи хитозана можно сшить, например, путем взаимодействия с одним или несколькими сшивающими агентами, такими как, например, выбранными из сшивающих агентов, используемых для сшивания полисахаридов, таких как диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола, 1-бром-3,4-эпоксибутан, 1-бром-4,5-эпоксипентан, 1-хлор-2,3-эпителипропан, 1-бром-2,3-эпителипропан, 1-бром-3,4-эпителибутан, 1-бром-4,5-эпителипентан, 2,3-дибромпропанол, 2,4-дибромбутанол, 2,5-дибромпентанол, 2,3-дибромпропантиол, 2,4-

дибромбутантиол и 2,5-дибромпентантиол, эпихлоргидрин, 2,3-дибромпропанол-1, 1-хлор-2,3-эпителипропан, диметиламинопропилкарбодиимид, галловая кислота. эпигаллокатехина галлат, куркумин, дубильная кислота, генипин, или также диизоцианаты, такие как гексаметилендиизоцианат или толуилендиизоцианат, или также дивинилсульфон.

Генипин представляет собой встречающийся в природе сшивающий агент, используемый для сшивания полисахаридов, особенно карбоксиметилхитозана (Yang et al., *Acta Pharmacol. Sin.*, 31, 1625, 2020). Генипин окрашивает гидрогель в темно-голубой – черный цвет, что может быть выгодно при некоторых показаниях.

Предпочтительно сшивающий агент имеет полиэпоксидный тип, например, является дифункциональным агентом. Предпочтительно в качестве сшивающего агента используют диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (BDDE) или диглицидиловый эфир этиленгликоля (EGDE), так как они уже использовались для получения биоматериалов, применяемых для людей, в частности, гиалуроновых гидрогелей для интрадермального, внутрисуставного или внутривидного введения. Согласно одному варианту, сшивающим агентом является дивинилсульфон.

Преимущественно композиция по изобретению также может включать биополимер иной, чем сшитый карбоксиалкилхитозан. Согласно выгодному варианту, биополимер представляет собой полисахарид, окисленный или неокисленный, сшитый ковалентными связями или несшитый, например, глюкозаминогликан, и в частности гиалуронан, такой как, например, гиалуроновая кислота или гиалуронат натрия.

Преимуществом комбинирования или сшивания сшитого карбоксиалкилхитозана с некоторыми другими полимерами является добавление их биологических и физико-химических свойств или даже появление синергии.

Согласно одному варианту, матрица согласно изобретению включает сшитый карбоксиалкилхитозан и гиалуронан, хондроитина сульфат и/или карбоксиметилцеллюлозу. На сегодняшний день не имеется гидрогеля сшитого карбоксиалкилхитозана (по определению для изобретения) в комбинации с гиалуронаном. Это является одной из целей изобретения – комбинирование указанных двух полимеров для возможности комбинирования, например, известных увлажняющих свойств гиалуронана со свойствами хитозана защиты от окислительного стресса.

Согласно одному варианту, матрица включает по меньшей мере один гиалуронан.

Преимущественно матрицы согласно изобретению включают один сшитый карбоксиалкилхитозан или сшитый карбоксиалкилхитозан в комбинации с гиалуронаном сшитым или несшитым. Это позволяет адаптировать желательные свойства.

Указанная матрица включает по меньшей мере один карбоксиметилхитозан и гиалуронан.

Согласно одному варианту, гиалуронан имеет среднюю молекулярную массу меньше 5 миллионов и предпочтительно больше 1 миллиона, предпочтительно больше 2 миллионов, при определении методом капиллярной вискозиметрии. Молекулярную массу гиалуронана иногда

выражают через плотность, так как эти показатели коллерируют в линейном соотношении. Гиалуронан может иметь плотность до $4,25 \text{ м}^2/\text{кг}$, и, например, обозначаться как гиалуронан низкой плотности (например, примерно $1\text{--}2 \text{ м}^2/\text{кг}$) или высокой плотности (например, примерно $2\text{--}4 \text{ м}^2/\text{кг}$).

Согласно одному варианту, гиалуронан получают ферментацией, например, с помощью стрептококков. Согласно другому варианту, его получают экстрагированием из петушиных гребней.

Согласно одному варианту, матрица включает по меньшей мере один гиалуронан, сшитый ковалентными связями.

Таким образом, сшитый гиалуронан включает ковалентные связи между различными цепями гиалуронана.

Можно сшивать друг с другом различные типы гиалуронана, такие как гиалуронаны с различной молекулярной массой или различные соли гиалуронана.

Настоящее изобретение также относится к способу получения сшитого карбоксиалкилхитозана.

Согласно одному варианту, способ получения матрицы согласно изобретению включает контактирование карбоксиалкилхитозана с по меньшей мере одним сшивающим агентом, причем контактирование предпочтительно выполняют в щелочной водной фазе;

сшивание карбоксиалкилхитозана с помощью сшивающего агента; и

получение матрицы, включающей сшитый карбоксиалкилхитозан.

Согласно одному варианту, карбоксиалкилхитозан сшивают в щелочной водной фазе, например, в присутствии раствора гидроксида натрия (NaOH).

Преимущественно концентрация карбоксиалкилхитозана, изначально присутствующего в водной фазе, находится в диапазоне от 1 до 30% и предпочтительно от 5 до 20% (мас./об.) карбоксиалкилхитозана относительно объема щелочной водной фазы.

Преимущественно массовое соотношение между сшивающим агентом и полимером(ами) составляет от 0,1 мас.% до 30 мас.% сшивающего агента относительно массы полимера(ов).

Предпочтительно массовое соотношение между сшивающим агентом и полимером(ами) составляет от 0,5% до 20%, в частности, когда используют BDDE, выраженное в массе сшивающего агента относительно массы полимера(ов).

Типично взаимодействие осуществляют при нагревании, например, при температуре $25\text{--}60^\circ\text{C}$, и например при 50°C , например в течение периода 30 минут – 48 часов, например, 1 часа – 5 часов. Как правило, сшивание останавливают путем нейтрализации и разбавления, например, путем добавления кислоты и, например, путем добавления уксусной кислоты или хлороводородной кислоты.

Преимущественно остатки от реакции удаляют путем диализа с использованием фосфатно-солевого буфера.

Таким образом получают гидрогель, включающий матрицу согласно изобретению.

С другой стороны, карбоксиалкилхитозан является экзогенной молекулой, которая после имплантации/инъекции/инстилляции в организм более устойчива к расщеплению, чем гиалуронан.

Таким образом, изобретение относится к матрице, включающей трехмерную сетку на основе указанных двух полимеров, имеющих различную молекулярную массу. Таким образом, преимущественно обеспечиваются диапазон биомеханических свойств, длительность (существования) продукта *in situ* и длительность обработки, причем в то же время сохраняется способность карбоксиалкилхитозана поглощать свободные радикалы.

Изобретение относится к матрице, включающей по меньшей мере один гиалуронан, совместно сшитый с карбоксиалкилхитозаном ковалентными связями.

Согласно одному варианту, способ получения матрицы, включающей карбоксиалкилхитозан, предпочтительно по определению согласно изобретению, совместно сшитый с другим биополимером, и предпочтительно с гиалуронаном, включает

контактирование смеси карбоксиалкилхитозана и другого биополимера, и предпочтительно гиалуронана, с по меньшей мере одним сшивающим агентом, причем контактирование предпочтительно осуществляют в щелочной фазе;

сшивание карбоксиалкилхитозана и другого биополимера, и предпочтительно гиалуронана, с помощью сшивающего агента;

получение матрицы совместно сшитых карбоксиалкилхитозана и другого биополимера, и предпочтительно гиалуронана.

Согласно одному варианту, матрица согласно изобретению является стерильной.

Преимущественным является предоставление гидрогеля из матрицы согласно изобретению.

Таким образом, изобретение относится к гидрогелю, и преимущественно образуется когезивный гидрогель.

Таким образом, настоящее изобретение относится к гидрогелям сшитого карбоксиалкилхитозана, в которых карбоксиалкилхитозан имеет высокую степень ацетилирования (DA) (больше 40%) и, предпочтительно, также имеет высокую степень замещения (DS) (больше 20%, предпочтительно больше 50% и обычно меньше 200%).

Изобретение относится к композиции, включающей по меньшей мере одну матрицу, определенную согласно изобретению.

Согласно предпочтительному варианту, матрицу согласно изобретению получают в водной среде с образованием композиции в форме гидрогеля.

Преимущественно концентрация полимера (карбоксиалкилхитозана с другим биополимером, таким как, например, гиалуронан, или без него) составляет меньше 10%, например, меньше или является равной 5% по массе относительно общей массы композиции, и в частности, гидрогеля (мас./мас.).

Согласно одному варианту, концентрация полимера (карбоксиалкилхитозана с другим биополимером, таким как гиалуронан, или без него) составляет меньше 4%, например, меньше или

является равной 3% по массе относительно общей массы композиции, и в частности, гидрогеля (мас./мас.).

Отношение масс (мас./мас.) [карбоксиалкилхитозан/гиалуронан] составляет, например, от 5 до 95%, например, от 10 до 90%, и еще, например, от 30 до 70%. Отношение масс (мас./мас.) [гиалуронан/карбоксиалкилхитозан] составляет, например, от 5 до 95%, например, от 10 до 90%, и также, например, от 30 до 70%. Согласно одному варианту, отношение масс (мас./мас.) [карбоксиалкилхитозан/гиалуронан] составляет 1:1 (т.е., 50% хитозана и 50% гиалуронана).

Водной средой может являться вода, водный раствор, pH и осмоляльность которых регулируют, например, с использованием кислотной/щелочной буферной системы с добавлением солей и/или, необязательно, полиолов (сорбит, маннит, глицерин).

Согласно одному варианту, матрицу согласно изобретению получают в гидрофильной среде, допускающей образование одной или нескольких прямых или обратных эмульсий.

Согласно одному воплощению, композиция матрицы имеет осмоляльность 100-700 мосм/кг, предпочтительно 120-500 мосм/кг.

Преимущественно осмоляльность композиции матрицы составляет от 250 до 400 мосм/кг и предпочтительно от 270 до 330 мосм/кг.

Согласно одному варианту, композиция матрицы имеет осмоляльность, подходящую для сустава.

Согласно одному варианту, композиция матрицы имеет осмоляльность, совместимую с глазной или внутриглазной поверхностью.

Согласно одному варианту, композиция матрицы имеет осмоляльность, совместимую с кожей или слизистой оболочкой.

Согласно одному варианту, предпочтительно, чтобы осмоляльность композиции матрицы составляла от 100 до 400, и конкретнее, от 120 до 380 мосм/кг.

Согласно одному варианту, композиция согласно изобретению является стерильной.

Преимущественно композиция согласно изобретению содержится в устройстве для инъекции, имплантации или инстиляции, таком как шприц или флакон.

Преимущественно устройство для инъекции, такое как шприц, например, затем можно подвергать стерилизации паром. Затем такое устройство, такое как шприц, можно упаковать, предпочтительно, асептическим или стерильным путем. Оно может также представлять собой мешок, устройство с клапаном или флакон для закапывания композиции согласно изобретению, асептически наполненное после стерилизации препарата или стерилизованное непосредственно после заполнения.

Согласно одному варианту, композиция согласно изобретению, и в частности, гидрогель согласно изобретению, стерилизуют фильтрацией и/или стерилизацией паром до заполнения устройства для инъекции, имплантации или инстиляции, такого как шприц или флакон.

Специалист в данной области техники знает методы стерилизации гидрогеля для получения желательного стерильного гидрогеля. Они включают несколько типов оборудования

для нагревания или стерилизации паром и позволяют использовать несколько видов циклов для удаления микробной нагрузки.

Настоящее изобретение более конкретно относится к инъектируемой композиции, включающей матрицу согласно изобретению предпочтительно в форме гидрогеля.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере одну матрицу согласно изобретению предпочтительно в форме гидрогеля.

Согласно одному варианту, фармацевтическую композицию согласно изобретению используют в виде фармацевтической композиции для инъекции, имплантации или инстилляции или медицинского устройства для инъекции, имплантации или инстилляции.

Изобретение также охватывает композицию согласно изобретению в сухой форме, в особенности в лиофилизованной форме. Лиофилизированный продукт перед применением может быть, в частности, (ре)диспергирован, а предпочтительно растворен.

Настоящее изобретение более конкретно относится к композиции согласно изобретению для применения при лекарственном лечении, например, включающему инъектирование указанной композиции подкожным, интрадермальным, внутриглазным или внутрисуставным, интрамукозальным, внутримышечным путем, например, для восстановления, регенерации или заполнения по меньшей мере одной ткани/жидкости организма, требующей восстановления или заполнения.

Является преимуществом использование хитозана, имеющего достаточную степень чистоты для предполагаемого применения.

Является преимуществом использование гиалуронана степени чистоты, достаточной для предполагаемого применения.

Биомеханические свойства, достигаемые композицией согласно изобретению, могут изменяться по своей природе в зависимости от показания, например, в зависимости от ткани, в которую должен быть интегрирован гидрогель, механизма действия или предполагаемого эффекта для гарантии пользы для пациента и длительности эффекта.

Преимущественно свойства композиции согласно изобретению, и в частности гидрогеля согласно изобретению, адаптируют для показания. Для того, чтобы адаптировать эти свойства, например, варьируют конечную концентрацию полимеров (карбоксиалкилхитозана и/или других биополимеров, таких как гиалуронан) и/или скорость сшивания, в частности, через массовое отношение сшивающий агент/полимеры, и/или природу и/или количество ионов и/или начальную молекулярную массу полимера(ов).

В частности, изобретение относится к высокоэластичному гидрогелю, особенно когда необходимо обеспечить длительное увеличение объема на кожном, подкожном или периостеальном уровне (для проекции или ремоделирования), или вязкоэластичному гелю, особенно для возможности как поглощения ударов, так и смазывающего эффекта на уровне суставов. Изобретение относится к смазывающему гидрогелю, особенно когда необходимо уменьшить трение между двумя биологическими поверхностями, например, двумя хрящевыми

поверхностями в суставе, или поверхностью глаза и веками в глазу. Композиция может иметь переменный уровень эластичности, скорректированный согласно показанию, и может быть охарактеризована путем измерения модуля упругости методом реометрии.

Предпочтительно матрица имеет способность антиоксиданта поглощать свободные радикалы, особенно нормализованную антиоксидантную способность, превышающую 0,30, предпочтительно превышающую 0,50 и даже предпочтительнее превышающую 0,80, и, например, превышающую 0,90.

Настоящее изобретение относится к инъектируемой композиции, отличающейся тем, что она включает по меньшей мере одну матрицу, определенную согласно изобретению.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, отличающейся тем, что она включает по меньшей мере одну матрицу, определенную согласно изобретению.

Согласно одному варианту, композицию согласно изобретению используют в качестве инъектируемой, имплантируемой или инстиллируемой или местно вводимой фармацевтической композиции, или инъектируемого или имплантируемого или инстиллируемого или местного вводимого медицинского устройства, например, для применения в терапевтическом способе лечения, например, включающем местную инстилляцию или введение или инъекцию указанной композиции подкожным, интрадермальным, мукозальным, глазным, внутриглазным или внутрисуставным, внутрикостным путем, например, для восстановления или заполнения по меньшей мере одной ткани организма, нуждающейся в восстановлении или заполнении.

Согласно одному варианту композицию согласно изобретению используют в способе лечения, восстановления или заполнения по меньшей мере одной жидкости или ткани организма, нуждающейся в восстановлении или заполнении, и, например, такую ткань организма выбирают из тканей, принадлежащих голосовым связкам, мышцам, связкам, сухожилиям, слизистым оболочкам, половым органам, костям, суставам, глазам, коже или их любой комбинации, и в частности, коже, хрящу, синовиальной оболочке, кожной ране или также поверхности глаза.

Настоящее изобретение относится к композиции согласно изобретению для применения в способе лечения остеоартрита или восстановления дефекта хряща, например, путем инъекции в биологическую жидкость, например, синовиальную жидкость, или после смешивания с биологической жидкостью, например, кровью, и имплантации в хрящ. Под биологической жидкостью подразумевается жидкость, образующаяся в организме, которая может подвергаться или не подвергаться обработке, модифицирующей ее состав.

Настоящее изобретение относится к медицинскому устройству, например, медицинскому импланту, отличающемуся тем, что оно включает или состоит из композиции, определенной согласно изобретению.

Настоящее изобретение относится в частности к композиции согласно изобретению для применения в терапевтическом, хирургическом или косметическом лечении, в том числе, в определенном лечении в ревматологии, офтальмологии, гинекологии, эстетической медицине, пластической хирургии, открытой хирургии, ортопедической хирургии, гинекологии, для

предупреждения послеоперационных спаек и в дерматологии.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в терапевтическом лечении синдрома сухого глаза, повреждения роговицы или глаза или воспаления сустава.

Настоящее изобретение также относится к применению композиции согласно изобретению путем инстилляции на поверхность глаза для предупреждения или борьбы с повреждением роговицы или синдрома сухого глаза, в частности, с целью смазывания или регенерации поверхности глаза.

Таким образом, изобретение также относится к композиции глазных капель, включающей карбоксиалкилхитозан, определенный согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту, субъект поражен воспалительной патологией (например, остеоартритом, артритом, синдромом сухого глаза).

Конкретнее, настоящее изобретение относится к композиции согласно изобретению для лечения артроза, артрита или восстановления дефекта хряща, например, путем инъекции в синовиальную полость или путем имплантации в дефект хряща.

Конкретнее, настоящее изобретение относится к медицинскому устройству, например, медицинскому импланту, отличающемуся тем, что он включает или состоит из композиции согласно изобретению.

Согласно одному предпочтительному варианту, изобретение относится, таким образом, к медицинскому устройству, включающему камеру, содержащую композицию согласно изобретению в сухой форме, особенно в лиофилизованной форме, и, необязательно, одну или несколько других камер, содержащих один или несколько активных продуктов, добавок или эксципиентов.

Композиция согласно настоящему изобретению также может включать один или несколько активных агентов для желательного показания и/или одну или несколько добавок или эксципиентов для модификации свойств композиции согласно изобретению.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения при терапевтическом методе лечения.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в способе лечения артроза или восстановления дефекта хряща, например, путем инъекции в синовиальную сумку или после смешивания с кровью и имплантации в хрящ/кость.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения при эстетическом лечении или в способе ухода путем наполнения кожи («наполнение кожи») или наполнения губ. Это особенно включает, например, инъекцию композиции согласно изобретению подкожным, интрадермальным, интрамукозальным или внутримышечным путем.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в способе поверхностной обработки путем многих интрадермальных инъекций кожи или других тканей в соответствии с традиционными методами мезотерапии, хорошо известными

специалистам в данной области техники. Такие композиции обычно можно использовать в дерматологии как лечение в эстетических целях. Целью такого способа является, например, «раздувание» кожи, чтобы она потеряла морщинистый вид (обработка морщин и морщинок). Такое лечение может предназначаться для субъекта, желающего придать омоложенный вид своей коже.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в способе лечения, в котором композиция является средством для обеспечения вязкости. В таком случае, например, композицию по изобретению инъецируют внутрисуставно, особенно для ограничения трения хрящевых поверхностей сустава.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в качестве вектора клеток из одного или нескольких типов клеток и/или из одного или нескольких активных агентов. Они могут являться активными агентами с фармацевтической или биологической точки зрения. Композиция по изобретению действительно может быть совместимой с присутствием клеток, предпочтительно живых клеток. Примеры живых клеток, представляющих интерес, включают хондроциты (суставной хрящ), фиброхондроциты (мениск), фибробласты связки (связка), фибробласты кожи (кожа), теноциты (сухожилия), миофибробласты (мышца), мезенхимальные стволовые клетки, красные клетки крови (кровь) и кератиноциты (кожа). Композиция по изобретению также может быть предназначена в качестве терапевтического вектора для таргетной и/или с регулируемым высвобождением доставки по меньшей мере одного терапевтического средства.

Согласно одному варианту, кровь или плазму или лизат тромбоцитов или обогащенную тромбоцитами плазму или любую биологическую жидкость добавляют с композицией по изобретению, например, для усиления эффективности продукта.

Согласно одному варианту, композицию по изобретению получают в твердой форме (например, пленки или порошката), которая сразу же набухает/увлажняется при имплантации (например, слезная пробка, повязка).

Согласно одному варианту, композицию по изобретению получают в форме композиции для распыления (спрея).

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в способе лечения или косметического ухода за одной или несколькими тканями или органами, пораженными из-за повышенной температуры, как в случае ожога.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в способе лечения для восстановления хряща (например, путем имплантации в дефект хряща с целью содействия его регенерации).

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению для применения в способе превентивного лечения образования спаек после операции: продукт наносят на ткани по окончании операции, например, гинекологической, абдоминальной, висцеральной, ортопедической и т.д.

Изобретение относится к физиологической композиции, вводимой местно путем инъекции или имплантации для образования контакта с одной или несколькими живыми тканями, подвергнутыми окислительному стрессу, например:

- внутрисуставной инъекцией для лечения остеоартрита (через добавление в синовиальную жидкость, смазывание хряща, погашение удара на уровне сустава, регенерацию синовиальной оболочки), внутрисуставной имплантацией для содействия восстановлению дефектов хряща;
- внутрикостной имплантацией для содействия восстановлению кости (остеиндукция/остеоиндукция);
- подкожной и/или интрадермальной инъекцией для заполнения или регенерации кожи или волосяных фолликул, для увеличения объема в случаях липоатрофии;
- глазной инстилляцией для ослабления симптомов на поверхности глаза или предупреждения изменений, например, для лечения сухого глаза и повреждений роговицы и введения активных начал;
- внутриглазной инъекцией, например, для оптимизации эффективности хирургии глаукомы или добавления стекловидного тела, в качестве адьюванта к хирургии катаракты, для регенерации тканей переднего и заднего отделов глаза, и внутриглазного введения активных начал;
- введением во внутренние ткани и органы (пленки) для предотвращения послеоперационных спаек;
- введением в раны, трещины, слезы, полости... тканей и органов, таких как кожа, кости, хрящ, роговица, сухожилия, мениск... с целью содействия их восстановлению или регенерации;
- инъекцией в слизистую оболочку вульвы для лечения вульводинии.

Настоящее изобретение также относится к композиции согласно изобретению, образующей синовиальную жидкость сустава.

Композиция согласно настоящему изобретению позволяет имитировать здоровую синовиальную жидкость для улучшения здоровой или дефектной синовиальной жидкости, стремясь, например, улучшить ее смазывающую способность для уменьшения трения в суставе и/или ее противоударные свойства (определяемые с помощью модуля упругости G'), причем в то же время легко инъектируемую, например, для заполнения шприца или для инъекции в организм человека или животного. Как показатель, модуль упругости G' здоровой синовиальной жидкости составляет от 40 до 100 Па, и ее модуль потерь G'' составляет от 1 до 10 Па.

Преимущественно для внутрисуставной инъекции композиция согласно изобретению легко инъектируется через тонкую иглу, например, калибром Гейдж 21, при комнатной температуре. Под «легкостью» инъекции предпочтительно подразумевается, что усилие, прилагаемое к такому шприцу, составляет меньше 50 ньютонов (при скорости 10 мм/мин), для течения композиции согласно изобретению через иглу 21 Гейдж, предпочтительно усилие составляет меньше 20 ньютонов.

Преимущественно для интрадермальной инъекции композиция согласно изобретению

легко инъецируется через тонкую иглу, например, калибром Гейдж 25 или иглу меньшего диаметра, при комнатной температуре. Под «легкостью» инъекции предпочтительно подразумевается, что усилие, прилагаемое к такому шприцу для эжекции в воздух, составляет меньше 30 ньютонов (при скорости 10 мм/мин) для течения композиции согласно изобретению через иглу 27 Гейдж, предпочтительно усилие составляет меньше 20 ньютонов.

Настоящее изобретение также относится к композиции в виде искусственных слез, включающей карбоксиалкилхитозан согласно изобретению.

Вообще, диапазоны величин осмоляльности и pH композиции адаптируются, и вообще близки к величинам осмоляльности и pH тканей при контакте с композицией согласно изобретению.

Преимущественно композиция согласно настоящему изобретению является стерильной. Существенное преимущество, когда композицию согласно настоящему изобретению стерилизуют при повышенной температуре, предпочтительно в автоклаве.

Согласно одному воплощению, матрица имеет смазывающую способность с низким коэффициентом трения (COF), например, меньше 20, и например, меньше 10, согласно испытанию из примеров изобретения.

Согласно одному варианту, композиции по изобретению являются прозрачными или полупрозрачными.

Под «полупрозрачным» подразумевается, что объект можно различить, когда его композицию помещают между глазом наблюдателя и объектом. Под «прозрачным» подразумевается, что можно различить буквенно-цифровые символы, когда композицию помещают между глазом наблюдателя и наблюдаемыми символами. Вообще, такую оценку выполняют при толщине композиции приблизительно 1 см. Также можно адаптировать способ из монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи для визуальной проверки. Также можно измерить оптическую плотность композиции, например, методом спектрометрии в УФ и видимых областях при 500 нм и убедиться, что оптическая плотность составляет меньше 0,5, предпочтительно 0,2 относительно эталонного растворителя.

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

Под «опалесцирующим» подразумевается, что раствор вызывает дифракцию света, видимую невооруженным глазом, например, при визуальной проверке согласно такому методу, как в монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи, и путем сравнения с эталонным растворителем с различными уровнями опалесценции по Европейской фармакопеи. Согласно одному варианту, композиция по изобретению является бесцветной, т.е., в частности, наблюдатель невооруженным глазом не оценивает конкретный цвет композиции. Согласно одному варианту, опалесценция меньше максимума, допустимого для предполагаемого применения.

Изобретение относится, в частности, к предпочтительно стерильным изделиям или упаковке, включающим одно или несколько устройств для инстилляции или инъекции,

предварительно заполненных композицией согласно изобретению, в частности, в форме гидрогеля. Такие устройства обычно являются устройствами для инстилляций продукта в форме капель или предварительно заполненными шприцами.

Композицию по изобретению можно преимущественно хранить, предпочтительно в изделии или упаковке, подходящих для ее назначения, и предпочтительно в течение нескольких месяцев.

Преимущественно композиция по изобретению может быть стерилизована. Таким образом, изобретение относится к стерилизованному сшитому карбоксиалкилхитозану. Таким образом, сшитый карбоксиалкилхитозан является стерильным, особенно для применений, требующих этого.

Согласно одному варианту, композицию по изобретению стерилизуют паром согласно способу, известному специалистам в данной области техники, и/или рекомендованному Европейской фармакопеей.

Согласно другому варианту, композицию можно стерилизовать фильтрацией с использованием фильтров, предназначенных для такой цели, например, фильтров с пористостью меньше или равной 0,2 мкм.

Преимущественно, согласно предпочтительному воплощению, потеря характеристической вязкости сшитого карбоксиалкилхитозана после стерилизации паром составляет меньше 40%.

Настоящее изобретение также охватывает способ терапевтического лечения, включающий инъекцию композиции согласно изобретению.

Настоящее изобретение также охватывает применение композиции согласно изобретению для получения фармацевтической композиции, в частности, для терапевтического лечения, например, что конкретнее определено в изобретении.

Настоящее изобретение также охватывает способ эстетического, иными словами, нетерапевтического, лечения, включающий инъекцию композиции согласно изобретению. Т.е., например, заполнение морщин или заполнение одной или нескольких видимых зон повреждения ткани, например, в результате травмы или хирургической процедуры, с эстетическими целями.

Ткань представляет собой группу подобных клеток одинакового происхождения, собранных в функциональную единицу, т.е., они вносят вклад в одну и ту же функцию. Из тканей можно назвать ткань кожи (например, эпителий), соединительную ткань, мышечную ткань и нервную ткань.

Под «композицией согласно изобретению» или эквивалентными терминами подразумевается композиция, определенная в настоящем изобретении, в том числе согласно любому из вариантов, отдельным или конкретным воплощениям, независимо или в их любой комбинации, в том числе с предпочтительными характеристиками.

Другие задачи, характеристики и преимущества изобретения станут яснее для специалистов в данной области техники после прочтения пояснительного описания, которое относится к примерам, приведенным только в иллюстративных целях и никоим образом не

предназначенных для ограничения объема изобретения.

Примеры являются неотъемлемой частью настоящего изобретения, и любые характеристики, которые кажутся новыми по отношению к известному уровню техники из описания в целом, включая примеры, являются неотъемлемой частью настоящего изобретения в его функции и его применимости.

Таким образом, каждый пример имеет общую область.

Иными словами, в примерах все проценты приводятся по массе, если не указано иное, и температура выражена в градусах по Цельсию, если не указано иное, и давление является атмосферным давлением, если не указано иное.

Пример

Метод измерения дзета-потенциала

Препарат, который анализируют, разбавляют в фосфатном буфере до получения конечной концентрации полимера 0,05%, и затем тщательно перемешивают до гомогенного состояния. Затем раствор разделяют на различные фракции, и pH каждой фракции доводят до желательной величины от pH 4 до 8 путем добавления или 0,1 N раствора гидроксида натрия или 0,1 N хлороводородной кислоты. Дзета-потенциал каждой фракции измеряют с использованием прибора «Nano-Z» (диапазон Zeta-Sizer, Malvern Instruments).

Способ измерения диапазона растворимости хитозановых полимеров

Диапазон растворимости устанавливают путем получения раствора полимера, который испытывают, концентрации 1% и pH 9, путем фракционирования его на несколько фракций, pH которых доводят до различных величин в диапазоне от 9 до 1. Для каждой фракции проверяют растворимость полимера, т.е., пока не образуется муть, согласно визуальному методу проверки из монографии 2.9.20 Европейской фармакопеи. Регистрируют диапазон pH, в котором полимер растворяется или не растворяется.

Биомеханический профиль по методу реометрии

Биомеханический профиль образца характеризуют с использованием реометра DHR-2 Hydrind Rheometer (TA Instrument), с геометрией плоскости 20 мм на расстоянии 700 мкм от Пельтье-столика, при температуре 37°C, частота 3,98 рад/с и амплитуда деформации, колеблющаяся от 0,1 до 10%. Каждое измерение выполняют трижды, и затем из трех измерений вычисляют среднюю величину модулей упругости (G'), вязкости (G'') и $\tan \delta$ (G''/G').

Смазывающая способность

Смазывающую способность характеризуют коэффициентом трения (COF) между двумя поверхностями. Измерение коэффициента трения осуществляют согласно следующему далее методу, параметры которого выбирают в соответствии с предполагаемым продуктом и назначением.

- Метод вискодобавок (viscosupplement)

Два диска на основе полиакрилатного биоматериала, используемого для изготовления гидрофобных интраокулярных линз (как описано в патенте EP 1830898) диаметром 16,15 мм,

предварительно увлажняют путем погружения в воду при 60°C примерно на 2 часа и затем закрепляют на верхней и нижней геометрии реометра DHR-2 (TA Instruments). Примерно 100 мкл образца, который испытывают, помещают на нижний диск, затем верхнюю геометрию опускают до контакта между обоими дисками до приложенного нормального усилия 5 ньютонов. Измерения коэффициента трения выполняют при 25°C на протяжении 150 секунд при постоянном нормальном усилии (5 Н), частоте колебаний 1,256 рад/с и угле деформации приблизительно 0,05 радиан, согласно протоколу, адаптированному из протокола, описанного Waller et al. (в J. 47 Rheumatol., 39, 7, 1473, 2012). Активируется опция «сцепление в нулевой начальной точке колебательного движения». В каждой точке измерения регистрируют величину крутящего момента, и затем вычисляют коэффициент трения (COF) согласно формуле: $COF = \text{крутящий момент} / (1/3 \times \text{диаметр диска} \times \text{нормальное усилие})$. Для каждого состава измерение повторяют 5 раз. Величину коэффициента трения сообщают путем экстраполяции отрезка 5 (по оси ординат) в начале каждой кривой зависимости COF от времени (COF_0).

- Метод с искусственными слезами

Два диска на основе полиакрилатного биоматериала, используемого для изготовления гидрофобных интраокулярных линз (как описано в патенте EP 1830898) диаметром 16,15 мм, предварительно увлажняют путем погружения в воду при 60°C примерно на 2 часа и затем закрепляют на верхней и нижней геометрии реометра DHR-2 (TA Instruments). Примерно 100 мкл образца, который испытывают, помещают на нижний диск, затем верхнюю геометрию опускают до контакта между обоими дисками до приложенного нормального усилия 5 ньютонов. Измерения коэффициента трения выполняют при 25°C на протяжении 150 секунд при постоянном нормальном усилии (5 Н), частоте колебаний 1,256 рад/с и угле деформации приблизительно 0,05 радиан, согласно протоколу, адаптированному из протокола, описанного Waller et al. (в J. 47 Rheumatol., 39, 7, 1473, 2012). Активируется опция «сцепление в нулевой начальной точке колебательного движения». В каждой точке измерения регистрируют величину крутящего момента, и затем вычисляют коэффициент трения (COF) согласно формуле: $COF = \text{крутящий момент} / (1/3 \times \text{диаметр диска} \times \text{нормальное усилие})$. Для каждого состава измерение повторяют 5 раз. Величину коэффициента трения сообщают путем экстраполяции отрезка (по оси ординат) в начале каждой кривой зависимости COF от времени (COF_0).

Усилие для выталкивания через иглу

Измерение выполняют с использованием оборудования для теста на сжатие MultiTest 2.5-i (Mecmesin), снабженного компрессионной ячейкой 100 Н. Подбирают подходящую иглу для шприца, содержащего образец. Шприц устанавливают на тестер, на поршень шприца надавливают с постоянной скоростью (например, 10 или 80 мм/мин), и измеряют усилие, необходимое для выталкивания. Максимальное усилие для оборудования составляет примерно 70 ньютонов.

Антиоксидантная способность in vitro (тест ABTS)

Для того, чтобы измерить антиоксидантную активность препаратов карбоксиалкилхитозанов и сравнить ее с коммерчески доступными продуктами, применяют тест

«ABTS» *in vitro*. Такой тест заключается в определении способности вещества улавливать катионный радикал 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS•1), хромофор, максимум поглощения которого в форме его катионного радикала локализуется при длине волны 734 нм. Протокол адаптирован из метода, описанного Valyova et al. (Int. J. Applied. Res. Nat. Prod., 5, 19, 2012), и выполняется с помощью полистирольного микропланшета типа Nunclon 96 (Thermo Fisher Scientific) и считывателя микропланшетов Infinite M200 (Tecan Life Sciences) для измерения поглощения.

Каждую серию тестов выполняют в 4 стадии.

1) Растворяют 1 г диаммониевой соли 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) в гомогенном растворе $K_2S_2O_8$ (2,45 mM в воде MilliQ), и получают концентрацию ABTS 7 mM. Такую смесь защищают от света и перемешивают при комнатной температуре в течение 24 часов – времени, которое требуется для получения определенного количества катионных радикалов ABTS•1. Окончательно рабочий раствор ABTS•1 получают, беря 600 мкл последней смеси и разбавляя это количество в воде MilliQ до концентрации 415 мкМ.

2) Строят калибровочную кривую способности поглощать свободные радикалы путем сравнения с тролоксом – эталонной молекулой антиоксиданта (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота). Получают растворы тролокса концентрации 30, 60, 90, 120, 150, 180 и 210 мкМ путем разведения в воде MilliQ исходного раствора 15 мг тролокса в 5 мл 100% метанола. Измерения поглощения выполняют при длине волны 734 нм через 1 час после смешивания 50 мкл рабочего раствора ABTS•1 и 50 мкл каждого раствора тролокса. Считывают соотношение между поглощением и концентрацией тролокса в области линейности. Минимальная величина поглощения в области линейности соответствует пределу обнаружения.

3) Испытываемые продукты характеризуют или как таковые в их начальной концентрации или разбавленные в воде MilliQ (определяются в соответствии с испытываемым продуктом, поскольку поглощающая способность смеси с раствором ABTS•1 выше предела обнаружения). Смешивают 50 мкл рабочего раствора и 50 мкл раствора испытываемого продукта. Измеряют поглощение при длине волны 734 нм после 1-часовой инкубации при комнатной температуре. Если величина поглощения находится в пределах диапазона обнаружения прибора, она сохраняется, и эквивалент тролокса вычисляют с помощью калибровочной кривой, отмеченной ТЕАС для «антиоксидантной способности, эквивалентной тролоксу».

4) Используют положительный контроль для выражения антиоксидантной способности нормализованным способом от одной серии до другой – аскорбиновую кислоту (витамин С) в растворе в концентрации 0,02 мг/мл (20 мкг/мл). Сначала измеряют ТЕАС растворов аскорбиновой кислоты от 0,005 до 0,05 мг/мл. Подтверждают, что поглощение 0,02 мг/мл раствора аскорбиновой кислоты находится в области линейности. Наконец, нормализованную антиоксидантную способность испытываемого продукта выражают через отношение ТЕАС (продукт)/ТЕАС (аскорбиновая кислота, 0,02 мг/мл)

Пример 1

Получают карбоксиметилхитозан через реакции карбоксиметилирования и ацетилирования согласно описанному ниже способу с использованием параметров реакции, приведенных для примера в таблице 1а. Кроме того, возможно модулировать молекулярную структуру карбоксиметилхитозана, используя другие параметры реакций.

Стадия 1: карбоксиметилирование хитозана

Диспергируют 30 г хитозана, происходящего из *Agaricus bisporus*, в 600 мл изопропанола, 41 мл воды и 163 мл 50% раствора гидроксида натрия (мас./об.). Растворяют 135 г алкилирующего агента монохлоруксусной кислоты (МСА) в 135 мл изопропанола и добавляют к суспензии хитозана. Реакцию продолжают при 35°C в течение 23 часов. Полимер извлекают осаждением в этаноле, затем очищают, чередуя растворение в воде и осаждение в этаноле. После сушки в сушильном шкафу с вентиляцией карбоксиметилхитозан собирают (условное обозначение СС4, таблица 1b).

Стадия 2: ацетилирование карбоксиметилхитозана

Диспергируют 21 г СС4 в 570 мл воды, и доводят pH раствора до pH>7. Добавляют 10 мл уксусного ангидрида, и раствор перемешивают при 25°C в течение 30 минут. Доводят pH раствора до pH>7, затем добавляют 10 мл уксусного ангидрида. После гомогенизации (примерно 30-минутное перемешивание при комнатной температуре) доводят pH до pH 7,5. Полимер извлекают осаждением в этаноле, затем очищают, чередуя растворение в воде и осаждение. После сушки в сушильном шкафу с вентиляцией карбоксиметилхитозан собирают (условное обозначение СС3, таблица 1b).

Карбоксиметилхитозаны, используемые для получения матриц в примерах 2-11, описаны в таблице 1b. СС1-СС6 – это карбоксиметилхитозаны, полученные из грибного хитозана и полученные описанным выше способом.

СС7 представляет собой коммерческий карбоксиметилхитозан, полученный из ракообразных, предоставленный Kraeber Company (код продукта 5313009900, Ellerbek, Германия).

Таблица 1а. Параметры реакций карбоксиметилирования и ацетилирования

Стадия 1: карбоксиметилирование	Условное обозначение СС4
Алкилирующий агент	Монохлоруксусная кислота (МСА)
NaOH /хитозан	5,44% (мас./мас.)
Алкилирующий агент/хитозан	4,50% (мас./мас.)
Изопропанол/ алкилирующий агент	100%
Температура - длительность	35°C — 23 часа
Стадия 2: ацетилирование	Условное обозначение СС3
Уксусный ангидрид /СС	0,5 (об./мас.)
- первое добавление	0,5 (об./мас.)
- второе добавление	

Температура - длительность	25°C — 1 час
----------------------------	--------------

Таблица 1b. Карбоксиметилхитозаны (CC)

Условн. обозн.	Происхождение	DA ^a (мол.%)	DS ^a (мол.%)	DN ^b (мол.%)	Характер. вязкость ^c (мл/г)
CC1	<i>Agaricus bisporus</i>	58	82	20	1096
CC2		56	81	20	994
CC3		55	87	20	912
CC4		14	85-90	41	652
CC5		57	88	23	960
CC6		47	85	24	1064
CC7 (Kraeber)	Ракообразные	<10% ^d	79	95	332

a: измерено твердофазным углерод-13 ЯМР (формула 2); b: измерено потенциометрическим титрованием; c: измерено методом капиллярной вискозиметрии; d: сигнал ацетильной группы не обнаруживается углерод-13 ЯМР (низкая DA).

Пример 2. Матрицы из карбоксиметилхитозана

Тестируют продукты синтеза для обеспечения матриц из карбоксиметилхитозана путем ковалентного сшивания с использованием сшивающего агента диглицидилового эфира 1,4-бутандиола (CAS 245-79-8, BDDE). Используют несколько карбоксиметилхитозанов происхождения из *Agaricus bisporus*, полученных Kiomed Pharma, согласно способу примера 1. Их характеристики приводятся в таблице 1. BDDE (96%, удельная плотность 1,049) поставляется Alfa Aesar (ThermoFischer, Kandel, Германия).

Пример 2a

Получают сшитую матрицу из карбоксиметилхитозана CC3 после регулирования параметров реакции (таблица 2a, условное обозначение M1-A). CC3 имеет степень ацетилирования 55% и степень карбоксиметилирования 87%, измеренные углерод-13 ЯМР. После диализа гидрогель, образованный матрицей, переносят в 3-мл стеклянные шприцы, которые стерилизуют паром за короткий цикл в автоклаве SYSTEC-DX-65 (условие «A2»). Конечную концентрацию полимера полученного стерилизованного гидрогеля (M1-A) определяют по балансу масс. Когезивный характер гидрогеля анализируют с помощью водного теста, и уровень вязкоэластичности (по шкале от 1 до 4) определяют методом реометрии. Чем выше оценка, тем более вязкоэластичной является матрица, образующая гидрогель. Следует вывод, что после адаптации параметров реакций возможно получить матрицу из сшитого BDDE карбоксиалкилхитозана, образующую когезивный гидрогель согласно водному тесту. Гидрогель имеет оценку эластичности 1. Его можно инъектировать через иглу для интрадермальной инъекции (27G, 13 мм).

Затем такие же параметры реакций применяют к двум карбоксиметилхитозанам различной молекулярной структуры, у которых степень ацетилирования меньше 40% (таблица 1b): CC4 грибного происхождения (Kiomed Pharma) и CC7 из ракообразных (Kraeber).

Таблица 2а. Матрицы из сшитого карбоксиалкилхитозана

Условное обозначение	M1-A	M1-B	M1-C	M1-D
Полимер – условное обозначение (масса), начальная концентрация	CC3 (7) 11%	CC4 (7 г) 11%	CC4 (7 г) 11%	CC7 (7 г) 11%
DA	>40%	<40%	<40%	<40%
Происхождение	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	Ракообразные
Водная фаза - состав	Фосфатный буфер, NaOH 0,25M			
Водная фаза - объем	63,4 мл			
Сшивающий агент - молекула (объем)	BDDE 1,2 мл	BDDE 1,2 мл	BDDE 0,6 мл	BDDE 1,2 мл
Агент/полимер (г/100 г)	18%, мас./мас.	18%, мас./мас.	9%, мас./мас.	18%, мас./мас.
Температура, длительность реакции	50°C, 2 часа			
Нейтрализация	Хлороводородная кислота, фосфатный буфер			
Очистка	Диализ против фосфатного буфера			
Стерилизация	A2*			
Конечная концентрация полимера (мг/мл)	24	26	25	22
Когезия гидрогеля (водный тест)	OK	NOK	NOK	NOK
pH — осмоляльность (мосм/кг)	7,2 - 289	/	/	/
Уровень вязкоэластичн. (шкала от 0 до 4)	1	/	/	/
Легк.инъец.** (игла 27G, 13 мм)	OK	/	/	/

*A2: короткий цикл (автоклав SYSTEC DX-65); **усилие выталкивания меньше 30 ньютонов при скорости выталкивания 10 мм/мин.

Матрицы M1-B и M1C, полученные в таких же условиях, как матрица M1-A, соответственно (таблица 2а), не образуют когезивный гидрогель согласно водному тесту. Напротив, матрица M1-A способна образовывать когезивный гидрогель, удовлетворяя таким образом цели настоящего изобретения.

Пример 2b

Делается попытка модулировать биомеханические свойства гидрогелей на основе сшитых карбоксиалкилхитозанов, в частности, их вязкоэластичность (по шкале от 0 до 4). Для этого получают матрицы из CC1, CC5 и CC6 с DA выше 40% (таблица 1b), изменяя молекулярную массу карбоксиалкилхитозана (выраженную в характеристической вязкости) и параметры реакции сшивания. Сшивающий агент (BDDE), среда, температура и время реакции являются такими же, как для матрицы M1-A, так же, как условия нейтрализации и очистки.

Таблица 2b. Матрицы из сшитого карбоксиалкилхитозана с различной вязкоэластичностью

Условное обозначение	M1-E	M1-F	M1-G	M1-H	M1-I	M1-J	M1-K
Полимер – условное обозначение (сухая масса)	CC1	CC1	CC1	CC1	CC5	CC5	CC6
Начальная концентрация				11%	15%	13%	8%
BDDE/полимер (г/100 г)	18%	13%	21%	26%	9%	9%	18%
Стерилизация*	A2*	A2*	A2*	A2*	A2*	A2*	A1*
Конечная концентрация (мг/мл)	23	21	24	23	22	25	24
Когезия гидрогеля (водный тест)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
pH - осмоляльность (мосм/кг)	7,2 316	7,3 288	7,2 287	7,2 287	7,2 281	7,2 287	7,4 319
Уровень вязкоэластичности (шкала от 0 до 4)	2	1	2	3	3	1	1
Легкость инъекции** (игла 27G, 13 мм)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

*A2: короткий цикл; A1: длинный цикл

Оказывается, что возможно изменять биомеханические свойства гидрогелей на основе сшитых карбоксиалкилхитозанов, особенно вязкоэластичность, путем изменения параметров реакции (в частности, начальной концентрации карбоксиалкилхитозана или отношения сшивающий агент/карбоксиалкилхитозан, в данном случае BDDE/карбоксиалкилхитозан), а также молекулярную массу карбоксиалкилхитозана.

Пример 3. Матрицы из совместно сшитых карбоксиметилхитозана и гиалуронана

Ведут поиск матриц путем сшивания смеси карбоксиметилхитозана грибного происхождения и с DA больше 40% (таблица 1b) и гиалуронана с помощью BDDE («совместное сшивание»). Используют гиалуронан (HA) со средневязкостной молекулярной массой 2,2-2,3 миллиона (тип HA1) и 4,3 миллиона (тип HA2) (таблица 3a).

Таблица 3. Гиалуронат натрия (НА)

Тип	Поставщик	Mw* (миллион)	Плотность* (м ³ /кг)
НА1	HTL Javenech (Франция)	2,2	2,32 м ³ /кг
		2,3	2,36 м ³ /кг
НА 2		4,3	3,68 м ³ /кг

*величины, сообщенные поставщиком

Агент (BDDE), среда, температура и длительность реакции сшивания являются такими же, как для матрицы M1-A из примера 2. как и условия нейтрализации и очистки. Гидрогели, образованные матрицами, стерилизуют с помощью автоклава, как описано в примере 2, согласно циклу A1 или A2. Описывают путем иллюстрации несколько гидрогелей, так как другие комбинации и/или параметры также могут привести к когезивным гидрогелям. Все указанные гидрогели легко продавливаются сквозь иглу для интрадермальной инъекции размера 27 Гейдж и длиной 13 мм.

Пример 3а

Проводят поиск для того, чтобы показать, что возможно совместное сшивание карбоксиалкилхитозана (СС) и гиалуронана (НА) с образованием когезивного гидрогеля. Для этого получают матрицу из смеси СС и НА с массовым соотношением СС/НА 75:25 (таблица 3а). Условные обозначения СС соответствуют предыдущим образцам. Кроме того, ведут поиск для модуляции уровня эластичности от 1 до 3 (по шкале от 0 до 4), регулируя параметры реакции сшивания.

Таблица 3а. Матрицы из совместно сшитых СС и НА (отношение масс СС/НА 75:25)

Условное обозначение	M2-A	M2-B	M2-C	M2-E
Полимеры – условное обозначение (масса)	СС1	СС1	СС5	СС1
	НА1	НА1	НА2	НА1
Начальная концентрация полимеров (% мас./об.)	(11%)	(11%)	(11%)	(11%)
BDDE/полимеры (% г/100 г)	13%	18%	13%	13%
Стерилизация*	A2	A2	A1	A1
Конечная концентрация полимеров (мг/мл)	23	23	24	23
Когезия гидрогеля (водный тест)	ОК	ОК	ОК	ОК
рН - осмоляльность (мосм/кг)	7,3—314	7,3—317	7,2—286	7,2—287

Уровень вязкоэластичности (шкала от 0 до 4)	2	3	2	1
--	---	---	---	---

*Условия примера 2

Наблюдают, что при одном и том же соотношении BDDE/полимер (18%) и одной и той же конечной концентрации полимера 23 мг/мл, гидрогель M2-B CC, сшитого совместно с 25% НА, является более эластичным, чем гидрогель M1-A одного CC в примере 2. Также следует вывод, что возможно изменить вязкоэластичные свойства гидрогелей совместно сшитого карбоксиалкилхитозана и НА путем изменения молекулярной массы НА, процентной доли сшивающего агента, в настоящем описании BDDE.

Пример 3b

Ведут поиск получения когезивных гидрогелей из карбоксиалкилхитозана и НА, совместно сшитых в переменной пропорции.

Таблица 3b. Матрицы из карбоксиалкилхитозана и НА, сшитых совместно при переменном соотношении CC/НА

Условное обозначение	M2-F	M2-G	M2-H
Полимеры – условн. обознач.	CC5	CC5	CC1
	HA1	HA1	HA1
Начальная концентрация	11%	11%	11%
Масс.соотн. CC/НА (мас./мас.)	25:75	50:50	95:5
BDDE/полимеры (%, г/100 г)	13%	13%	13%
Когезия гидрогеля (водный тест)	OK	OK	OK
Конечная концентрация полимеров (мг/мл)	23	23	22
pH - осмоляльность (мосм/кг)	7.3	7.3	7.2
	292	293	299
Уровень вязкоэластичности (шкала от 0 до 4)	3	2	1

Оказывается, что возможно получить когезивные гидрогели из совместно сшитых карбоксиалкилхитозана и НА в переменной пропорции, и что их уровень эластичности зависит от соотношения карбоксиалкилхитозан/НА.

Пример 4. Матрицы из сшитого карбоксиметилхитозана в комбинации с гиалуронатом

В данном примере ведут поиск для оценки возможности образования когезивного гидрогеля из матрицы сшитого карбоксиметилхитозана в комбинации с НА. Первым сшивают карбоксиметилхитозан с помощью BDDE согласно способу в примере 1, и затем к нему добавляют

раствор НА (тип НА1). Затем полученный гидрогель стерилизуют в автоклаве по циклу А2 (таблица 4).

Таблица 4. Матрица из карбоксиалкилхитозана в комбинации с НА

Условное обозначение	М4-А
СС	СС5
Условное обозначение – начальная концентрация	15%
Начальная концентрация	
НА	НА1
BDDE/полимер (г/100 г)	13%
Конечная концентрация полимеров (мг/мл)	22
Конечная концентрация, отношение СС/НА (мг/мл)	19,5 / 0,3
Стерилизация	А2
Когезия гидрогеля (водный тест)	ОК
рН - осмоляльность (мосм/кг)	7,2 - 275
Уровень вязкоэластичности (шкала от 0 до 4)	3
Легкая инъекция (игла 27G, 13 мм)	Да

НА легко внедряется в гидрогель на основе матрицы из сшитого карбоксиалкилхитозана. Полученный гидрогель является когезивным согласно водному тесту и имеет оценку вязкоэластичности 3, будучи в то же время легко выталкиваемым для инъекции через иглу 27 Гейдж для интрадермального введения.

Пример 5. Биомеханические свойства гидрогелей

В настоящем примере характеризуются биомеханические свойства некоторых характерных СС гидрогелей из примеров со 2 по 4 с помощью метода реометрии (таблица 5). Гидрогели являются когезивными, инъектируемыми через иглу 27 G, и имеют уровни эластичности от 1 до 3. Их сравнивают со свойствами трех коммерческих продуктов на основе сшитого гиалуронана, предназначенных для интрадермальной инъекции в эстетических целях (таблица 5, условные обозначения В1 – В3): В1 представляет собой вязкий раствор ($\tan \delta > 1$), и В2 и В3 являются когезивными гелями ($\tan \delta < 1$) согласно водному тесту.

Таблица 5. Биомеханический профиль продуктов на основе сшитого СС и коммерческого сшитого НА

	Ср (мг/мл)	G' (Па)	G'' (Па)	$\tan \delta$	Уровень вязкоэластичности (шкала от 0 до 4)
М1-Е	23	40	14	0,3	2

M1-F	21	17	8	0,5	1
M2-A	23	37	14	0,4	2
M2-B	23	127	21	0,2	3
M2-C	24	42	15	0,4	2
M2-E	23	11	8	0,8	1
M4-A	22	106	34	0,3	3
B1	20	11	13	1,2	-
B2	22.5	48	31	0,7	2
B3	25.5	137	53	0,4	3

Подтверждается, что гидрогели на основе сшитых карбоксиалкилхитозанов согласно изобретению имеют биомеханические свойства, в частности, модуль эластичности (G'), сравнимые со свойствами коммерческих продуктов на основе сшитого НА, предназначенных для интрадермальной инъекции для эстетической медицины.

Пример 6. Способность поглощать свободные радикалы по ABTS^{°1} (*in vitro*)

Ведут поиск для подтверждения того, что матрицы из сшитого карбоксиалкилхитозана (CC) способны поглощать окислительные свободные радикалы, с использованием стандартного теста *in vitro*, известного как «ABTS», в котором образуется свободный радикал ABTS^{°1}, и выполняют калибровку с антиоксидантом «тролокс». Каждый испытываемый продукт разбавляют для получения общей концентрации полимера Ср (CC, НА или CC и НА) 8 мг/мл, 4 мг/мл и 1 мг/мл. Результат контролируют, чтобы убедиться, что он находится в области обнаружения теста, и затем способность поглощать свободный радикал ABTS^{°1} выражают в эквиваленте тролоксу. Также измеряют антиоксидантную способность 20 мкг/мл раствора аскорбиновой кислоты (положительный контроль). Антиоксидантную способность каждого испытываемого продукта нормализуют согласно формуле: нормализованная антиоксидантная способность = TEAC (продукт)/TEAC (20 мкг/мл аскорбиновой кислоты).

Для сравнения проверяют полимер несшитый карбоксиалкилхитозан в растворе (CC2) и коммерческий продукт на основе несшитого НА в растворе (условное обозначение B6). Также характеризуют 4 коммерческих продукта, предназначенных для интрадермальной инъекции для эстетических целей: условные обозначения B1 – B3 (на основе одного сшитого НА, см. таблицу 5 в примере 5) и B4 – гидрогель на основе сшитого НА в комбинации с комплексом нескольких небольших молекул, включая молекулы антиоксиданта.

В таблице 6 приводятся результаты, полученные при одной и той же концентрации полимера (Cp) 4 мг/мл для всех продуктов.

Таблица 6. Антиоксидантная способность по тесту ABTS (нормализованная к аскорбиновой кислоте при 20 мкг/мл)

Условное обозначение	Состав	Начальная Ср (мг/мл)	Ср (мг/мл)	Нормализованная антиоксидантная способность
Положительный контроль				
/	Аскорб. кислота	/	0,02	1,00
Растворы (без сшивания)				
S1	СС2	20 мг/мл	4	0,76
B6	НА	15 мг/мл	4	0,15
Гидрогели (со сшиванием)				
M1-E	СС	23 мг/мл	4	1,02
M2-A	СС/НА 75:25	23 мг/мл	4	0,97
Коммерческие продукты (сшитый НА)				
B1	НА	20 мг/мл	4	0,14
B2	НА	22.5 мг/мл	4	0,17
B3	НА	25.5 мг/мл	4	0,14
B4	НА, комплекс	15 мг/мл	4	0,53

Наблюдают, что все композиции на основе СС способны в значительной степени поглощать свободный радикал ABTS^{°1} и, таким образом, действуют как антиоксиданты, является ли они раствором несшитого СС (S1) или гидрогелями сшитого СС (M1-E и M2-A). При такой же концентрации полимера коммерческие продукты только с НА (B6, B1, B2 и B3) не демонстрируют такую способность.

Неожиданно гидрогели M1-E (СС) и M2-A (СС/НА 75:25) демонстрируют самую высокую антиоксидантную способность из всех испытанных продуктов, включая сравнение с раствором S1 несшитого СС. Оба гидрогеля имеют антиоксидантную способность, схожую с аскорбиновой кислотой при 20 мкг/мл.

Среди коммерческих продуктов на основе НА только B4 способен поглощать радикал ABTS^{°1} в значительной степени, хотя со способностью в 2 раза меньшей, чем способность M1 -E и M2-A. На самом деле, B4 представляет собой сшитый гиалуронан, связанный с комплексом из нескольких небольших молекул, включая антиоксиданты, которые ответственны за наблюдаемый эффект. Однако, так как эти вещества являются небольшими растворимыми в воде молекулами, вероятно, что они быстро диффундируют из гидрогеля B4 после интрадермальной инъекции, и что тогда гидрогель будет утрачивать свою антиоксидантную способность.

Пример 7. Способность гидрогелей снижать окислительный стресс в культуре клеток кожи *in vitro*

Способность двух гидрогелей на основе сшитого СС (условное обозначение M1-E, см.

пример 2) и сшитых совместно СС/НА (М2-А, см. пример 3) защищать клетки кожи человека от повреждения, вызванного свободными радикалами «ROS» (виды реактивного кислорода), когда виды радикалов сталкиваются с кожной тканью при окислительном стрессе, оценивают стандартным тестом *in vitro*. Проводят сравнение с раствором несшитого карбоксиалкилхитозана и коммерческим продуктом на основе сшитого гиалуронана, предназначенным для интрадермальной инъекции в эстетических целях (условное обозначение В3, см. пример 5).

Дермальные фибробласты человека (NHDF) при примерно 40% их пролиферативном потенциале *in vitro* культивируют в монослое в DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) с 10% фетальной бычьей сыворотки, пенициллином и стрептомицином, при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Культуру переносят в DMEM без фетальной бычьей сыворотки, и затем распределяют по лункам. Испытываемый продукт разводят в DMEM до общей концентрации полимера 0,6 и 0,2 мг/мл и добавляют в лунки (по 3 лунки на испытываемый продукт). После 72-часового контакта с испытываемым продуктом, в течение 30 минут добавляют зонд диацетат 2'-7'-дихлордигидрофлуоресцеина, который флуоресцирует под действием свободных радикалов. Затем культуру в каждой лунке промывают HBSS для удаления испытываемого продукта, клетки снова помещают в HBSS, и затем все лунки облучают UVA при 12,5 Дж/см² в течение 20 минут для генерации ROS.

Необработанную необлученную культуру используют как эталон. Необработанную и облученную культуру используют в качестве отрицательного контроля, и обработанную аскорбиновой кислотой (50 мкг/мл) и облученную культуру используют в качестве положительного контроля. По окончании облучения UVA измеряют интенсивность флуоресценции (длина волны возбуждения 485 нм, испускания 520 нм), которая пропорциональна содержанию ROS, и затем вычисляют относительное содержание ROS к необлученному эталону (таблица 7). Затем вычисляют снижение содержания ROS относительно необработанного и необлученного контроля, что характеризует способность продукта снижать окислительный стресс.

Таблица 7. Способность снижать окислительный стресс в культуре дермальных фибробластов человека (обработка в течение 72 часов перед воздействием UVA в течение 20 минут)

Обработка	Состав	Концентрация	UVA	Относит. содержание ROS (± среднее стандартн. отклон., N=3)	Снижение содержания ROS (%)
Условное обознач.	/	/	Без	100 ± 9%	/
Отрицательный контроль	/	/	Да	338 ± 20%	0%
Положительн. контроль	Аскорбиновая кислота	50 мкг/мл		233 ± 4%	-31%

Раствор				
S1	несшитый СС2	0,6 мг/мл*	249 ± 26%	-26%
Гидрогели				
_M1-E	Сшитый СС	0,6 мг/мл*	238 ± 25%	-30%
M2-A	Сшитый СС/НА 75:25	0,6 мг/мл*	265 ± 24%	-22%
B3	Сшитый НА	0,6 мг/мл*	307 ± 16%	-9%

*Общая концентрация полимера (СС, СС/НА или НА) для обработки клеток

Для условий этого испытания *in vitro* делается вывод, что композиции на основе СС, является ли он сшитым (M1-E) или несшитым (S2), имеют хорошую способность снижать содержание ROS, т.е., снижать окислительный стресс, способный изменять клетки и кожную ткань. Эта способность на таком же уровне, как способность аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл, витамин С), и значительно выше способности коммерческого продукта из сшитого НА. С 75% СС композиция M2-A сшитых совместно СС/НА также имеет хорошую способность снижать окислительный стресс.

Пример 8. Жидкий гидрогель на основе матрицы из карбоксиалкилхитозана для окулярного введения

В настоящем примере ведут поиск для получения гидрогеля сшитого СС, вязкость которого позволяет легко закапать его в форме четко очерченной капли, имеющего в то же время хорошую смазывающую способность, подходящую для признака искусственных слез для обработки глазной поверхности.

Для этого получают когезивный гидрогель из сшитого СС, имея целью динамическую вязкость в диапазоне 1-60 мПа.с (при скорости сдвига 10 с⁻¹) (МВ-В, таблица 8а). Возможность его инстиляции подтверждают, и измеряют его смазывающую способность для двух полиакрилатных поверхностей согласно методу для искусственных слез, выраженную как коэффициент трения.

Свойства такого гидрогеля сравнивают со свойствами двух коммерческих продуктов на основе несшитого НА, предназначенных для обработки глазной поверхности (условные обозначения В7 и В8, таблица 8b). Их смазывающую способность измеряют в таких же сериях испытания, как М8-В.

Таблица 8а. Свойства жидкого гидрогеля на основе сшитого СС

Условное обозначение	М8-В
Полимер – условное обозначение, начальная концентрация	СС1, 11%
BDDE/полимер (г/100 г)	13%
Стерилизация	Цикл А2
Приемлемый внешний вид/текстура	Да

Когезия (водный тест)	ОК
Конечная концентрация полимера (мг/мл)	7 мг/мл
Способность к инстиляции	ОК
Динамическая вязкость при 10 с^{-1} (мПа.с)	1,1
Коэффициент трения	164 ± 44

Таблица 8b. Свойства коммерческих продуктов на основе НА для обработки глазной поверхности

Условное	B7	B8
Концентрация НА (мг/мл)	1,8 мг/мл	3 мг/мл
Когезия по водному тесту	NOK	NOK
Способность к инстиляции	ОК	ОК
Динамическая вязкость при 10 с^{-1} (мПа.с)	6	50
Коэффициент трения	141 ± 57	264 ± 64

Делают вывод, что можно получить когезивные, жидкие и инстиллируемые гидрогели сшитого СС со смазывающей способностью, сравнимой с коммерческими продуктами для обработки глазной поверхности.

Пример 9. Локальные эффекты после интрадермальной имплантации кроликам (кратковременной)

Три гидрогеля на основе матрицы СС – М1-А (сшитый СС, см. пример 1), М2-А и М2-В (совместно сшитые СС/НА, см. пример 2) – оценивают путем интрадермального введения кроликам: Эти препараты упакованы в 1-мл стеклянные шприцы (Нурак, BD Medical) и стерилизованы. Содержание в них эндотоксинов, измеренное согласно монографии ЕР 2.6.14 - метод D из Европейской фармакопеи, является удовлетворительным. Также оценивают два коммерческих продукта на основе сшитого гиалуронана, предназначенные для интрадермальной инъекции в эстетических целях (В1 и В2, см. пример 5).

Препарат в объеме 200 мкл вводят путем интрадермальной инъекции кроликам через иглу диаметром 27 Гейдж согласно протоколу, выполняя стандарт IS010993-10 для оценки первичного раздражения, вызванного интрадермальным имплантом. В целом выполняют двенадцать инъекций на продукт шести кроликам. Локальные эффекты наблюдают ежедневно во всех местах инъекций, в частности, на уроне эритемы.

В таблице 9 приводится средний уровень эритемы на 7 день после инъекции (оценка по шкале от 0 до 4). Также отмечают, видны ли папулы на 7 день (оценка по шкале от 0 до 4). Используют макроскопический или микроскопический анализ (дермальная гистология) для оценки присутствия продукта у животных, подвергнутых эвтаназии на 7 день после инъекции.

Таблица 9. Локальные эффекты через 7 дней после интрадермальной инъекции гидрогелей кроликам (6 мест инъекций на испытываемые продукты)

Условное обозначение	Ср (мг/мл)	Локальные эффекты — эритема (средняя оценка, шкала от 0 до 4)	Объем папул (средняя оценка, шкала от 0 до 4)	Присутствие в коже
M1 -E	23	0	0	Да
M2-A	23	0,5	1,0	Да
M2-B	23	1	1,0	Да
B1	20	0	0	Да
B2	22,5	0,1	1,3	Да

Интрадермальная инъекция гидрогелей ассоциируется с появлением умеренных локальных эффектов, характеризующихся эритемой с максимальной оценкой в среднем 1 в 7 день по шкале от 0 до 4. Это соответствует умеренному уровню эритемы, сравнимому с уровнем, наблюдаемым для двух коммерческих продуктов. Кроме того, показано присутствие продуктов в коже, когда животных подвергли эвтаназии на 7 день и выполнили гистологические анализы.

Пример 10. Гидрогели для вискозупплементации в сустав

В настоящем примере оценивают вязкоэластичные свойства и смазывающую способность двух гидрогелей на основе сшитого СС (M1-E) и совместно сшитых СС/НА (M2-B) и сравнивают со свойствами двух коммерческих продуктов на основе сшитого НА, предназначенных для лечения остеоартрита, путем вискозупплементации в сустав (B9 и B10, см. состав в таблице 10). Смазывающий характер гидрогелей определяют по их способности снижать коэффициент трения между двумя полиакрилатными дисками, установленными в реометре, согласно методу для вискодобавок.

Таблица 10. Биомеханический профиль (реометрия) и коэффициент трения (COF, среднее для 3 шприцов на продукт, 5 измерений на шприц) гидрогелей

Условное обозначение	Ср композиции (мг/мл)**	G' (Па)	G'' (Па)	tan δ	COF
M1-E	Сшитый СС, 23 мг/мл	40	14	0,3	$5,7 \pm 0,6$
M2-B	Сшитый СС / НА, 23 мг/мл	127	21	0,2	$7,3 \pm 0,6$
B9	Сшитый НА / свободный НА, 8 мг/мл	87	27	0,3	$6,9 \pm 1,0$
B10	Сшитый НА, 20 мг/мл	542	127	0,3	$44 \pm 20^*$

*Стандартное отклонение высокое, что указывает на высокое трение между двумя

поверхностями (низкая смазывающая способность испытываемого продукта); **общая концентрация полимеров.

Наблюдают, что гидрогели как сшитого СС, так и совместно сшитых СС/НА имеют модуль эластичности G' в таком же диапазоне, как В9, в то время как В10 имеет более высокий модуль эластичности. Наблюдают, что гидрогели как СС, так и СС/НА проявляют существенную смазывающую способность, характеризующуюся низким коэффициентом трения между двумя поверхностями, сравнимую с вискодобавкой В10 из сшитого НА, и лучшей, чем у вискодобавки В11 из сшитого НА.

В примерах 11 – 14 используемые полимеры СС и НА являются полимерами, описанными в таблицах 11а и 11б.

Таблица 11а. СС из *Agaricus bisporus*

Условное обозначение	Уровень DA	DA (мол.%)	DS (мол.%)	Характеристическая вязкость (мл/г)
СС8	DA < 40%	28% ^a	83% ^b	900 - 1100 мл/г
СС1	DA > 40%	58% ^c	82% ^c	
СС9		55% ^c	85% ^c	
СС5		57% ^c	88% ^c	

a: величина, оцененная из DA исходного хитозана; b: величина, оцененная из DS СС после ацетилирования, измеренная углерод-13 ЯМР; c: измерена твердофазным углерод-13 ЯМР (формула 2).

Таблица 11б. Гиалуронат натрия (НА)

Тип	Изготовитель	Mw (миллион)*	Характеристическая вязкость (м ³ /кг)*
НА1	HTL Javenech (Франция)	~2,0 - 2,5	2,2 - 2,4 м ³ /кг
НА2		~3,2 - 3,8	3,0 - 3,6 м ³ /кг

Пример 11. Проверка совместного сшивания НА и СС, имеющим степень ацетилирования меньше 40%

Ведут поиск, чтобы подтвердить, возможно ли получить когезивный гидрогель путем совместного сшивания СС и НА, исходя из СС, имеющего DA меньше 40% (СС8, таблица 11А), и НА типа НА1 (таблица 11б), с использованием таких же условий, как в таблице 3а в примере 3. Условия и характеристики полученного препарата приводятся в таблице 11с (условное обозначение М2-1) и сравниваются с условиями и свойствами гидрогеля для сравнения М2-А из примера 3 (в соответствии с изобретением).

Наблюдают, что с СС8 гель не получается путем сшивания и стерилизации в автоклаве, как определено по величине тангенса дельта ($\tan \delta$, измерена реометрией). Действительно, препарат М2-1 включает величину $\tan \delta$ 1,6, которая выше 1, показывая поведение вязкого раствора, а не геля. Напротив, гидрогель М2-А имеет величину $\tan \delta$ 0,4, что меньше 1, показывая поведение геля в соответствии с изобретением.

Таблица 11с. Совместное сшивание НА с СС с $DA < 40\%$ (М2-1), и сравнение с матрицей из М2-А в примере 3

Условное обозначение	М2-1	М2-А (пример 3)
СС (условное обозначение)	СС8	СС1
DA (мол. %)	DA < 40%	DA > 40%
НА (тип)	НА1	НА1
Начальная концентрация полимеров (% , мас./об.)	11%	11%
BDDE/полимеры (% , г/100 г)	13%	13%
Стерилизация в автоклаве	A2	A2
Конечная концентрация полимеров (мг/мл)	24	23
Тан дельта, реометрия: гель (<1) или раствор (>1)	Тан дельта = 1,6 (вязкий липкий раствор)	Тан дельта = 0,4 (гель)
Модуль эластичности G' (Па)	0.2	37
Уровень вязкоэластичности (шкала от 0 до 4)	0	2
Когезия гидрогеля (водный тест)	Не измерялась*	ОК

**Водный тест не применим, поскольку полученный препарат не является гелем*

Пример 12. Гидрогель для восстановления объема или заполнения больших углублений кожи

Настоящий пример иллюстрирует применение гидрогеля на основе СС для восстановления объема лица или заполнения больших углублений кожи путем подкожной инъекции или в глубокие слои кожи. Для этих двух показаний исследуют гидрогель с уровнем вязкоэластичности 4, т.е., с модулем эластичности G' выше примерно 150 Па, причем гидрогель является когезивным согласно водному тесту и легко инъецируется через иглу 27 Гейдж и длиной 13 мм. При таких показаниях берут для сравнения два коммерческих продукта В11 и В12 (таблица 12), которые являются когезивными гидрогелями на основе сшитого гиалуронана с уровнем эластичности 4.

Гидрогель М2-1 получают путем совместного сшивания СС5 и НА типа НА1 (отношение СС/НА 25:75) с 13% BDDE при комнатной температуре в течение ночи. Он имеет модуль

эластичности 295 Па, соответствующий желательному уровню эластичности 4, причем в то же время остается когезивным и легко инъецируется, в соответствии с ожиданиями для предполагаемых показаний (таблица 12).

Таблица 12. Гидрогели для заполнения больших углублений кожи или подкожного ремоделирования

Условное обозначение	M2-J	B11	B12
СС (условное обозначение)	CC5	/	/
Тип НА	HA1	/	/
Отношение СС/НА (мас./мас.)	25:75	0:100	0:100
Начальная концентрация полимеров (% мас./об.)	11%	/	/
BDDE/полимеры (% г/100 г)	13%	/	/
Стерилизация в автоклаве	A2	/	/
Конечная концентрация полимера(ов) (мг/мл)	23	26	24
Когезия гидрогеля (водный тест)	OK	OK	OK
Легкость инъекции (игла 27G, 13 мм)	OK	OK	OK
Тап дельта	< 1	< 1	< 1
Модуль эластичности G' (Па)	295	300	190

Пример 13. Сохранение объема после интрадермальной инъекции гидрогеля совместно сшитых СС/НА в период 1 месяц

Получают гидрогель путем совместного сшивания СС9 (см. таблицу 11a) и НА2 в массовом отношении СС/НА 40:60 согласно условиям реакции в примере 12. Полученный гидрогель (условное обозначение M2-K) упаковывают в 1-мл стеклянные шприцы (Нурак, BD Medical) и стерилизуют так же, как в примере 9. Конечная концентрация полимеров в нем составляет 23 мг/мл, гидрогель является когезивным, допускающим инъекции через иглу 27G и имеет уровень вязкоэластичности 3.

Согласно протоколу, подобному протоколу в примере 9, одинаковый объем гидрогеля M2-K и коммерческого продукта B12 (см. таблицу 12, уровень вязкоэластичности 4) инъецируют интрадермально кроликам через иглу 27 Гейдж. С регулярными интервалами и в течение периода в 26 дней после инъекции оценивают локальную реакцию, и затем оценивают объем папулы, образованной инъецированным продуктом и видимой на поверхности кожи, путем ее оценки по шкале от 0 до 4. Объем папулы является показателем присутствия продукта, а также его способности локально увеличивать объем ткани кожи.

Инъекция обоих продуктов не вызывает какой-либо существенной реакции в течение последующего периода. Сразу после инъекции образуется папула со средней оценкой объема 3 ± 0

для обоих продуктов (из 20 оцененных мест инъекции). В последующие дни папулы постепенно рассасываются, но фактически присутствуют. На 26 день после инъекции папулы все еще присутствуют со средней оценкой объема, равной $2,0 \pm 0,0$ для M2-L и $2,4 \pm 0,5$ для B12 (20 оцененных мест), что соответствует их относительным уровням эластичности. Различие между оценками объема, показанными гидрогелями M2-K и B12, не является значимым в данный момент времени.

Таким образом, установлено, что гидрогель M2-K фактически остается в коже и сохраняет эффект увеличения объема вокруг места инъекции в течение по меньшей мере 26 дней после интрадермальной инъекции кроликам, как ожидается для показания заполнения углублений кожи.

Пример 14. Сохранение гидрогеля совместно сшитых СС/НА

Возможность сохранения гидрогеля совместно сшитых СС/НА оценивают, помещая его в условия ускоренного старения в сушильный шкаф при 40°C и путем мониторинга его биомеханических свойств. Гидрогель считается приемлемым с биомеханической точки зрения до тех пор, пока он остается когезивным согласно водному тесту и легко инъецируется, это включает гелеобразное поведение (величина $\tan \delta$ меньше 1), и уровень его вязкоэластичности сохраняется относительно начального уровня 10 и в соответствии с предполагаемым показанием.

С целью получения уровня вязкоэластичности 2, получают гель для сравнения M2-L путем совместного сшивания СС9 (см. таблицу 11a) и НА2 в соотношении СС/НА 70:30 согласно условиям реакции в примере 12. Получают продукт, упакованный в 1-мл стеклянные шприцы (Нурак, BD Medical) и стерилизованный так же, как в примере 9. Шприцы помещают в сушильный шкаф при 40°C на период в 6 месяцев. Характеристики, измеренные в течение 3-месячного хранения, приводятся в таблице 13.

Таблица 13. Характеристики гидрогеля совместно сшитых СС/НА (M2-L), хранившегося при 40°C в течение 3 месяцев

Время хранения при 40°C	t0	1 месяц	2 месяца	3 месяца
Когезия гидрогеля (водный тест)	ОК	ОК	ОК	ОК*
Легкость инъекции (игла 27G, 13 мм)	ОК	ОК	ОК	ОК*
$\tan \delta < 1$	ОК	ОК	ОК	ОК
Уровень вязкоэластичности (шкала от 0 до 4)	2	2	2	2

После 3 месяцев хранения в условиях ускоренного старения при 40°C продукт M2-L остается гидрогелем (поскольку $\tan \delta < 1$), и сохраняются его когезия, легкость инъецирования и уровень вязкоэластичности 2. Таким образом, экстраполяцией оценивается, что такой гидрогель совместно сшитых СС/НА должен сохранять приемлемые свойства для предполагаемого показания в течение по меньшей мере 12 месяцев при комнатной температуре.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Матрица, включающая по меньшей мере один карбоксиалкилхитозан, имеющий глюкозаминные звенья, N-ацетилглюкозаминные звенья и глюкозаминные звенья, замещенные карбоксиалкильной группой, причем указанный карбоксиалкилхитозан имеет степень ацетилирования выше 40% и до 80%, выраженную в числе молей N-ацетильных групп относительно числа молей всех глюкозаминных звеньев, причем указанный карбоксиалкилхитозан сшит ковалентными связями между цепями карбоксиалкилхитозана.

2. Матрица по п.1, отличающаяся тем, что указанный карбоксиалкилхитозан имеет степень замещения карбоксиалкильной группой выше 20%, например, выше 50%, например, меньше 200%, выраженную в числе молей заместителя относительно числа молей всех звеньев.

3. Матрица по любому из пп. 1 или 2, отличающаяся тем, что хитозан получают из мицелия гриба типа *Ascomycete*, и в частности *Aspergillus niger*, и/или гриба *Basidiomycete*, и в частности *Lentinula edodes* (шитаке) и/или *Agaricus bisporus* (белый гриб).

4. Матрица по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что карбоксиалкилхитозан реацетилирован.

5. Матрица по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что матрица является стерильной.

6. Матрица по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что матрица образует когезивный гидрогель.

7. Матрица по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что включает по меньшей мере один гиалуронан.

8. Матрица по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что включает по меньшей мере один гиалуронан, полученный ферментацией.

9. Матрица по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что включает по меньшей мере один гиалуронан, сшитый ковалентными связями.

10. Матрица по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что включает по меньшей мере один гиалуронан, совместно сшитый ковалентными связями с карбоксиалкилхитозаном.

11. Матрица по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что сшивки образованы сшивающим агентом, образующим указанные ковалентные связи.

12. Матрица по п.11, отличающаяся тем, что сшивающий агент выбирают из сшивающих агентов, используемых для сшивания полисахаридов, таких как, например, диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола, 1-бром-3,4-эпоксибутан, 1-бром-4,5-эпоксипентан, 1-хлор-2,3-эпителипропан, 1-бром-2,3-эпителипропан, 1-бром-3,4-эпителибутан, 1-бром-4,5-эпителипентан, 2,3-дибромпропанол, 2,4-дибромбутанол, 2,5-дибромпентанол, 2,3-дибромпропантиол, 2,4-дибромбутантиол и 2,5-дибромпентантиол, эпихлоргидрин, 2,3-дибромпропанол, 1-хлор-2,3-эпителипропан, диметиламинопропилкарбодиимид, галловая кислота, эпигаллокатехина галлат, куркумин, дубильная кислота, генипин, или даже диизоцианаты, такие как гексаметилендиизоцианат или толуиленидиизоцианат, или даже дивинилсульфон.

13. Матрица по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что образует гидрогель.

14. Матрица по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что образует когезивный гидрогель.

15. Матрица по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что имеет антиоксидантную способность поглощать свободные радикалы, особенно нормализованную антиоксидантную способность, больше 0,30, предпочтительно больше 0,50 и даже предпочтительнее больше 0,80 и, например, больше 0,90.

16. Композиция, отличающаяся тем, что включает по меньшей мере одну матрицу по любому из пп. 1-15.

17. Инъецируемая композиция, отличающаяся тем, что включает по меньшей мере одну матрицу по любому из пп. 1-15.

18. Фармацевтическая композиция, отличающаяся тем, что включает по меньшей мере одну матрицу по любому из пп. 1-15.

19. Композиция по п. 17 или 18, отличающаяся тем, что используется в виде инъецируемой, имплантируемой или инстиллируемой или вводимой местно фармацевтической композиции или инъецируемого, имплантируемого или инстиллируемого или вводимого местно медицинского устройства, например, для использования в способе терапевтического лечения, например, включающего местную инстилляцию или введение или инъекцию подкожным, интрадермальным, мукозальным, глазным, внутриглазным или внутрисуставным путем указанной композиции, например, для восстановления или заполнения по меньшей мере одной ткани организма, нуждающейся в восстановлении или заполнении.

20. Композиция по п.19, отличающаяся тем, что используется в способе лечения, восстановления или заполнения по меньшей мере одной ткани организма, нуждающейся в восстановлении или заполнении, и, например, ткани организма, выбранной из тканей, принадлежащих голосовым связкам, мышцам, связкам, сухожилиям, слизистым оболочкам, половым органам, костям, суставам, глазам, коже или их любой комбинации, и в частности, коже, хрящу, синовиальной оболочке, кожной ране или также поверхности глаза.

21. Композиция по п. 17 или 18 для применения в способе лечения остеоартрита или восстановления дефекта хряща, например, путем инъекции в биологическую жидкость, например, синовиальную жидкость, или после смешивания с биологической жидкостью, например, кровью, и имплантации в хрящ.

22. Медицинское устройство, например, медицинский имплант, отличающийся тем, что включает или состоит из композиции по любому из пп. 16-21.

23. Способ получения матрицы по любому из пп. 1-15, включающий
контактирование карбоксилакилхитозана с по меньшей мере одним сшивающим агентом, причем контактирование предпочтительно выполняют в щелочной фазе;
сшивание карбоксилакилхитозана с помощью сшивающего агента;
получение матрицы, включающей сшитый карбоксилакилхитозан.

24. Способ получения матрицы, включающей карбоксиалкилхитозан, предпочтительно по

любому из пп. 1-15, совместно сшитый с другим биополимером, и предпочтительно гиалуронатом, включающий

контактирование смеси карбоксиалкилхитозана и другого биополимера, и предпочтительно гиалуронана, с по меньшей мере одним сшивающим агентом, причем контактирование предпочтительно осуществляют в щелочной фазе;

сшивание карбоксиалкилхитозана и другого биополимера, и предпочтительно гиалуронана, с помощью сшивающего агента;

получение матрицы из совместно сшитых карбоксиалкилхитозана и другого биополимера, и предпочтительно гиалуронана.