(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292322 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.27

(22) Дата подачи заявки
2021.02.10

(51) Int. Cl. ***C08J 3/24*** (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01)
C07H 5/06 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

(54) НОВЫЙ СПОСОБ СИНТЕЗА ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **RU2020106398; 20156732.8**
(32) **2020.02.11**
(33) **RU; EP**
(86) **PCT/EP2021/053204**
(87) **WO 2021/160667 2021.08.19**

(71) Заявитель:
НОВОКАЙЗОЛ СА (CH)

(72) Изобретатель:
Каргаполов Юрий, Фоменко Владислав (RU)

(74) Представитель:
Кузнецова С.А. (RU)

(57) Изобретение направлено на новый сшитый хитозан, препараты, композиции на его основе и варианты его применения. В частности, настоящее изобретение относится к наночастицам и композициям на их основе, применимым в качестве активных средств и систем доставки по меньшей мере для одного биоактивного средства.

202292322 A1

202292322 A1

НОВЫЙ СПОСОБ СИНТЕЗА ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к получению хитозана, в частности, наночастиц из хитозана, препаратов, композиций на его основе и к вариантам их применения, в частности, в области химии, биологии, медицины и материаловедения.

Уровень техники

Биополимеры являются перспективными материалами в качестве носителей различных лекарственных средств и других активных веществ вследствие их биосовместимости, биоразложения и нетоксичности при введении. При подходящей химической модификации эти полимеры могут обеспечивать лучшие материалы для систем доставки лекарственных средств, где активные вещества могут являться как низкомолекулярными соединениями (малыми молекулами), так и высокомолекулярными соединениями (макромолекулами). Наноструктурированные носители лекарственных средств обеспечивают доставку высокомолекулярных соединений, таких как нуклеиновые кислоты и белки (*Advances in Polymer Science. Chitosan for Biomaterials I. Volume Editors: R. Jayakumar, M. Prabaharan, R.A.A. Muzzarelli. Springer Heidelberg Dordrecht London New York 2011 DOI 10.1007/978-3-642-23114-8*).

Хитозан является одним из наиболее перспективных биополимерных вариантов для создания наночастиц. С одной стороны, он имеет привлекательные природные свойства, такие как мукоадгезивность, биосовместимость и низкая токсичность, способность к биоразложению и образованию комплексов и, с другой стороны, высокая упорядоченность структуры и наличие гидроксильных и аминогрупп в нем представляют высокие перспективы для селективной модификации полимера.

Таким образом, эти свойства хитозана привлекали внимание для разработки растворов для доставки лекарственных средств (*Bhattarai et al., 2010, Advanced Drug Delivery Reviews, 62 83–99. doi: 10.1016 / j.addr.2009.07.019*).

Хотя хитозан имеет несколько подходящих характеристик, которые делают его превосходным носителем, применение немодифицированного хитозана ограничено из-

за его низкой растворимости в физиологических условиях. Для преодоления этого ограничения были разработаны многие различные химические модификации хитозана (*Kritchenkov et al., 2017, Russ. Chem. Rev., 86, 231–239. http://dx.doi.org/10.1070/RCR4636; Chuanet al., 2019, Adv. Colloid Interface Sci., 268, 25–38.; Jiang, H.-L.; Xing et al., 2018, Curr. Org. Chem., 22, 668–689. DOI: 10.2174/1385272821666170926163544; Layek, B.; Singh, J. 8—Chitosan for DNA and gene therapy. In Chitosan Based Biomaterials Volume 2; Jennings, J.A., Bumgardner, J.D., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2017; pp. 209–244*).

Структура хитозана предусматривает возможность его модификации рядом различных способами. Для повышения гидрофобности амиды хитозана могут быть легко получены из жирных кислот, производных стерола, урокановой кислоты, производных карбоновых кислот, содержащих имидазоловый фрагмент, и т. п. В качестве альтернативы, вторичные амины хитозана могут быть образованы с помощью алкильных заместителей различных структур, производных пиридина, спермидина и других путем алкилирования или восстановительного аминирования посредством соответствующих оснований Шиффа. Для повышения гидрофильности амиды хитозана можно получать из аминокислот, в том числе серосодержащих аминокислот, лактобионовой кислоты, тиогликолевой кислоты и т. п. Кроме того, вторичные амины хитозана можно получать с помощью различных сахаров, полиэтиленимина и его производных. Синтез производных полиэтиленгликоля путем пэгилирования является особенно популярным. Производные хитозана, полученные в соответствии с данными способами, имеют повышенную способность к формированию наночастиц, в частности, с полиэлектролитами, такими как нуклеиновые кислоты, и могут иметь измененные фармакологические свойства. (*Mao et al., 2010, Advanced Drug Delivery Reviews, 62, 12–27 doi:10.1016/j.addr.2009.08.004*).

Наночастицы хитозана могут быть образованы по сути необратимым образом посредством химического сшивания, которое включает образование ковалентных связей с применением различных реагентов для катализа такого сшивания (*Bhattarai et al., 2010*, выше). Традиционно глутаральдегид и формальдегид были первыми и наиболее популярными средствами, применяемыми для такого сшивания, однако в настоящее время они теряют свою популярность вследствие сложности удаления всех следов данных токсичных соединений, а также медленного гидролиза наночастиц, которые высвобождают данные альдегиды. Генепин в последнее время привлекает

внимание, но этот реагент является очень дорогостоящим и склонен сам по себе к полимеризации. Диэтилскварат (DES), диглицидиловый простой эфир этиленгликоля (EGDE) и блокированные диизоцианаты реагируют довольно медленно, и реакции с ними происходят главным образом при повышенных значениях температуры, что может обуславливать побочные реакции. Также существуют фотоактивируемые сшивающие реагенты: функциональные азиды, функциональные акрилаты, а также ферментоактивируемые средства – флоретиновая кислота и активированные хиноны. Например, у *Baoqiand et al., 2015 в Acta Biomaterialia, 22, 1742-7061 или Journal of Nanotechnology in engineering and medicine, 6, 041001-6* представлен способ получения сшитого хитозана с применением фотоинициируемой радикальной полимеризации хитозана в растворе после реакции хитозана с метакриловым ангидридом, что таким образом приводит к получению полиакриламидного соединения в форме геля или пены. Карбоксиметильные производные хитозана описаны в *El-sherbiny et al., 2009, European Polymer Journal 45, 1, 199-210*, где на первой стадии в хитозан вводят карбоксильную группу путем введения первичной спиртовой группы в хитозане в реакцию с монохлоруксусной кислотой в щелочной среде, а на второй стадии добавляют полимеры акрилоилглицина путем светоиндуцированной полимеризации, что приводит к получению хитозана без внутреннего сшивания. В патенте США № 5770712 описан способ получения сшитого хитозана путем объединения материала на основе хитозана с непрореагировавшими первичными аминогруппами с избыточным количеством полифункционального эпоксидного соединения, содержащего по меньшей мере две эпоксидные группы. В результате реакции сшивания хитозана с простым 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром образуются амино-этанольные сшитые производные хитозана, которые плохо растворимы при физиологическом pH (7 и выше).

Также можно применять для сшивания предварительно дериватизированный хитозан посредством образования оснований Шиффа с хитозаном, содержащим альдегидную группу, образования дисульфидных мостиков с хитозаном в предварительно функционализированном реагентами с концевой сульфгидрильной группой и присоединение по Михаэлю с хитозаном, предварительно обработанным функциональными акрилатами в присутствии слабого основания.

Все эти способы включают образование наночастиц, когда хитозан находится в растворе. В некоторых случаях все химические реакции доводятся до завершения в

жидкой фазе, в других они завершаются на более позднем этапе, например, во время или после высушивания распылением или лиофилизации. Во всех случаях важно, чтобы способ инициировался, и его основные этапы происходили с хитозаном, который находится в растворенном состоянии (*Jayakumar et al., 2011, выше)*. Необходимость в растворении хитозана создает значительные ограничения в отношении синтеза наночастиц. Это связано с тем, что хитозан является растворимым в воде только в форме солей в присутствии кислот. В этой форме происходит аномальное увеличение вязкости с повышением концентрации для любого раствора с содержанием хитозана выше 2%, числа, которое создает значительные ограничения в отношении возможного осуществления синтеза, а также возможности высокой пропускной способности реакционного устройства. В частности, пристенные эффекты при перемешивании вязкого раствора могут обуславливать значительную гетерогенность в отношении значений концентрации реагентов в реакционной емкости и, следовательно, гетерогенность в отношении свойств наночастиц. Другая сложность состоит в том, что высоконуклеофильные аминогруппы чаще всего применяют для сшивания, но в растворе они должны быть ионизированы для поддержания хитозана в растворенном состоянии.

Таким образом, существует необходимость в разработке новых путей синтеза для образования наночастиц хитозана эффективным и рентабельным способом.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к неожиданному открытию нового способа получения наночастиц из хитозана, который имеет преимущество, состоящее в устранении необходимости в растворении исходного материала на основе хитозана и, таким образом, потребности в образовании солей или применении разбавленных водных растворов кислот, или необходимости в диспергировании хитозана в растворе и, таким образом, потребности в эмульгировании, измельчении или других процедурах, которые могут иметь механическое влияние на целостность полимера. В частности, настоящее изобретение относится к новому способу сшивания хитозана, в частности, где в результате двух химических стадий образуются новые внутримолекулярные химические связи между различными частями молекулы хитозана. Согласно конкретному аспекту отсутствие растворения хитозана приводит к более эффективной скорости прохождения циклов синтеза (например, являющейся на приблизительно 2

порядка более высокой по сравнению со способами сшивания с применением растворенного хитозана).

Полученный продукт самопроизвольно образует наночастицы в конце второй стадии способа получения, причем эти наночастицы подходят для широкого диапазона применений. Также предпочтительным является, если полученный продукт,представляющий собой сшитый хитозан, имеет виды биологической активности, подобные стандартным линейным или разветвленным хитозанам, но неожиданно характеризуется некоторыми конкретными преимуществами в отношении стабильности в широком диапазоне биологически уместных значений pH или микробных условий и физико-химическими свойствами, которые обеспечивают более простую обработку.

В одном аспекте настоящего изобретения предусматривается способ получения сшитого хитозана по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к новому сшитому хитозану, в частности, к новому сшитому хитозану, который самопроизвольно образует наночастицы.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению и по меньшей мере один носитель.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Другой аспект настоящего изобретения относится к наночастицам, содержащим один сшитый хитозан по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к косметической композиции, содержащей по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к наполнителю для мягких тканей, содержащему по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению или композицию на его основе по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к раневой повязке, содержащей по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, предусматривается ткань для реконструкции, содержащая по меньшей мере один сшитый хитозан или композицию на его основе по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к сельскохозяйственной композиции, содержащей по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения композиции (например, такой как наполнитель для мягких тканей, раневая повязка или ткань для реконструкции), содержащей по меньшей мере один сшитый хитозан или наночастицы на его основе в соответствии с настоящим изобретением.

Другой аспект настоящего изобретения относится к сшитому хитозану по настоящему изобретению для применения в *in vivo* доставке лекарственного средства, *in vitro* культуре клеток или биологической ткани и в применениях, относящихся к тканевой инженерии.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, предусматривается среда для культивирования клеток или биологической ткани, содержащая по меньшей мере один сшитый хитозан или композицию на его основе по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к сшитому хитозану по настоящему изобретению для применения в предупреждении и/или лечении медицинского нарушения и, в частности, сердечно-сосудистых состояний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия, патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хрящей, костей, связок или синовиальной капсулы, патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы, заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит, нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные ожоги, язвы, геморрой, заболевания периодонта и зубов, повреждения твердой

мозговой оболочки, такого как после случайного повреждения или хирургии мозга и центральной нервной системы, злокачественных и доброкачественных новообразований, в частности, видов карциномы, видов саркомы, видов лимфомы и видов меланомы, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, опухолей или сосудистых патологий.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению сшитого хитозана по настоящему изобретению для получения фармацевтического состава для предупреждения и/или лечения медицинского нарушения и, в частности, сердечно-сосудистых состояний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия, патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хрящей, костей, связок или синовиальной капсулы, патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы, заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит, нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные ожоги, язвы, геморрой, заболевания периодонта и зубов, повреждения твердой мозговой оболочки, такого как после случайного повреждения или хирургии мозга и центральной нервной системы, злокачественных и доброкачественных новообразований, в частности, видов карциномы, видов саркомы, видов лимфомы и видов меланомы, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, опухолей или сосудистых патологий.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению сшитого хитозана по настоящему изобретению для получения среды для культивирования клеток, или биологического материала, или ткани для реконструкции.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения системы доставки лекарственного средства для биологически активного средства.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, предусматривается способ идентификации сшитого хитозана, получаемого посредством способа по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу предупреждения, лечения или снижения выраженности симптомов медицинского нарушения и, в частности, сердечно-сосудистых состояний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия, патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хрящей, костей, связок или синовиальной капсулы, патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы, заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит, нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные ожоги, язвы, геморрой, заболевания периодонта и зубов, повреждения твердой мозговой оболочки, такого как после случайного повреждения или хирургии мозга и центральной нервной системы, злокачественных и доброкачественных новообразований, в частности, видов карциномы, видов саркомы, видов лимфомы и видов меланомы, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, опухолей или сосудистых патологий, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одного сшитого хитозана по настоящему изобретению или фармацевтического состава на его основе.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению или композицию на его основе, например, в лиофилизированной форме.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору для получения наночастиц для инкапсуляции материала, например, биоактивного средства, лекарственного вещества, белка, антитела, сахарида, нуклеиновой кислоты или их комбинации, для предупреждения или лечения, содержащему по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению или композицию на его основе.

Описание графических материалов

На **фиг. 1** показано определение характеристик наночастиц сшитого хитозана в соответствии с настоящим изобретением (пример 2i). **A:** посредством микрофотографии окрашенного хитозана (3,2% сшитого хитозана 501 кДа), описанного

в примере 3; **B:** атомно-силовая микроскопия высушенных пленок сравнительного линейного хитозана (B1) и соответствующих наночастиц сшитого хитозана в соответствии с настоящим изобретением (B2), сшитые наночастицы хитозана в соответствии с настоящим изобретением при сильном увеличении (B3) и слабом увеличении (B4).

На **фиг. 2** показана интернализация наночастиц сшитого хитозана в соответствии с настоящим изобретением (пример 2i) в лейкоцитах мышей, измеренная с помощью флуоресцентной микроскопии, как описано в примере 4. **A:** граница лейкоцита; **B:** ядерная ДНК (Hoechst 33258, интенсивно синяя флуоресценция); **C:** эндоцитозированный меченый FITC сшитый хитозан (зеленая флуоресценция); **D:** смешанная синяя/зеленая флуоресценция (синяя: фоновая неспецифичная и/или неядерная ДНК в протоплазме; зеленая: эндоцитозированный меченый FITC сшитый хитозан).

На **фиг. 3** показана интернализация наночастиц сшитого хитозана в соответствии с настоящим изобретением (пример 2i) (**B**) в роговице мышей по сравнению со стандартным хитозаном (**A**), который остался на поверхности роговицы при FITC-FAM флуоресценции, как описано в примере 4. A: роговица; B: хитозан (ярко-зеленая флуоресценция).

На **фиг. 4** показан анализ с помощью масс-спектрометрии сравнительного несшитого стандартного хитозана (A1: общий ионный ток для положительных ионов) и (A2: область интересующих ионов (более низкое соотношение масса/заряд)); сшитого хитозана по настоящему изобретению (B1: общий ионный ток для положительных ионов) и B2 (область интересующих ионов (более низкое соотношение масса/заряд)), как описано в примере 3.

На **фиг. 5** представлены спектры, полученные при исследовании столкновений для соединения с соотношением масса/заряд = 180 при энергии удара 5 В (A) и 15 В (B) и для соединения с соотношением масса/заряд = 252 при энергии удара 5 В (C) и 15 В (D), и полученные при гидролизе лизоцима яйца (E), как описано в примере 3.

На **фиг. 6** представлены эффекты обработки сшитым хитозаном по настоящему изобретению (при 0,1% вес/вес или 0,05% вес/вес в воде) в отношении процесса прорастания семян яровой пшеницы в камере для проращивания **(A)** (появление

первичных корешков измеряли через 1 день, энергию прорастания измеряли через 3 дня; а прорастаемость через 7 дней) и в отношении увеличения роста (% увеличения по сравнению с контролем) надземных частей проростков яровой пшеницы в почвенном субстрате **(B)** (семена обрабатывали за 7 дней до посева), как описано в примере 6, по сравнению с контролем.

Подробное описание изобретения

Термин «степень сшивания», используемый в данном документе, означает количество функциональных групп, превращенных в связи, обеспечивающие сшивание или прививание, относительно общего количества функциональных групп, изначально присутствующих на хитозане, выраженное как процент.

Термин «алкил» при использовании отдельно или в комбинации с другими терминами предусматривает прямую или разветвленную цепь C_1-C_{50}алкила, который относится к одновалентным алкильным группам с 1-50 атомами углерода. Примером этого термина служат такие группы, как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 2,2-диметилпропил, н-гексил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, н-гептил, н-октил, н-нонил, н-децил, тетрагидрогеранил, н-додецил, н-тридецил, н-тетрадецил, н-пентадецил, н-гексадецил, н-октадецил, н-нонадецил и н-эйкозанил и т. п. Предпочтительно они включают C_1-C_9алкил, более предпочтительно C_1-C_6алкил, особенно предпочтительно C_1-C_4алкил, которые, аналогично, означают соответственно одновалентные алкильные группы с 1-9 атомами углерода, одновалентные алкильные группы с 1-6 атомами углерода и одновалентные алкильные группы с 1-4 атомами углерода. В частности, они включают C_1-C_6алкил.

Термин «алкенил» при использовании отдельно или в комбинации с другими терминами предусматривает прямоцепочечный или разветвленный C_2-C_{50}алкенил. Он может иметь любое доступное число двойных связей в любых доступных положениях, и конфигурация двойной связи может представлять собой (E)- или (Z)-конфигурацию. Примером этого термина служат такие группы, как винил, аллил, изопропенил, 1-пропенил, 2-метил-1-пропенил, 1-бутенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 2-этил-1-бутенил, 3-метил-2-бутенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, 4-пентенил, 4-метил-3-пентенил,

1-гексенил, 2-гексенил, 3-гексенил, 4-гексенил, 5-гексенил, 1-гептенил, 1-октенил, геранил, 1-деценил, 1-тетрадеценил, 1-октадеценил, 9-октадеценил, 1-эйкозенил и 3,7,11,15-тетраметил-1-гексадеценил и т. д. Предпочтительно они включают C_2-C_8алкенил, более предпочтительно C_2-C_6алкенил. Помимо прочего, особенно предпочтительными являются винил или этенил (-CH=CH_2), н-2-пропенил (аллил, -CH_2CH=CH_2), изопропенил, 1-пропенил, 2-метил-1-пропенил, 1-бутенил, 2-бутенил и 3-метил-2-бутенил и т. д.

Термин «алкинил» при использовании отдельно или в комбинации с другими терминами предусматривает прямоцепочечный или разветвленный C_2-C_{50}алкинил. Он может иметь любое доступное число тройных связей в любых доступных положениях. Примером этого термина служат такие группы, как алкинильные группы, которые могут характеризоваться углеродным числом 2-50 и необязательно иметь двойную связь, такие как этинил (-C≡CH), 1-пропинил, 2-пропинил (пропаргил: -CH_2C≡CH), 2-бутинил, 2-пентен-4-инил и т. д. В частности, они включают C_2-C_8алкинил, более предпочтительно C_2-C_6алкинил и т. д. Предпочтительно они включают C_2-C_6алкинил, который означает группы с 2-6 атомами углерода и по меньшей мере 1 или 2 участками алкинильной ненасыщенности.

Термин «арил» означает ненасыщенную ароматическую карбоциклическую группу с 6-14 атомами углерода с одним кольцом (*например*, фенил) или множеством конденсированных колец (*например*, инденил, нафтил). Арил включает фенил, нафтил, антрил, фенантрил и подобные.

Термин «C_1-C_6алкиларил» означает арильные группы с C_1-C_6алкильным заместителем, в том числе метилфенил, этилфенил и т. д.

Термин «арил-C_1-C_6алкил» означает C_1-C_6алкильные группы с арильным заместителем, в том числе 3-фенилпропанил, бензил и т. д.

Термин «гетероарил» означает моноциклическую гетероароматическую, или бициклическую, или трициклическую гетероароматическую группу с конденсированными кольцами. Конкретные примеры гетероароматических групп включают необязательно замещенные пиридил, пирролил, пиримидинил, фурил, тиенил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, пиразолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил,

1,3,4-оксадиазолил, 1,3,4-триазинил, 1,2,3-триазинил, бензофурил, [2,3-дигидро]бензофурил, изобензофурил, бензотиенил, бензотриазолил, изобензотиенил, индолил, изоиндолил, 3H-индолил, бензимидазолил, имидазо[1,2-a]пиридил, бензотиазолил, бензоксазолил, хинолизинил, хиназолинил, фталазинил, хиноксалинил, циннолинил, нафтиридинил, пиридо[3,4-b]пиридил, пиридо[3,2-b]пиридил, пиридо[4,3-b]пиридил, хинолил, изохинолил, тетразолил, 5,6,7,8-тетрагидрохинолил, 5,6,7,8-тетрагидроизохинолил, пуринил, птеридинил, карбазолил, ксантенил или бензохинолил.

Термин «C_3-C_8циклоалкил» означает насыщенную карбоциклическую группу с 3-8 атомами углерода, имеющую одно кольцо (*например*, циклогексил) или несколько конденсированных колец (*например*, норборнил). C_3-C_8циклоалкил включает циклопентил, циклогексил, норборнил и т. д.

Термин «гетероциклоалкил» означает C_3-C_8циклоалкильную группу в соответствии с определением выше, в которой не более 3 атомов углерода замещены гетероатомами, выбранными из группы, состоящей из O, S, NR, при этом R определен как водород или метил. Гетероциклоалкил включает азетидинил, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тетрагидрофуранил и т. д.

Если иное не ограничено определением отдельного заместителя, термин «замещенный» означает группы, замещенные 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из «C_1-C_6алкила», «C_2-C_6алкенила», «C_2-C_6алкинила», «C_3-C_8циклоалкила», «гетероциклоалкила», «C_1-C_6алкиларила», «C_1-C_6алкилгетероарила», «арил-C_1-C_6алкила», «гетероарил-C_1-C_6алкила», «C_1-C_6алкилциклоалкила», «C_1-C_6алкилгетероциклоалкила», «амино», «аминосульфонила», «аммония», «ациламино», «аминокарбонила», «арила», «гетероарила», «сульфинила», «сульфонила», «алкокси», «алкоксикарбонила», «карбамата», «сульфанила», «галогена», тригалогенметила, циано, гидрокси, меркапто, нитро и т. д.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает носитель, состоящий из материала, который не является биологически или иным образом нежелательным и не является особенно токсичным.

Термин «носитель» означает любой компонент, присутствующий в фармацевтическом составе, отличный от активного средства, и, таким образом, включает разбавители,

связующие, смазывающие средства, разрыхлители, наполнители, красители, смачивающие или эмульгирующие средства, буферные средства для поддержания pH, консерванты и т. д.

Термин «биоактивное средство» используется для описания любого средства с биологической активностью, которое можно включать в композицию на основе привитого полимера по настоящему изобретению. Оно может быть природным, синтетическим, полусинтетическим или их производным и может включать гидрофобные, гидрофильные, растворимые и нерастворимые соединения. Более конкретно, оно может представлять собой любое биоактивное средство, пригодное для лечения и/или, предупреждения, и/или диагностики состояний в любой терапевтической области, известной для млекопитающих, таких как животные и люди, в частности люди, которые включают без ограничения виды аритмии сердца, такую как фибрилляция предсердий, гипертензия, воспалительные состояния, нарушения или заболевания, в частности аутоиммунные и неаутоиммунные воспалительные состояния, в том числе патологии суставов и заболевания суставов (такие как ревматоидный артрит, остеоартрит и спондилоартрит), патологии глаз (такие как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы), заболевания соединительной ткани (такие как волчанка или полимиозит), нарушения состояния или повреждения кожи (такие как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или химической природы, солнечные ожоги), заболевания периодонта и зубов, геморрой, язвы, заболевания, которые поддаются генной терапии, заболевания, которые поддаются клеточной терапии, пластика твердой мозговой оболочки и восстановление твердой мозговой оболочки после хирургии мозга и центральной нервной системы, пластика нерва, боль, послеоперационная фистула и инфекция, травматологические заболевания, доброкачественные и злокачественные новообразования и инфекции. Биоактивные средства можно выбрать из макромолекулярного соединения или низкомолекулярного соединения, таких как пептиды, белки, олиго- и полинуклеотиды, противоинфекционные средства, антибиотики, противомикробные средства, противовирусные лекарственные средства, антибактериальные, противогрибковые лекарственные средства, факторы роста, ферменты, антигены, противоопухолевые лекарственные средства, противовоспалительные лекарственные средства, анестетики, антибластомные лекарственные средства, анальгетики, антикоагулянты, кровоостанавливающие лекарственные средства, клетки и антитела.

Термин «воспалительное расстройство или заболевание» означает все заболевания, которые включают воспаление и высвобождение или провоспалительных цитокинов в качестве основного или значимого механизма заболевания, такие как воспалительная болезнь кишечника, аллергия, астма, аутоиммунные заболевания, гепатит, воспаления других органов и связанные заболевания.
Термины «нарушения состояния кожи» или «кожные заболевания» включают повреждения кожи, при которых поверхность кожи имеет чувствительные углубления, не обязательно имеющие порез на своей поверхности, такие как возрастные повреждения кожи (например, морщины), раны и шрамы, такие как, например, акне или шрамы от краснухи. Эти заболевания дополнительно включают раны, шрамы, псориаз, акне, экзему и розацеа. Термин «раны» включает любую поврежденную ткань, например, после травмы или хирургического вмешательства. Раны у млекопитающих включают, например, ссадины, разрывы, ушибы, механические повреждения, колотые раны, разрезы на коже, хирургические раны, огнестрельные раны, термические раны, химические раны, солнечные ожоги, укусы и укусы насекомых и вызванные воздействием электрического тока раны. Они дополнительно включают хронические нарушения состояния кожи, такие как язвы и другие воспалительные состояния кожи.

Термин «патологии или нарушения состояния глаз» представляет собой нарушения или повреждения, которые поражают глаз и, в частности, роговицу. Такие нарушения включают эрозию роговицы, царапины на роговице, щелочные ожоги роговицы, возрастную макулярную дегенерацию, экзофтальм, виды катаракты, цитомегаловирусный ретинит, цветовую слепоту, косоглазие, диабетический макулярный отек, плавающие помутнения в глазах и вспышки в глазах, глаукому, кератоконус, «ленивый глаз», слабое зрение, глазную гипертензию, отслоение сетчатки, подергивание века, увеит, сухой кератоконъюнктивит (KCS) и синдром сухого глаза.

Термин «суставные патологии или патологии суставов» включает остеоартрит, артритную боль, ревматоидный артрит, боль, вызванную инфекцией и воспалением, случаи травм колена, которые приводят к повреждению хрящей, случаи травм, связанные с повреждением тазобедренного сустава, кости, связки или синовиальной капсулы.

Термин «ткань для реконструкции» означает биологическую ткань (эндогенную или экзогенную) или синтетический или полусинтетический материал, пригодный для

заживления поврежденных тканей тела, таких как эпидермальная, нервная, хрящевая или костная ткани, а также для конструирования органоидов для биологического тестирования, такого как описанное в *Takebe et al., 2019, Science, 364, 6444, 956-959, DOI: 10.1126/science.aaw756.*

При использовании в данном документе «лечение» и «осуществление лечения» и т. п. обычно означают получение необходимого фармакологического, и/или физического, и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в отношении предупреждения или частичного предупреждения заболевания, его симптома или состояния и/или может быть терапевтическим в отношении частичного или полного излечения заболевания, состояния, симптома или отрицательного эффекта, относящегося к заболеванию. Термин «лечение», используемый в данном документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности человека, и включает: (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого еще не было диагностировано его наличие; (b) подавление развития заболевания, т. е. задержка его развития; или облегчение симптомов заболевания, т. е. вызывание ремиссии заболевания и/или его симптомов или состояний, такое как улучшение или излечения повреждения.

Термин «субъект», используемый в данном документе, означает млекопитающих. Например, млекопитающие, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают человека, приматов и одомашненных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, лошади и, в частности, скаковые лошади, лабораторные грызуны и т. п.

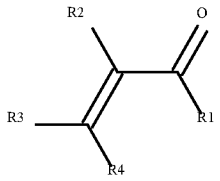
Термин «эффективность» лечения в соответствии с настоящим изобретением можно измерить на основании изменений в течение заболевания в ответ на применение в соответствии с настоящим изобретением. Например, эффективность лечения в соответствии с настоящим изобретением может быть измерена на основе устранения или снижения клинических признаков или симптомов или, более предпочтительно, измерений биомаркеров заболевания, таких как цитокины, факторы роста или другие сигнальные молекулы и их рецепторы, маркеры клеточных поверхностей, профили количества клеток и экспрессии генов.

Способ получения хитозана в соответствии с настоящим изобретением и определение его характеристик

В соответствии с конкретным аспектом, предусматривается способ получения сшитого хитозана, предусматривающий следующие стадии:

a) предоставление хитозана и обеспечение набухания указанного хитозана в растворителе;

b) ацилирование аминогрупп указанного хитозана с помощью акрилового соединения формулы (I):



(I) ,

где R_1 представляет собой галоген или любую другую уходящую группу, которая при удалении обеспечивает ацилирование аминогруппы, такую как 3-гидроксибензотриазоловый сложный эфир, ангидрид (включая смешанные ангидриды), N-гидроксисукцинимид, пентахлорфенол, 2-нитро-4-сульфофеноловые сложные эфиры и другие подобные уходящие группы; R_2, R_3 и R_4 независимо выбраны из H, необязательно замещенного алкила (например, C_1-C_6алкила), необязательно замещенного алкенила (например, C_2-C_6алкенила), необязательно замещенного алкинила (например, C_3-C_6алкинила), необязательно замещенного циклоалкила (например, C_3-C_8циклоалкила), необязательно замещенного циклоалкенила (например, C_4-C_8циклоалкенила), необязательно замещенного циклоалкинила (например, C_5-C_8циклоалкинила), необязательно замещенного гетероциклоалкила; необязательно замещенного арила (например, необязательно замещенного фенила), необязательно замещенного гетероарила и необязательно замещенного арил-C_1-C_6алкила, в частности бензила; причем термин «замещенный» означает группы, замещенные 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, -COOR', -NR'R", =O, -OR', -COR', -CONR'R", -SR', -SO_3R', -SO_2NR'R ", -SOR', -SO_2R', -NO_2 или -CN; или R_1 и R_2, или R_1 и R_3, или R_1 и R_4 вместе образуют необязательно замещенный 4-24-членный арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил (например, 6-24-членный арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил, такой как необязательно замещенный 8-24-членный арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил);

c) введение в реакцию продукта ацилирования со **стадии b)** в присутствии основания (аза-реакция Михаэля);

d) проведение очистки сшитого хитозана, полученного на **стадии c)** (например, от примесей солей и/или апротонного растворителя).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, растворитель, применяемый на **стадии a)** и/или **b)**, представляет собой протонный растворитель (такой как спирты или вода).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, свободные акриловые кислоты, которые образуются, если протонный растворитель (такой как спирты или вода) применяют на **стадии a)** и/или **b)** для проведения способа, вымывают из реакционной смеси перед проведением **стадии c)**.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, растворитель представляет собой апротонный растворитель, в частности, на **стадии a)**, и/или **b)**, и/или **c)**.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, если апротонный растворитель применяют на **стадии c)**, то дополнительную **стадию f)** последующего ацилирования не проводят.

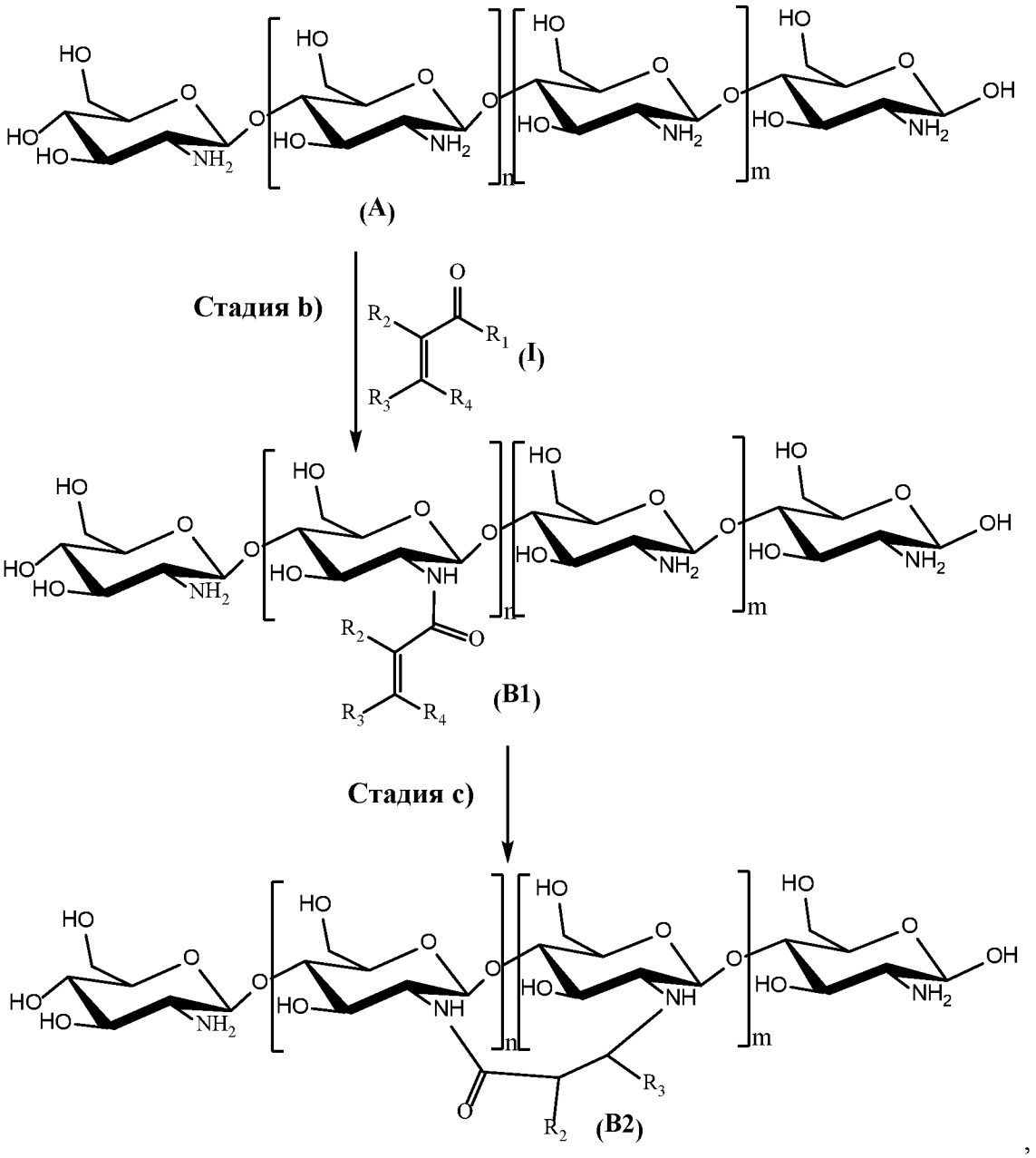
В соответствии с конкретным вариантом осуществления, стадию a) проводят при комнатной температуре.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, группы R3 или R4, а также R2 ацилированного продукта со **стадии b)** будут вступать в реакцию с первичными аминогруппами каркаса глюкозамина с получением сшивки между глюкозаминами. Реагирующие группы будут зависеть от конкретного акрилового соединения. Например, для акриловых и метакриловых кислот группы, реагирующие с первичными аминогруппами каркаса глюкозамина, представляют группы R3 или R4. Однако, если группы R3 и R4 заменены атомами галогена, тогда группы R2 будут реагировать с первичными аминогруппами каркаса глюкозамина.

В соответствии с дополнительным конкретным вариантом осуществления, это сшивание приводит к образованию наночастиц.

В соответствии с конкретным аспектом, способ по настоящему изобретению можно схематически изобразить следующей схемой 1:

Схема 1



где хитозан **(A)**, в котором m представляет собой целое число от 1 до 12500, а n представляет собой целое число от 1 до 12500, сначала предоставляется в набухшем состоянии в апротонном растворителе при комнатной температуре, а затем аминогруппы указанного хитозана ацилируют с помощью акрилового соединения **(I)**, и полученный продукт ацилирования **(B1)** затем подвергают реакции в присутствии основания с получением сшитого хитозана **(B2)**, который затем можно выделять с

помощью очистки с получением очищенного сшитого хитозана по настоящему изобретению.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, хитозан можно обеспечивать в набухшем состоянии, даже в растворенном состоянии, в протонном растворителе, но в этом случае могут происходить побочные реакции гидролиза ацилирующего средства, и это следует принимать во внимание при расчете загрузок реакции. Кроме того, в этом случае будет необходимо промывать ацилированный хитозан, полученный на **стадии b)**, для удаления продуктов гидролиза ацилирующего средства перед этапом аза-реакции Михаэля на **стадии c)**.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, хитозан предоставляется при отсутствии воды, и стадию ацилирования проводят при отсутствии воды. Отсутствие воды предпочтительно приводит к большим выходам и предотвращает образование побочных продуктов.

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом, стадию ацилирования проводят при отсутствии воды. В этом случае апротонный растворитель можно применять как среду реакции или сверхкритическую жидкость. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, апротонный растворитель представляет собой полярный апротонный растворитель, такой как, например, выбранный из DMF и DMSO. В конкретном варианте осуществления сверхкритическая жидкость может быть сверхкритическим растворителем, таким как диоксид углерода, оксид азота(I), фреоны (хлор(бром)(фтор)углеводороды), который применяют для предоставления в реакционную среду ацилирующего средства, а затем реакцию ацилирования проводят после удаления сверхкритического растворителя из реакционной среды, например, путем понижения давления ниже критического значения.

В соответствии с дополнительным, особенно предпочтительным аспектом, стадию ацилирования проводят в безводной апротонной среде.

В соответствии с конкретным аспектом, полярный апротонный растворитель выбран из диметилформамида (DMF), диметилацетамида, ацетонитрила (MeCN), N-метилпирролидона, диметилсульфоксида (DMSO) или их смеси.

В соответствии с другим конкретным аспектом дихлорметан, дихлорэтан, хлороформ и другие хлор(фтор)углеводороды также можно применять в качестве полярного апротонного растворителя, но при проведении аза-реакции Михаэля **стадии c)** данные растворители следует отгонять прямо перед предоставлением основания. Желательно выполнять такую отгонку при значениях температуры не выше 60°C, что является приемлемым при атмосферном давлении для большинства указанных растворителей. Если применяли высококипящий растворитель, отгонку следует выполнять при пониженном давлении.

В соответствии с другим конкретным аспектом, простые эфиры и сложные эфиры, кетоны также можно применять в качестве растворителей для реакционных стадий a) – c) в безводных условиях, но реакции в таких растворителях будут протекать медленнее. Например, можно применять диэтиловый эфир, диизопропиловый эфир, метил-трет-бутиловый эфир, метилацетат, этилацетат, пропилацетат, бутилацетат, ацетон, метилэтилкетон и диэтилкетон.

В соответствии с конкретным аспектом настоящего изобретения, **стадию b)** ацилирования можно проводить любым способом, описанным в контексте ацилирования глюкозамина с помощью акрилоилхлорида (*Zhang et al., 2017, Biomacromolecules, 1, 3, 778 – 786; Bu et al., 2017, Advances, 7, 76, 48166 – 48175*), или способами, описанными как пригодные для ацилирования аминогруппы, такими как способы, в которых применяют i) карбодиимид; ii) азид; iii) смешанные ангидриды; iv) активированный сложный эфир, и v) другие способы, описанные ниже.

Известные способы ацилирования с применением карбодиимида с образованием промежуточных енольных сложных эфиров можно применять на стадии b) (WO 2019/60740; *Hao-Bin et al., 2018, Carbohydrate Polymers, 196, 359 – 367*). Если N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC) можно применять в качестве конденсирующего средства, 1-этил-(3-(3-диметиламино)пропил)карбодиимида гидрохлорид и N-циклогексил-N'-(2-морфолиноэттил)карбодиимида метил-п-толуолсульфонат (номер регистрации по CAS: 2491-17-0) будут предпочтительными.

Известные способы ацилирования с применением азидов можно применять на стадии b) (*Honzl et al., 1961, Coll. Czech. Chem. Commun., 26, N. 9, 2333-2344*).

Известные способы ацилирования с применением смешанных ангидридов можно применять на стадии b) (*Wieland et al., 1951, Ann. Chem., 572, N3, 190-194; Belleau et al., 1968, J. Amer. Chem. Soc., 90, N 6, 1651-1652; Gorecka et al., 1978, Synthesis, N 6, 474-476; Diago-Meseguer et al., 1980, Synthesis, N 7, 547-551; Leplawy etal., 1960, Tetrahedron, 11, N 1, 39-51*). Также возможно применение внутренних ангидридов для ацилирования, например, малеинового ангидрида (*Liwschitz et al. 1957, Journal of the Chemical Society, 4399; Kang, et al., 2014, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2, 10, 2364-2367; US 2016/200730; Sanchez et al., 2010, Anna European Journal of Organic Chemistry, 13, 2600 – 2606*).

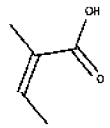
Известные способы ацилирования с применением активированных сложных эфиров посредством образования активированных амидов можно применять на стадии b), такие как способ на основе карбонилдиимидазола (*Paul et al., 1960, J. Amer. Chem. Soc., 82, N 17., 4596-4600*), способ на основе цианометилового сложного эфира (*Schwyzer et al., 1955, Helv. Chim. Acta, 38, N 1, 80-83)*, способ на основе тиофенильного сложного эфира (*Wieland et al., 1951, выше*), способ на основе замещенного фенильного сложного эфира (*Gross et al., 1983, Mayenhofer, editors. Moscow: Mir., P. 421*), сложноэфирный способ на основе гетероароматических соединений вместе со способом на основе карбодиимида (*Jakubke et al., 1966, A. Chem. Ber., 99, N 8, 2419-2429; Taschner et al., 1965, Ann. Chem., 690, 177-181*), сложноэфирный способ на основе производных гидроксиламина вместе со способом на основе карбодиимида (*Losse et al., 1964, Ann. Chem., 678, 185-190; Nefkens et al., 1961, Amer. Chem. Soc., 83, N 5, 1263; Anderson et al., 1963, Ibid, 85, N 19, 3039; König et al., 1970, Chem. Ber., 103, N 3, 788-798*), способы переэстерификации (вариант сложноэфирного способа) (*Sakakibara, 1965, Bull. Chem. Soc. Jap., 38, N 1, 1979-1984; Fujino et al., 1968, Ch. Chem. Pharm. Bull., 16, N 5, 929-932; Gudkov et al., 1978, 48, 9, 2146; Devadas et al., 1979, Ind. J. Chem., B16, N 11, 1026-1027*).

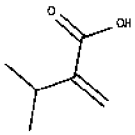
Можно применять другие известные способы ацилирования на стадии b), такие как способ на основе кетенимина (*Stevens et al., 1958, J. Amer. Soc., 80, N 15, 4069-4071*); способ на основе производных ацетилена (*Arens, 1955, Rec. Trav. Chim., 74, N 6, 759-770; Gais 1978, Aktivierungsmittel für Peptidsynthesen J. Angew. Chem. Int. Ed,90(8), 625-626 https://doi.org/10.1002/ange.19780900808*); способ с применением производных цианамида (*Losse et al., 1960, Ann. Chem., 636, 144-149*); синтез с применением солей изоксазолия (*Woodwart et al., 1961, J. Amer. Chem. Soc., 83, N 4, 1010-1012*); синтез с

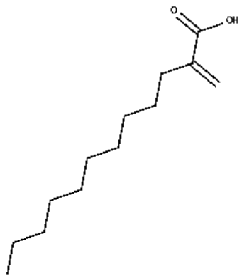
применением имидоилгалогенидов (*Bergmann et al., 1936, J. Biol. Chem., 115, N 3, 93-611*).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, акриловое соединение формулы (I) может представлять собой кислоту, галогенид кислоты, активный сложный эфир (например, 3-гидроксибензотриазоловый сложный эфир, N-гидроксисукцинимид, пентахлорфенол, 2-нитро-4-сульфофеноловые сложными эфиры и сложные эфиры с другими подобными уходящими группами), их ангидрид или смеси.

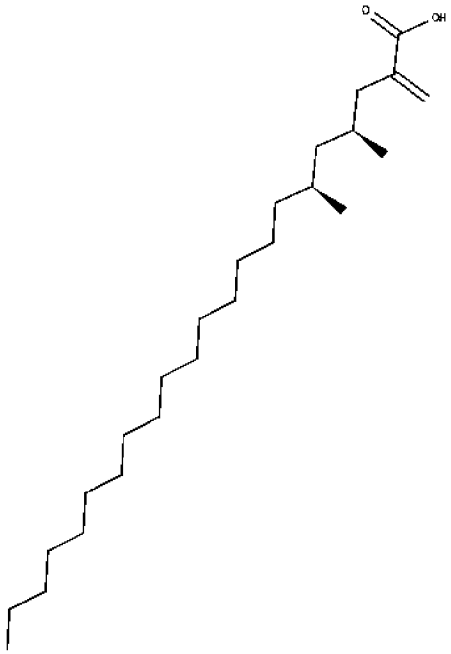
В соответствии с конкретным вариантом осуществления, акриловое соединение формулы (I) выбрано из следующей группы:



(ангеликовая кислота, номер регистрации по CAS: 565-63-9);  (2-изопропилакриловая кислота, номер регистрации по CAS: 4465-04-7);

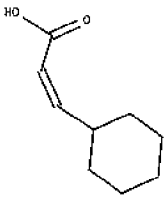


(2-метилендодекановая кислота, номер регистрации по CAS: 52756-

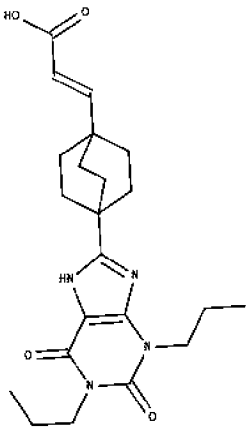


21-5); (4S,6S)-4,6-диметил-2-метилендокозановая

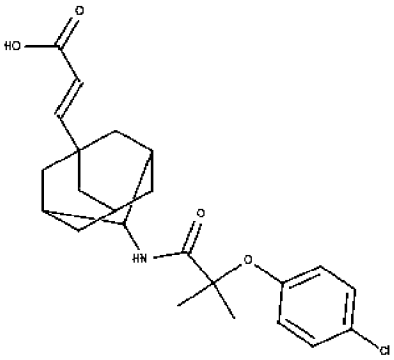
кислота;



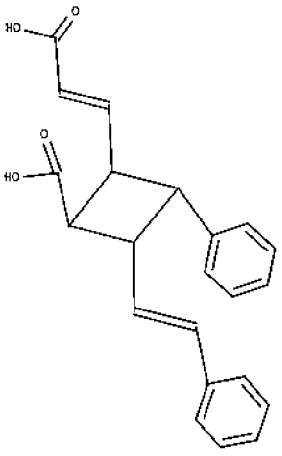
((Z)-3-циклогексилпропеновая кислота, номер регистрации по CAS: 673456-32-1);



((E)-3-[4-(2,6-диоксо-1,3-дипропил-2,3,6,7-тетрагидро-1H-пурин-8-ил)-бицикло[2.2.2]окт-1-ил]акриловая кислота, номер регистрации по CAS: 340021-16-1);

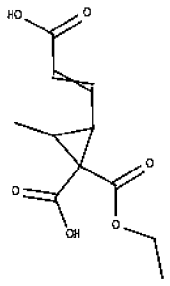


((2E)-3-((E)-4-{[2-(4-хлорфенокси)-2-метилпропаноил]амино}-1-адамантил)акриловая кислота;

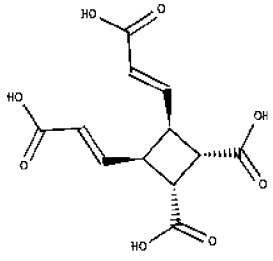


(3-(2-карбокси-4-фенил-3-стирилциклобутил)акриловая кислота,

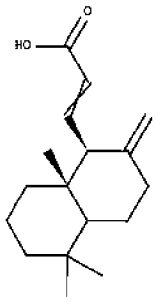
номер регистрации по CAS: 34271-87-9);



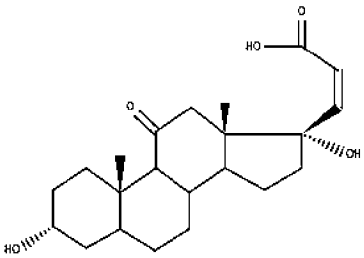
(3-метил-2-акриловая кислота-(1)-циклопропанкарбоновая кислота-(1)-карбоновая кислота-(1)-этиловый сложный эфир, номер регистрации по CAS: 91971-88-9);



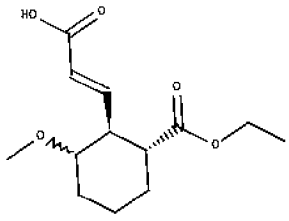
(3t,4t-дикарбоксициклобутан-1,2c-ди-(транс-акриловая кислота), номер регистрации по CAS: 55011-62-6);



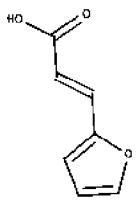
коронадиен;



(номер регистрации по CAS: 1247-53-6)

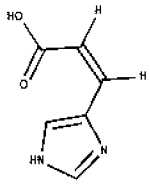


((E)-3-(2t-этоксикарбонил-6ξ-метоксициклогексан-1r-ил)акриловая кислота, номер регистрации по CAS: 2960-11-4); коричная кислота; 4-метилкоричная кислота; п-нитрокоричная кислота; кофеиновая кислота;

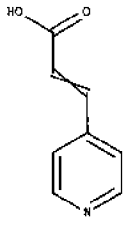


(3-(фур-2-ил)кротоновая кислота; 3-(2-фурил)акриловая кислота, номер

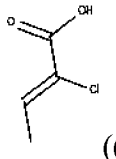
регистрации по CAS: 539-47-9);



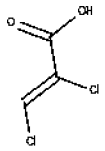
((Z)-уроковая кислота; номер регистрации по CAS: 7699-35-6);



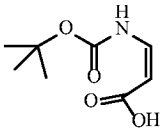
(3-(4-пиридинил)-2-пропеновая кислота; 3-(пиридин-4-ил)акриловая кислота, номер регистрации по CAS: 5337-79-1); аргутинозиды A-I;



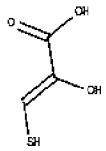
((Z)-2-хлорбут-2-еновая кислота, номер регистрации по CAS: 53993-41-2);



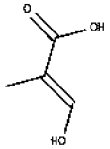
((2Z)-2,3-дихлорпроп-2-еновая кислота, номер регистрации по CAS: 3533-68-4);



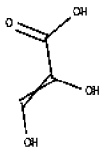
цис-N-трет-бутилоксикарбонилдегидро-β-аланин, номер регистрации по CAS: 151292-68-1);



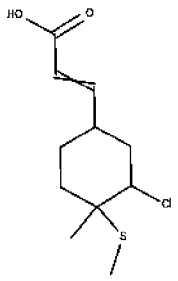
(2-гидрокси-3-меркаптоакриловая кислота, номер регистрации по CAS: 6228-60-0;



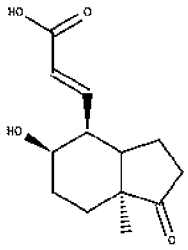
гидрокси(мет)акриловая кислота;



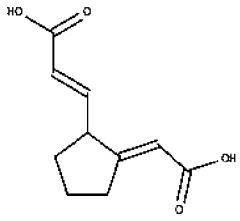
(дигидроксиакриловая кислота, номер регистрации по CAS: 2702-94-5);



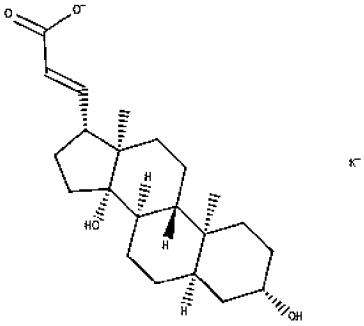
(Reaxys ID 2721331);



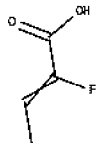
(номер регистрации по CAS: 64361-31-5);



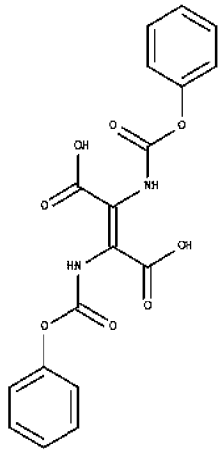
3-(2-карбоксиметиленциклопентил)акриловая кислота;



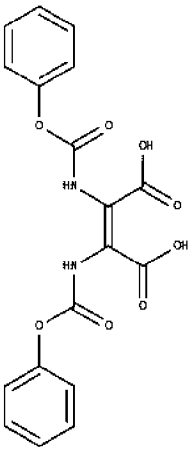
(номер регистрации по CAS: 78727-62-5);



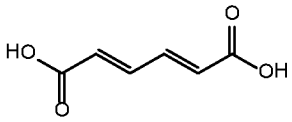
(фторбутеновая кислота, номер регистрации по CAS: 2365-87-9);



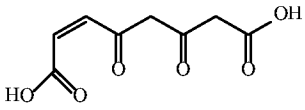
((E)-2,3-бис(феноксикарбониламино)бут-2-ендиовая кислота);



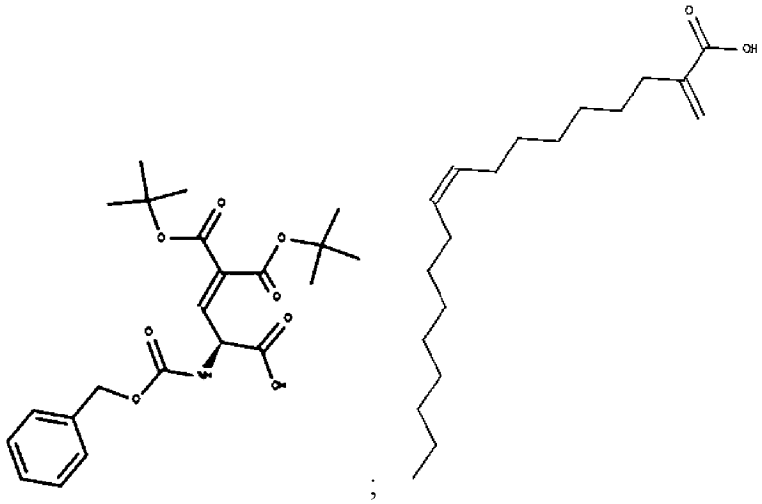
((Z)-2,3-бис(феноксикарбониламино)бут-2-ендиовая кислота);



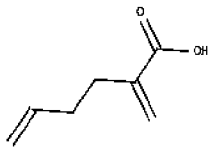
(2E,4E)-2,4-гексадиендиовая кислота (муконовая кислота), малеиновая кислота; фумаровая кислота;



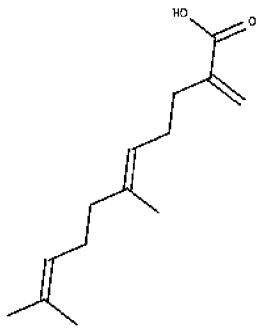
(малеилацетоуксусная кислота, номер регистрации по CAS: 5698-52-2); (E)-4-(метиламино)-4-оксобут-2-еновая кислота, акриловое производное глутаминовой кислоты



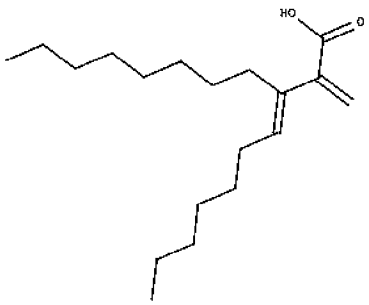
; (2-метилен-9(Z)-октадеценовая кислота, номер регистрации по CAS: 33780-98-2);



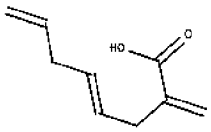
(2-метилен-5-гексеновая кислота (2-метиленгекс-5-еновая кислота),



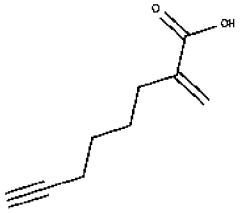
номер регистрации по CAS: 73505-05-2); ((E)-6,9-диметил-2-метилиденундека-5,9-диеновая кислота, номер регистрации по CAS: 1580541-76-9);



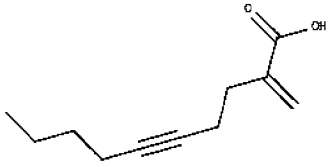
(2-(цис-7,8-гексадеценил)акриловая кислота);



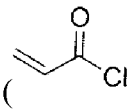
((E)-2-метиленокта-4,7-диеновая кислота);



(2-метилен-7-октиновая кислота, номер регистрации по CAS: 127559-93-7); и

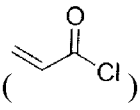


(2-метилен-5-дециновая кислота, номер регистрации по CAS: 150254-20-9); и ацилгалогенид (R_1 = галоген), в частности, акрилоилхлорид



) или метакрилоилхлорид.

В соответствии с дополнительным конкретным вариантом осуществления, акриловое соединение представляет собой ацилгалогенид (R_1= галоген), в частности, акрилоилхлорид (



) или метакрилоилхлорид.

В соответствии с конкретным аспектом, если акриловое соединение, применяемое на **стадии b)** ацилирования, представляет собой галогенид кислоты, то важно избегать

присутствия воды в реакционной системе, поскольку будет происходить нежелательный побочный процесс гидролиза галогенида кислоты с образованием акриловой кислоты, а это может приводить к функционализации наночастиц карбоксильными группами во время реакции присоединения по Михаэлю свободной акриловой кислоты к аминогруппам хитозана.

В соответствии с конкретным аспектом, акриловое соединение, применяемое на **стадии b)** ацилирования, представляет собой хлорид кислоты (например, ацилхлорид). В соответствии с одним аспектом, применение хлорида кислоты предпочтительно приводит к образованию хлороводорода, который не препятствует следующей стадии реакции в присутствии избытка основания и легко удаляется в форме солей при диализе.

Важно отметить, что ацилирование аминов с помощью галогенидов карбоновой кислоты приводит к получению одного эквивалента кислоты, которая будет образовывать соль с непрореагировавшим амином и снижать выход способа по настоящему изобретению. Таким образом, если галогенид кислоты применяют на **стадии b)** ацилирования, то добавление эквивалентного количества основания, предпочтительно ненуклеофильного основания (например, триэтиламина) применяют на **стадии b)** для нейтрализации этой кислоты.

В соответствии с конкретным аспектом, если акриловое соединение, применяемое на **стадии b)** ацилирования, представляет собой ангидрид кислоты, то способ по настоящему изобретению также включает стадию промывания реакционной среды и удаления образовавшейся кислоты, чтобы избежать присутствия воды в реакционной системе перед проведением **стадии c)**. В частности, образовавшуюся кислоту можно вымывать из продукта ацилирования с помощью растворителя через фильтр, или путем диализа относительно растворителя, или путем суспендирования продукта ацилирования в растворителе и центрифугирования с отбрасыванием надосадочной жидкости.

В соответствии с другим конкретным аспектом, при применении конденсирующих средств (например, DCC) для ацилирования с помощью свободной кислоты, необходимо тщательно контролировать завершение реакции, и предпочтительно, тем не менее, включать стадию промывания в качестве меры предосторожности. Например,

если конденсирующее средство, такое как DCC, применяют в качестве конденсирующего средства, образуются побочные продукты, такие как дициклогексилмочевина, при реакции ацилирования, которые необходимо удалять из реакционной массы перед проведением следующей стадии, так чтобы они не вовлекались в сшивание, которое обеспечивает наночастицы в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с другим конкретным аспектом, на **стадии c)** основание применяют в молярном избытке, достаточном для образования щелочной среды, которая нейтрализует галогеноводород, образованный на **стадии b)**. Обычно молярный избыток основания составляет по меньшей мере 10% молярного избытка (например, приблизительно 20-40% молярного избытка), что будет соответствовать по меньшей мере 1-3 молярным избыткам относительно аминогрупп полученного продукта ацилирования со **стадии b)**.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, сшитый хитозан, полученный на **стадии c)**, можно очищать на **стадии d)** с помощью стандартных методик удаления примесей солей и/или оставшегося апротонного растворителя, например, на стадиях диализа или промывания с помощью растворителя, такого как вода или метиленхлорид, метанол, этанол, ацетон и т. д., с последующим центрифугированием или применением сверхкритических растворителей, например, с применением диоксида углерода, в котором образованные наночастицы на основе сшитого хитозана являются нерастворимыми, или путем удаления апротонного растворителя посредством выпаривания, а затем вымывания побочных продуктов из продукта, представляющего собой сшитый хитозан, с помощью растворителя через фильтр, например, фильтр с порами не более 40 мкм. В соответствии с более конкретным вариантом осуществления, предпочтительно можно применять гидрофобные элементы фильтра с мелкой пористостью, такие как полипропилен или PTFE, поскольку их гидрофобность создает дополнительные препятствия для проникания гидрофильных наночастиц хитозана через них.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, очищенный сшитый хитозан, полученный на **стадии d)**, можно высушивать, например, на необязательной дополнительной **стадии e)** высушивания.

В соответствии с конкретным аспектом, основание, применяемое на **стадии c)** для реакции присоединения по Михаэлю, представляет собой по сути чистое ненуклеофильное основание, в частности, по сути не содержащее вторичных аминов.

В соответствии с конкретным аспектом, **стадию c)** присоединения по Михаэлю проводят в протонном растворителе, таком как вода. В этом случае необходимо регулировать степень омыления, например, путем измерения как количества образовавшихся карбоксильных групп, так и образовавшихся аминогрупп на этапе ацилирования. Точным способом для карбоксильных групп, поскольку их концентрация обычно на один-два порядка ниже, и разница в количестве аминогрупп может быть в пределах погрешности эксперимента, будут ЯМР, ИК-спектроскопия или кислотно-основное титрование, например, описанные в *Glazunov et al., 1999, 25(3), 216-219; Brugnerotto et al., 2001, Polymer, 42, 3569-3580,* или *Kubota, et al., 2000, Carbohydrate Research, 324, 268–274*. Однако протонный растворитель на этой стадии может быть предпочтительным, если получение наночастиц на основе омыленного сшитого хитозана является желательным в конце **стадии c)**, или если планируется повторение стадии ацилирования, как описано ниже, с целью насыщения наночастиц карбоксильными функциональными группами, а затем достижение сшивания в избытке. Фактически, если наночастицы насыщены карбоксильными функциональными группами, то выполняют стадию омыления. Затем повторяют стадии ацилирования и аза-реакции Михаэля с последующим омылением. Если происходит спонтанное омыление на стадии аза-реакции Михаэля в протонном растворителе, это не является нежелательным, поскольку омыление затем проводят в любом случае, и тот факт, что оно частично происходит при аза-реакции Михаэля, не будет проблемой.

В соответствии с другим конкретным аспектом, **стадию c)** присоединения по Михаэлю проводят в отсутствие воды, чего можно достигать путем применения апротонного растворителя в качестве реакционной среды или путем применения основания в качестве растворителя.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, стадию реакции присоединения по Михаэлю проводят в щелочной среде, так что для каждой амидной связи, образованной на стадии ацилирования, образуется один эквивалент вторичного амина после реакции присоединения по Михаэлю, что приводит к тому, что даже в случае сшивания вех аминогрупп по меньшей мере половина аминогрупп остается

доступной для образования солей. Это можно проверить с помощью кислотно-основного титрования, ИК- и ЯМР спектрометрии, как описано в *Glazunov et al., 1999, 25(3), 216-219; Brugnerotto et al., 2001, Polymer, 42, 3569-3580,* или *Kubota, et al., 2000, Carbohydrate Research, 324, 268–274*. В соответствии с конкретным аспектом, реакция внутримолекулярного присоединения внутри макромолекулы хитозана является значительно более предпочтительной по сравнению с межмолекулярными реакциями из-за статистических и пространственных факторов, вследствие чего она обеспечивает высокую степень сшивания.

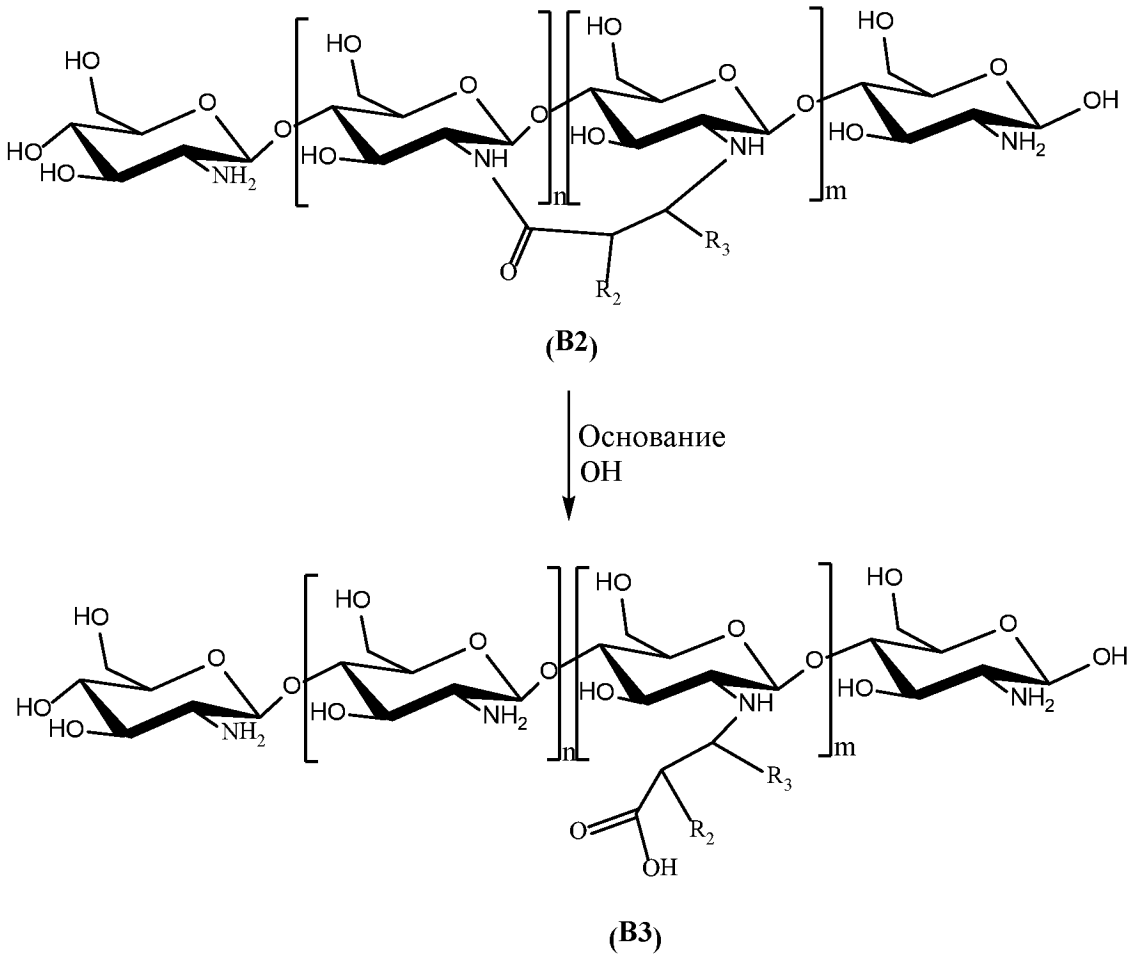
Полученные наночастицы после **стадии c)** реакции присоединения по Михаэлю можно подвергать восстановлению (например, путем введения в реакцию со сложными гидридами металлов, дибораном, цианоборогидридом и другими производными борогидрида) с целью превращения амидных групп во вторичные амины и повышения возможной степени ионизации наночастиц. Возможная степень ионизации наночастиц зависит от числа аминогрупп. Чем больше присутствует аминогрупп, тем больше возможность образования солей и, соответственно, возникновения ионизации. Степень ионизации можно оценивать с помощью кислотно-основного титрования, ИК- и ЯМР-спектрометрии.

В соответствии с дополнительным аспектом, продукт, представляющий собой сшитый хитозан, полученный на **стадии c)** или **стадии d)**, или соответствующий высушенный продукт, полученный на **стадии e)**, можно подвергать **стадии f)** омыления при щелочных условиях (например, в присутствии водного основания в избытке) в протонном растворителе с целью повышения растворимости наночастиц на основе сшитого хитозана в более широком диапазоне pH, например, при физиологических слабощелочных условиях (например, приблизительно pH составляет 7,2-7,3). Если растворитель, применяемый на **стадиях c) или d)**, не обеспечивает омыление (например, такой как DMF), омыление необходимо проводить после **стадии d)** очистки в растворителе, который обеспечивает омыление, или путем повторного суспендирования высушенного сшитого хитозана в растворителе, который обеспечивает омыление, после **стадии e)**, например, в простых эфирах в качестве растворителей.

Например, на этой дополнительной **стадии f)** водный раствор основания добавляют в продукт, полученный на **стадиях c) или d)**, в молярном избытке по сравнению с

количеством ацилирующего средства, применяемого на **стадии b)**, таком как, например, приблизительно в 10 раз или 100 раз выше молярного количества таких ацилирующих средств. Как показано схематически на **схеме 2** ниже, амидные группы сшитого хитозана **(B2)** гидролизуются в соответствующие карбоксильные группы в продукте **(B3)**, доступные для образования соответствующих солей.

Схема 2



(B2)

(B3)

Это обеспечивает восстановление половины аминогрупп в сшитом хитозане в виде первичного амина, причем вторая половина становится вторичными аминами, которые теперь алкилируются пропионовой кислотой (или замещенной пропионовой кислотой). Например, омыление сшитого хитозана можно проводить путем добавления 1 моль водного раствора гидроксида натрия при 50 градусах Цельсия в течение часа. Полученный продукт **(B3)** затем можно снова подвергать **стадии b)** ацилирования, как показано схематически на **схеме 3a** и **схеме 3b** ниже, причем в этом случае ацилирование происходит при таких же условиях, при которых возможно

ацилирование как первичных (**схема 3a)** , так и вторичных (*de novo* ацилирование аминогрупп, полученных на стадиях b, c или f, **схема 3b)** аминогрупп**.** Полученный продукт **(B4)** затем снова подвергают реакции присоединения по Михаэлю на **стадии c)** для достижения сшивания всех аминогрупп и получения по сути полностью сшитого хитозана **(B5)**.

Схема 3a

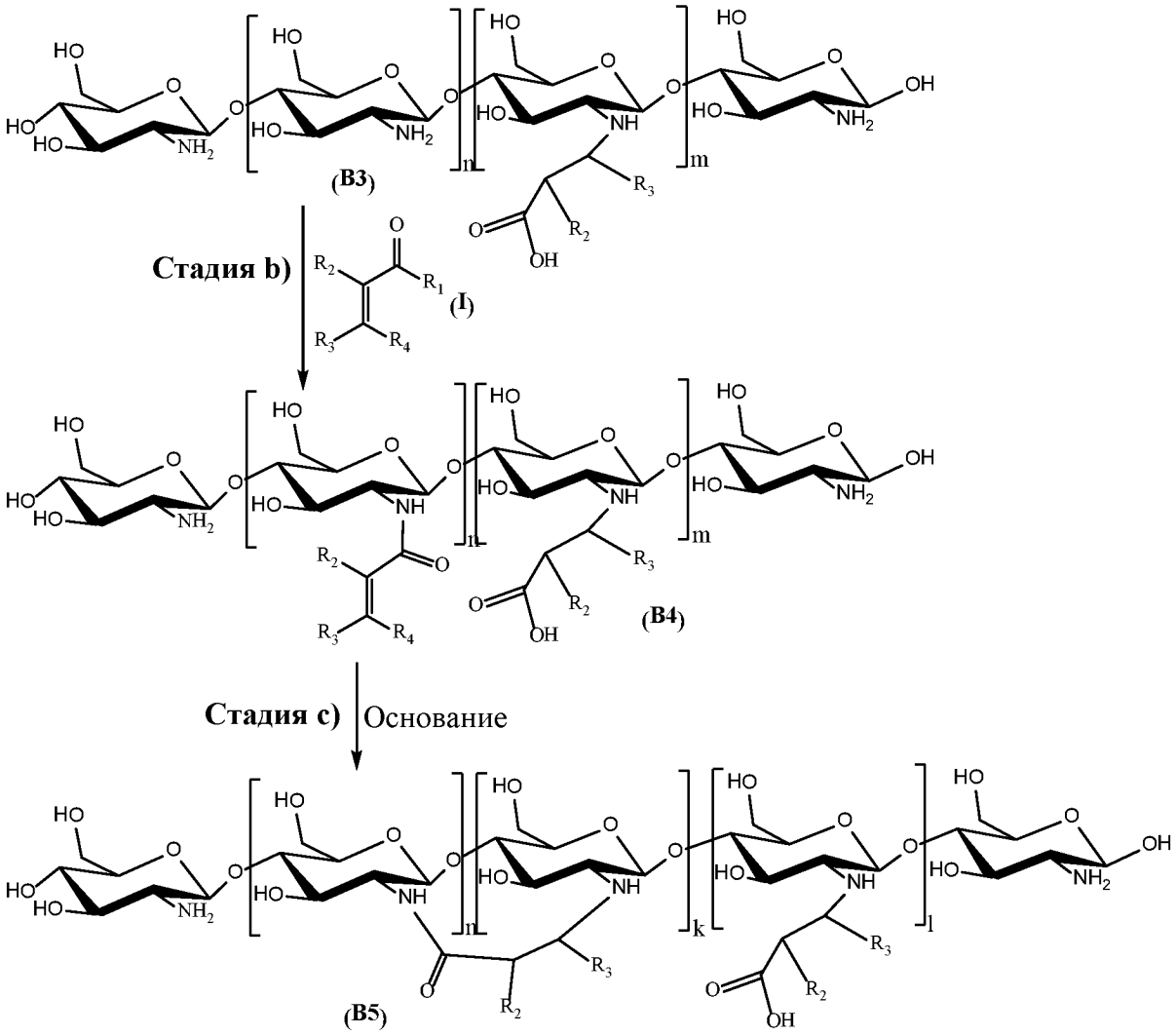
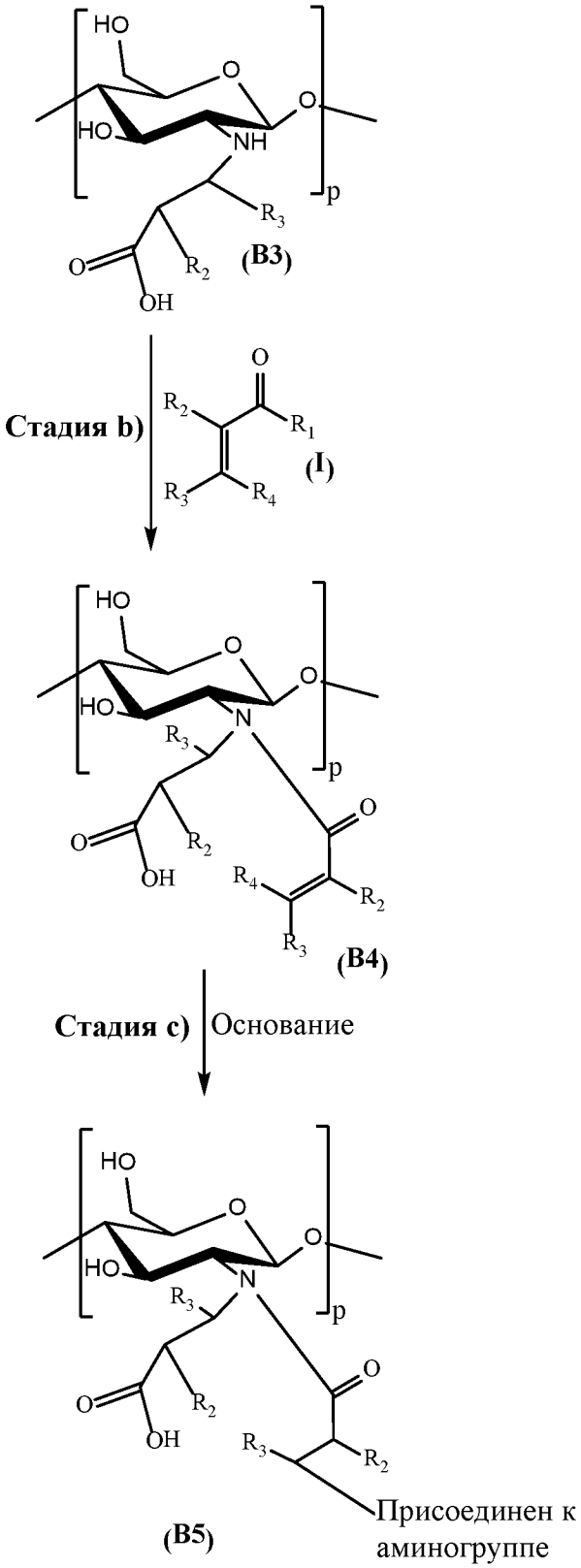


Схема 3b



В этом случае в полученном продукте внутренние соли образуются с карбоксильными группами, которые будут составлять половину исходного содержания аминогрупп,

присутствующих в конце первой **стадии c)** синтеза. В соответствии с конкретным аспектом, такой продукт будет содержать по сути такое же число карбоксильных групп, все вторичные и третичные аминогруппы, амидные функциональные группы (исключая начальные ацетиламиногликозидные фрагменты), т. е. такой продукт будет содержать полную внутреннюю соль, причем все карбоксильные группы будут сбалансированы аминогруппами.

Без ограничения какой-либо теорией можно считать, что если аминогруппы присутствуют в исходном хитозане, предоставленном на **стадии a),** то при условии их полной дериватизации на **стадии b)** X аминогрупп ацилируется ацилирующим средством и, таким образом, X аминогрупп будет подвергаться аза-реакции Михаэля с ацильными фрагментами, привитыми к хитозану на **стадии c)**. После омыления амидных групп, образованных на **стадии b)**, присутствующих в продукте со **стадии c)**, подвергнутых **стадии f)** омыления, X первичных аминогрупп восстанавливается, X карбоксильных групп доступны от акриловой кислоты, применяемой при ацилировании, и еще остается X вторичных аминогрупп, полученных на **стадии c)**. Таким образом, при повторной полной дериватизации путем ацилирования X восстановленных первичных аминогрупп может дополнительно ацилироваться (вторичные аминогруппы, которые были получены на **стадии c)**, вероятно, могут быть ацилированными, но это менее вероятный процесс). Затем при повторении **стадии c)** вторичные аминогруппы, полученные ранее на **стадии c)**, вступают в аза-реакцию Михаэля с образованием X третичных аминогрупп.

Кроме того, проведение омыления второй раз снова восстанавливает X первичных аминогрупп, и остается X третичных аминогрупп, которые не подвергаются омылению, а образуется X карбоксильных групп. Таким образом, общее число карбоксильных групп будет составлять 2X, первичных аминогрупп – X, третичных аминогрупп – X, и полимер будет становиться электронейтральным и образовывать внутренние соли.

Если полная дериватизация проводится в третий раз, тогда необходимо только X/2 ацилирующего средства, поскольку только X аминогрупп остаются способными вступать в эти реакции, и все эти аминогруппы являются первичными. Таким образом, после осуществления третьей последовательности дериватизации (стадии b) – c)) и омыления (стадия f) получают только 2,5X карбоксильных групп, 1,5X третичных аминогрупп, 0,5X первичных аминогрупп, и полимер будет становиться анионным с

избытком 0,5X карбоксильных групп. Таким образом, повторение этой последовательности реакций будет каждый раз обеспечивать увеличение числа карбоксильных групп с шагом 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03175 и т.д. Присутствие карбоксильных групп можно легко подтвердить с помощью инфракрасной спектроскопии или кислотно-основного титрования, а также с помощью масс-спектрометрии.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, количество щелочи, применяемой на необязательной **стадии f)** омыления, является эквимолярным количеством относительно амидных групп, полученных на первой **стадии c)/d) или e)** реакции, подлежащих омылению, и характеризуется мольным избытком не более 10 раз.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, по меньшей мере одну последовательность **стадий b) – c) (или d)/e))** осуществляют со **стадией f)** омыления в качестве завершения присоединения по Михаэлю перед повторным подверганием воздействию в ходе осуществления новой последовательности **стадий b) – c) (или d)/e))** ацилирования.

В соответствии с дополнительным конкретным вариантом осуществления, осуществляют последовательность из приблизительно 2-6 **стадий a) – f)** реакции.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, осуществление последовательности **стадий a) – f)** реакции повторяют один или два раза.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, после каждого осуществления последовательности **стадий a) – f)** растворимость сшитого хитозана обеспечивается в более широком диапазоне pH, и свойства чистого хитозана могут быть модифицированы, например, в отношении микротрофики и проникания в клетки. Таким образом, эти свойства предпочтительно можно регулировать, в зависимости от числа осуществляемых последовательностей реакций, и полученные наночастицы на основе сшитого хитозана могут быть пригодными для доставки интересующих соединений.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, катионные (например, катионные пептиды, такие как последовательности, обогащенные аргинином,

орнитином или лизином) или нейтральные в отношении электрического заряда вещества можно доставлять с помощью сшитого хитозана по настоящему изобретению.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, сшитый хитозан по настоящему изобретению можно применять для составления данных соединений для защиты их от разложения (например, вследствие протеолиза), или от связывания нежелательных веществ (например, антител или других макромолекул), или для обеспечения медленного высвобождения растворимых веществ из данных соединений.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, биологически активный материал может быть интегрирован в образованные наночастицы, либо после первой **стадии b)** ацилирования, либо первой **стадии c)** присоединения по Михаэлю. В соответствии с дополнительным конкретным вариантом осуществления, биологически активный материал может быть или ковалентно присоединен, или адсорбирован, или зафиксирован в форме солей, или инкапсулирован в наночастицы на основе сшитого хитозана в соответствии с настоящим изобретением.

В случае если стадию омыления выполняют, ковалентное сшивание биологически активного средства будет разрушаться, но ионные связи с биологически активным средством могут образовываться в солях образованного сшитого хитозана.

В качестве альтернативы, наночастицы могут быть пропитаны биологически активными веществами, стойкими к реагентам, применяемым на **стадиях a) – f)**, когда осуществляют последовательность этих стадий, такими как кластеры тяжелых элементов для создания рентгеноконтрастных наночастиц.

Кроме того, в качестве альтернативы, многофункциональные неустойчивые биологически активные вещества предпочтительно вводят путем диффузии в наночастицы на основе сшитого хитозана по настоящему изобретению после их синтеза, или с применением клик-химии, способов иммобилизации ферментов, белков, нуклеиновых кислот и антител.

В соответствии с конкретным аспектом, интеграция биологически активного материала в наночастицы хитозана в соответствии с настоящим изобретением может достигаться путем пропитки продукта, полученного на **стадии b)** или **c)**, желаемым биологически активным материалом. Например, раствор биологически активного материала в

апротонном растворителе можно добавлять в продукт, полученный на **стадии b)**, перед проведением **стадии c)** присоединения по Михаэлю. В качестве альтернативы, продукт, представляющий собой ацетилированный хитозан, полученный на **стадии b)**, можно растворять в растворителе, подходящем для дальнейших условий синтеза.

Пропитку можно проводить без растворения сшитого хитозана по настоящему изобретению.

С учетом пропитки сшитого хитозана по настоящему изобретению биологически активным средством, биологически активное средство/вещество можно растворять в полярном апротонном растворителе или в любом другом. Если применяют протонный растворитель, тогда перед аза-реакцией Михаэля его желательно удалять и высушивать пропитанный продукт. Для пропитки можно применять сверхкритические жидкости, описанные в *Weidner 2018, The Journal of Supercritical Fluids, 134, 220-227 https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.024; Duarte et al., 2007, The Journal of Supercritical Fluids, 42 (3), 373-377 https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.01.007,* которые обеспечивают крайне высокую степень и высокое качество пропитки. Также можно применять способы электрофореза, описанные в *Boccaccini et al., 2010, J. R. Soc. Interface, 7, S581–S613 https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0156.focus; Pishbin et al., 2013, Acta Biomaterialia, 9(7), 7469-7479,* или способ «генной пушки», описанный в *Zhao et al., 2012, PLoS One, 7(10): e46765. doi: 10.1371/journal.pone.0046765*, если пропитку средством можно ускорить кулоновскими методами. Например, водный раствор биологически активного материала, такого как антибиотик, можно смешивать с водным раствором хитозана, ацилированного после **стадии b)**, и подвергать выпариванию с азеотропной перегонкой воды, сушкой распылением, лиофилизацией и другими способами высушивания, чтобы получить ацилированный хитозан, пропитанный биологически активным материалом, в сухом состоянии. Затем высушенный материал подвергают избытку ненуклеофильного основания для деионизации аминогрупп хитозана и затем полученную смесь подвергают **стадии c)** реакции присоединения по Михаэлю.

В соответствии с дополнительным аспектом, хитозан, предоставленный на стадии a), имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 2000 кДа, в частности, от приблизительно 150 до 2000 кДа.

В соответствии с другим дополнительным аспектом, хитозан, предоставленный на стадии a), характеризуется степенью деацетилирования от приблизительно 100% (как в глюкозамине) до приблизительно двух деацетилированных фрагментов на макромолекулу, что, например, для хитозана (хитина) с молекулярной массой 300 кДа составляет приблизительно 0,14%.

Подходящий хитозан, который можно применять в качестве исходного материала в способе по настоящему изобретению, может иметь различное происхождение, в том числе природное (животное или грибковое), в частности, из панциря краба и креветки, экзоскелета насекомых, высших грибов, культур одноклеточных грибов. Также можно применять химически или ферментативно синтезированный хитозан.

В соответствии с дополнительным аспектом, обеспечивают набухание хитозана, предоставленного на **стадии a)**, в течение от приблизительно 5 минут до приблизительно 1 дня, предпочтительно в апротонном растворителе.

В соответствии с другим дополнительным аспектом, стадию b) деацетиленирования проводят при температуре от приблизительно −70°C (начало реакции) до приблизительно +150°C (завершение реакции), предпочтительно от приблизительно +2°C (начало реакции) до приблизительно +55°C (завершение реакции). Время реакции составляет от приблизительно 0,5 часа до 10 дней, предпочтительно приблизительно 2,5 часа при температуре от приблизительно +20 до приблизительно +30°C, предпочтительно при воздействии ультразвука в качестве средства перемешивания.

В соответствии с другим дополнительным аспектом, **стадию c)** присоединения по Михаэлю проводят при температуре от приблизительно −70°C (начало реакции) до приблизительно +150°C (завершение реакции), предпочтительно от приблизительно +20°C (начало реакции) до +55°C (завершение реакции). Время реакции составляет от приблизительно 0,5 часа до 10 дней, предпочтительно приблизительно 15-18 часов при приблизительно +20°C и приблизительно 6 часов при приблизительно +55°C, предпочтительно при воздействии ультразвука в качестве средства перемешивания.

В соответствии с другим дополнительным аспектом, стадию высушивания сшитого хитозана проводят посредством сублимационной сушки на **стадии e)**.

В соответствии с другим дополнительным аспектом, необязательную дополнительную **стадию f)** омыления проводят при температуре от приблизительно 0°C (начало реакции) до приблизительно +140°C (завершение реакции), предпочтительно от приблизительно +20°C (начало реакции) до приблизительно +55°C (завершение реакции). Время реакции составляет от приблизительно 0,5 часа до 10 дней, предпочтительно приблизительно 2-6 часов при +55°C, предпочтительно при воздействии ультразвуков в качестве средства перемешивания.

В конкретном варианте осуществления наночастицы в соответствии с настоящим изобретением спонтанно образуются из материала, полученного на **стадиях b) и c)** способа по настоящему изобретению. Данные частицы являются крайне стабильными в течение длительного времени. Например, 2% раствор при комнатной температуре является стабильным в течение по меньшей мере года и в течение по меньшей мере нескольких лет в сухом состоянии.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, предусматривается способ получения системы доставки лекарственных средств для биоактивного средства, предусматривающий стадию проведения способа по настоящему изобретению, где биоактивное средство добавляют на **стадии b), c), d) или e)**.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, предусматривается способ получения системы доставки лекарственных средств для биоактивного средства, предусматривающий стадию:

- предоставления сшитого хитозана по настоящему изобретению во влажном или сухом состоянии;

- предоставления биоактивного средства, подлежащего доставке;

- растворения биоактивного средства в растворителе или сверхкритической жидкости;

- загрузки наночастиц указанного сшитого хитозана по настоящему изобретению путем либо пропитки сшитого хитозана раствором биоактивного средства, либо прямого введения в наночастицы с помощью электрофореза или ускорения электрического поля;

- сбора полученной таким образом композиции или наночастиц, загруженных биоактивным средством (например, лекарственным средством).

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, предусматривается способ идентификации сшитого хитозана, получаемого посредством способа по настоящему изобретению, при этом указанный способ включает стадии:

- предоставления хитозана, подлежащего определению характеристик, в растворителе (например, метиленхлориде или хлороформе);

- ацилирования указанного хитозана, как описано в данном документе (например, ацетилхлоридом или уксусным ангидридом), при интенсивном перемешивании, например, при температуре от приблизительно 0°C до приблизительно 20°C, например, в течение приблизительно 30 минут;

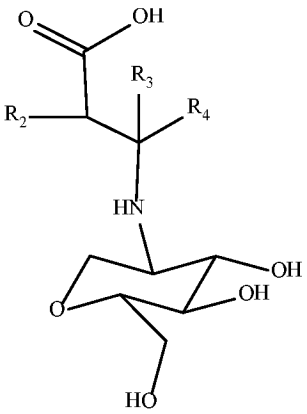
- нейтрализации реакционной среды основанием (например, диизопропилэтиламином в качестве ненуклеофильного основания);

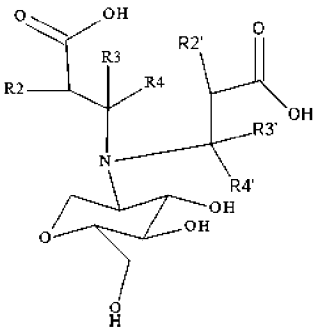
- выпаривания растворителей и промывания полученного нейтрализованного продукта;

- подвергания продукта кислотному гидролизу с обратным холодильником (например, с помощью предпочтительно 28% соляной кислоты в течение приблизительно 1-3 часов, например, приблизительно 2 часов);

- выпаривания реакционной смеси и повторного суспендирования гидролизованных продуктов в слабой кислоте, такой как уксусная кислота;

- определения присутствия или отсутствия продукта, выбранного из продукта, соответствующего формуле (III**a**) или соответствующего формуле (III**b**),

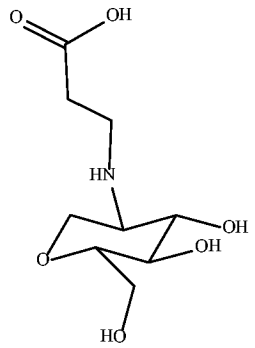




(IIIa); **(IIIb);**

где R_2-R_4 определены в данном документе, $R_{2'}$-$R_{4'}$ определены соответственно таким же образом, как и R_2-R_4 в данном документе, и при этом присутствие продукта формулы **(IIIa)** и/или (III**b**) указывает на наличие сшитого хитозана, полученного посредством способа согласно настоящему изобретению.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления в способе идентификации сшитого хитозана по настоящему изобретению определение присутствия или отсутствия продукта, соответствующего формуле (III**a**), можно проводить, например, путем анализа посредством масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, при этом, например, пик с соотношением масса/заряд =252,077 указывает на присутствие соединения, соответствующего формуле (III**a**), в частности формуле (II).



(II)

Способ идентификации сшитого хитозана, полученного посредством способа по настоящему изобретению, является весьма применимым, поскольку он позволяет отличать сшитый хитозан, полученный посредством способа согласно настоящему

изобретению, от сшитого хитозана, полученного посредством других способов, например посредством такого способа как, описанный в *Baoqiand et al., 2015*, выше или *El-sherbiny et al., 2009*, выше.

Хитозан и наночастицы на его основе в соответствии с настоящим изобретением

Сшитый хитозан по настоящему изобретению можно получать из легко доступных исходных материалов в соответствии со способом по настоящему изобретению. Будет понятно, что если представлены типичные или предпочтительные экспериментальные условия (т. е. значения температуры реакции, время, количество молей реагентов, растворители и т. д.), также можно применять другие экспериментальные условия, если не указано иное. Оптимальные условия реакции могут изменяться в зависимости от конкретных применяемых реагентов или растворителей, но такие условия могут быть определены специалистом в данной области техники с применением обычных процедур оптимизации.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, предусматриваются сшитый хитозан и наночастицы на его основе, полученные посредством способа по настоящему изобретению.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, предусматривается сшитый хитозан, характеризующийся более низкой вязкостью, чем исходный хитозан. Например, для 90% степени деацетилирования, 3,2% сшивания и концентрации хитозана 0,25%, раствор наночастиц в соответствии с настоящим изобретением является в 3 раза менее вязким, чем исходный хитозан, например, 2,4 сСт при 25°C и 1,82 сСт при 37°C для наночастиц на основе хитозана в соответствии с настоящим изобретением относительно 7,5 сСт при 25°C и 5,4 сСт при 37°C для соответствующего исходного хитозана.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, фармацевтически приемлемые соли сшитого хитозана по настоящему изобретению включают такие как ацетат, лактат, сукцинат, цитрат, малонат, фумарат, малеат, соль яблочной кислоты, а также других карбоновых, гидроксикарбоновых кислот, а также гидрохлорида, фосфата, сульфата и других неорганических солей.

Понятно, что молекулярную массу сшитого хитозана по настоящему изобретению можно подбирать путем выбора исходного материала, и его выбор будет зависеть от предполагаемой функции наночастиц в соответствии с настоящим изобретением и состава на их основе. Например, желаемая скорость разложения композиции на основе наночастиц, желаемая скорость высвобождения биоактивного средства, необязательно включенного в нее, терапевтическое состояние, подлежащее лечению, будут влиять на выбор молекулярной массы хитозана в качестве исходного материала.

В одном варианте осуществления молекулярная масса сшитого хитозана по настоящему изобретению составляет от приблизительно 2 кДа до 2 МДа.

В одном дополнительном варианте осуществления молекулярная масса сшитого хитозана по настоящему изобретению для применения в композиции смазывающего средства/наполнителя может быть выбрана от приблизительно 2 кДа до 2, предпочтительно от приблизительно 30 кДа и 1000 кДа.

В другом варианте осуществления молекулярная масса сшитого хитозана по настоящему изобретению для применения в системе доставки лекарственного средства или в качестве таковой может быть выбрана между приблизительно 2 кДа и 2 МДа, предпочтительно от приблизительно 30 кДа до 1000 кДа.

Композиции

В настоящем изобретении предусматриваются фармацевтические или терапевтические средства в виде композиций или медицинские устройства, содержащие их, и способы лечения субъекта, предпочтительно пациента-млекопитающего и наиболее предпочтительно пациента-человека, который страдает от медицинского нарушения и, в частности, сердечно-сосудистых состояний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия, патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хрящей, костей, связок или синовиальной капсулы, патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы, заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит, нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные

ожоги, язвы, геморрой, заболевания периодонта и зубов, повреждения твердой мозговой оболочки, такого как после случайного повреждения или хирургии мозга и центральной нервной системы, злокачественных и доброкачественных новообразований, видов карциномы, видов саркомы, видов лимфомы и видов меланомы, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, опухолей или сосудистых патологий, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, а также опухоли или сосудистой патологии.

В настоящем изобретении предусматриваются композиции на основе по меньшей мере одного сшитого хитозана по настоящему изобретению или композиция на его основе, пригодные для применения у людей, в ветеринарии или сельском хозяйстве.

В конкретном варианте осуществления сельскохозяйственные композиции в соответствии с настоящем изобретением применимы в качестве элиситора роста растений.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, сшитый хитозан по настоящему изобретению можно применять для получения самособирающихся структур, молекулярных машин, механизмов доставки, электронных устройств, композиционных материалов и смазывающих средств.

В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предусматривается фармацевтический состав, содержащий по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению или композиция на его основе для применения в качестве лекарственного препарата.

В другом конкретном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению представляют собой составы для парентерального введения.

В конкретном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению представляют собой инъекционные составы, такие как составы для внутрисуставного, внутриартериального, внутривенного, интрасиновиального, внутрикожного, подкожного, подслизистого, интерстициального, внутричерепного, внутриглазного, внутриопухолевого,
внутрижелудочного, кишечного, анального, внутрибрюшинного и внутримышечного введения.

В другом конкретном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению представляют собой составы для перорального введения.

В другом конкретном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению представляют собой составы для местного применения.

В другом конкретном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению представляют собой составы для введения в глаза.

В качестве альтернативы, в настоящем изобретении предусмотрены композиции, которые можно применять для других млекопитающих, отличных от человека, для таких же вариантов применения, как описанные выше.

В настоящем изобретении также предусматриваются композиции или медицинские устройства, пригодные для косметической, реконструктивной хирургии (например, реконструкции тканей), культуры клеток или биологической ткани (например, культуры стволовых клеток), материаловедения (например, поверхностных покрытий, таких как покрытие импланта, смазывающие композиции, композиции флокулянтов), диагностики (например, композиций для визуализации). Данные композиции дополнительно содержат соответствующие косметически приемлемые носители или питательные вещества для культивирования клеток или биологических тканей.

Композиции по настоящему изобретению предусматривают композиции наполнителя для мягких тканей, например, кожные и подкожные наполнители, содержащие по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению или наночастицы на его основе. Получение композиций наполнителя для мягких тканей на основе хитозана можно осуществлять, например, как описано в *Grant et al., 2018, Tissue Eng Part A., 24(13-14):1091-1098. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0385. Epub 2018 Mar 20.*

В конкретном варианте осуществления предусматриваются наночастицы сшитого хитозана по настоящему изобретению со средним размером в диапазоне от приблизительно 5 до 100 нм.

Другой аспект настоящего изобретения относится к раневой повязке, содержащей по меньшей мере один сшитый хитозан по настоящему изобретению.

В соответствии с дополнительным конкретным аспектом, настоящее изобретение относится к раневой повязке, содержащей пропитку из матрицы, содержащей гидроколлоид, гидрогель, альгинат, коллаген, целлюлозу, пену или ткань.

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать один или более фармацевтически приемлемых дополнительных ингредиентов, таких как алюминиевые квасцы, стабилизаторы, противомикробные средства, буферы, красители, ароматизаторы, вспомогательные вещества и т. п.

Композиции по настоящему изобретению вместе с традиционно применяемым вспомогательным веществом, носителем, разбавителем или наполнителем можно помещать в форму для фармацевтических композиций и можно применять в виде твердых веществ, таких как таблетки или заполненные капсулы, или жидкостей, таких как растворы, суспензии, мази, эмульсии, настойки, или капсул, заполненных ими, пленок или гелей, все из которых предназначены для перорального применения. Композиции также можно составлять в виде сухого продукта для разведения водой или другой подходящей средой-носителем перед применением.

Композиции по настоящему изобретению в виде жидких составов включают без ограничения водные или масляные суспензии, растворы, эмульсии, сиропы и настойки.

Данные жидкие препараты могут содержать добавки, включая без ограничения суспендирующие средства, эмульгаторы, неводные среды-носители и консерванты. Суспендирующие средства включают без ограничения сорбитовый сироп, метилцеллюлозу, глюкозу/сахарный сироп, желатин, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гель стеарата алюминия и гидрогенизированные пищевые жиры. Эмульгаторы включают без ограничения лецитин, сорбитанмоноолеат и аравийскую камедь. Консерванты включают без ограничения метил- или пропил-п-гидроксибензоат и сорбиновую кислоту. Диспергирующие или смачивающие средства включают без ограничения поли(этиленгликоль), глицерин, альбумин бычьей сыворотки, Tween®, Span®.

Дополнительные материалы, а также методики обработки составов и т. п. изложены в

The Science and Practice of Pharmacy (Remington: The Science & Practice of Pharmacy), 22nd Edition, 2012, Lloyd, Ed. Allen, Pharmaceutical Press, который включен в данный документ посредством ссылки.

Твердые композиции по настоящему изобретению могут быть представлены в форме таблеток или пастилок, составленных традиционным способом. Например, таблетки и капсулы для перорального введения могут содержать традиционные вспомогательные вещества, включая без ограничения связующие средства, наполнители, смазывающие средства, разрыхлители и смачивающие средства. Связующие средства включают без ограничения сироп, аравийскую камедь, желатин, сорбит, трагакант, суспензию крахмала и поливинилпирролидон. Наполнители включают без ограничения лактозу, сахар, микрокристаллическую целлюлозу, маисовый крахмал, фосфат кальция и сорбит. Смазывающие средства включают без ограничения стеарат магния, стеариновую кислоту, тальк, полиэтиленгликоль и диоксид кремния. Разрыхлители включают без ограничения картофельный крахмал и крахмалгликолят натрия. Смачивающие средства включают без ограничения лаурилсульфат натрия. Таблетки могут быть покрытыми в соответствии со способами, общеизвестным в данной области техники.

Сельскохозяйственные композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат ускорители роста растений, усилители прорастания семян, составы для удержания влаги и питательных веществ, усилители действия пестицидов, пролонгированные формы и стабилизаторы феромонов, мукоадгезивные формы инсектицидов, арахноцидов и препаратов против моллюсков.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления предусмотрена сельскохозяйственная композиция, содержащая от приблизительно 0,001 до приблизительно 99% вес/вес сшитого хитозана по настоящему изобретению, например от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,1% (вес/вес).

В другом конкретном варианте осуществления композиции или наночастицы в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат биоактивное средство, которое либо диспергировано в композиции на основе сшитого хитозана, либо ковалентно присоединено к ней.

В другом конкретном варианте осуществления композиции или наночастицы в соответствии с настоящим изобретением представлены в форме системы доставки биоактивного средства.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одно биоактивное вещество может присутствовать в количестве от приблизительно 0,001 до 20 вес. %, предпочтительно от приблизительно 0,01 до 10 вес. % в пересчете на общее количество композиции или наночастиц на основе сшитого хитозана в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с другим аспектом, композиции в соответствии с настоящим изобретением предусматривают среду для культивирования клеток или биологической ткани, содержащую сшитый хитозан или композицию на его основе. Данная среда для культивирования может дополнительно содержать питательные вещества для клеток, такие как глюкоза, витамины, факторы роста, ионы металлов и т. п.

В соответствии с другим аспектом, композиции в соответствии с настоящим изобретением предусматривают биологическую ткань (эндогенную или экзогенную) или синтетический либо полусинтетический материал, пригодный для восстановления поврежденных тканей тела, таких как эпидермальная, нервная, хрящевая или костная ткани.

В другом конкретном варианте осуществления предусмотрен способ получения среды для культивирования, предусматривающий стадию смешивания сшитого хитозана по настоящему изобретению с питательными веществами для культивирования клеток, такими как глюкоза, витамины, факторы роста, ионы металлов и т. д.

В другом конкретном варианте осуществления предусматривается способ получения ткани для реконструкции, предусматривающий стадию объединения сшитого хитозана или композиции на его основе в соответствии с настоящим изобретением с материалами, тканями или клетками, пригодными для восстановления поврежденных тканей тела, таких как стволовые клетки или эпидермальная, нервная, хрящевая или костная ткани.

В соответствии с конкретным аспектом, композиции или наночастицы в соответствии с настоящим изобретением могут быть пригодными, после того, как они нагружены

биоактивным веществом или средством, для введения и высвобождения *in situ* указанной инъекции активного компонента.

Способ введения

Композиции по настоящему изобретению также можно вводить любым образом с помощью инъекции, такой как подкожные инъекции, интрасиновиальная, внутриартериальная, внутривенная, внутрисуставная, внутримышечная, подкожная, подслизистая, внутриглазная, внутричерепная, внутрижелудочная, кишечная, анальная, внутрибрюшинная, внутриопухолевая и интерстициальная инъекции.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить любым образом посредством перорального пути введения, в том числе через поверхности слизистых оболочек ротовой полости, включая десну, дно ротовой полости, щеки, губы, язык, зубы.

Композиции по настоящему изобретению можно также применять местно в отношении кожи, различных слизистых поверхностей или глаза.

Комбинация

В соответствии с одним аспектом, сшитый хитозан или наночастицы на его основе в соответствии с настоящим изобретением или любую подходящую фармацевтически приемлемую композицию на их основе и фармацевтические составы на их основе можно вводить отдельно или в комбинации с по меньшей мере одним совместно применяемым средством.

В соответствии с конкретным аспектом, совместно применяемое средство в соответствии с настоящим изобретением включает антибиотики, нуклеиновые кислоты, в том числе конструкции генов, антитела и фрагменты антител, токсины, цитостатики, противогрибковые средства, компоненты химиотерапевтических лекарственных средств, антигипертензивные средства, антиаритмические вещества, вещества активации пролиферации, гормоны, цитокины, доноры оксида азота и доноры сероводорода.

Настоящее изобретение охватывает введение сшитого хитозана или частиц на его основе в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтических составов на их

основе субъекту одновременно или последовательно с указанным по меньшей мере а совместно применяемым средством.

Сшитый хитозан или наночастицы на его основе в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтический состав на их основе, которые вводят одновременно с указанным совместно применяемым средством, можно вводить в той же или другой(других) композиции(композициях) и тем же или другим(другими) путем(путями) введения.

Лекарственная форма, вводимая в виде однократных или многократных доз субъекту, будет изменяться в зависимости от различных факторов, включая фармакокинетические свойства, состояния и особенности пациента (пол, возраст, вес тела, состояние здоровья и метрические данные), степень проявления симптомов, сопутствующее лечение, частота лечения и необходимый эффект.

Пациенты

В одном варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от сердечно-сосудистых заболеваний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хряща, кости, связки или синовиальной капсулы.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа,

ожоги физической или химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные ожоги, язвы, геморрой.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от заболеваний периодонта и зубов.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от повреждения твердой мозговой оболочки, такого как после случайной травмы или хирургии мозга и центральной нервной системы.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от злокачественных и доброкачественных новообразований.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, которые страдают от послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции.

В другом варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, желающие увеличения объема частей тела или анатомического изменения формы, таких как любое улучшение/модификация и/или увеличение объема части тела по эстетическим или терапевтическим причинам, или нуждающиеся в таковых.

В другом дополнительном варианте осуществления пациенты в соответствии с настоящим изобретением являются субъектами, страдающими от опухоли, сосудистой патологии или любой другой новой возникшей аномалии физической ткани или органа, вызывающей боль.

Применение по настоящему изобретению

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, из-за его способности к спонтанному образованию наночастиц, сшитый хитозан по настоящему изобретению является пригодным для различных применений, таких как *in vitro* культивирование клеток или биологической ткани, в качестве наполнителей для тканей, для применений в косметике, тканевой инженерии, и инженерии органоидов, и материаловедении.

В частности, в соответствии с одним аспектом, сшитый хитозан по настоящему изобретению можно применять в качестве носителя фармацевтических активных ингредиентов (например, в качестве системы доставки лекарственных средств), в качестве системы проникания в клетки (например, в генной терапии или для средств, неспособных проникать в клетки), в качестве солюбилизатора, в качестве средства захвата: инкапсуляция интересующих ингредиентов в наночастицах для создания суспензий для эффективного удаления из растворов, например, путем перехода с кислотного на щелочной pH).

В соответствии с другим аспектом, сшитый хитозан по настоящему изобретению можно применять в качестве медицинских имплантов (например, покрытие имплантов для улучшения биосовместимости, восстановительных медицинских имплантов, содержащих клетки) или материалов (например, кровоостанавливающие материалы).

В соответствии с другим аспектом, сшитый хитозан по настоящему изобретению можно применять в качестве субстратов для радиофармацевтических препаратов (например, применяемых в стандартной ангиографии (CT) и других новых способах визуализации (например, на основе EPR, на основе ЯМР и на основе рентгеновских лучей)).

В соответствии с другим аспектом, сшитый хитозан по настоящему изобретению можно применять в качестве субстратов для клеточной культуры (например, стволовых клеток), среды для культивирования клеток, в тканевой инженерии, такой как 3D печать органоидов, для методик разделения/очистки, для трансфекции клеток.

В соответствии с другим аспектом, сшитый хитозан по настоящему изобретению можно применять в качестве наноразмерных смазывающих средств (например, после пиролиза), диспергирующего средства для коллоидных препаратов или в качестве флокулянта.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, предусматривается применение сшитого хитозана по настоящему изобретению или наночастицы в соответствии с настоящим изобретением или составов на их основе для получения системы доставки, культуры клеток или биологической ткани *in vitro* или материалов для тканевой инженерии, таких как ткань для нейрохирургии, костная, хрящевая, эпидермальная ткани для реконструкции.

В соответствии с другим конкретным вариантом осуществления, сшитые хитозаны или наночастицы в соответствии с настоящим изобретением или составы на их основе являются пригодными для применения в предупреждении или лечении медицинского нарушения и, в частности, сердечно-сосудистых состояний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия, патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хрящей, костей, связок или синовиальной капсулы, патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы, заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит, нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные ожоги, язвы, геморрой, заболевания периодонта и зубов, повреждения твердой мозговой оболочки, такого как после случайного повреждения или хирургии мозга и центральной нервной системы, злокачественных и доброкачественных новообразований, в частности, видов карциномы, видов саркомы, видов лимфомы и видов меланомы, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, опухолей или сосудистых патологий, или для предупреждения и/или лечения дистрофии тканей и связанных нарушений.

В соответствии с другим дополнительным конкретным аспектом, предусматриваются сшитые хитозаны или наночастицы в соответствии с настоящим изобретением или составы на их основе для косметического применения или для эстетической и реконструктивной хирургии.

В соответствии с другим дополнительным конкретным аспектом, предусматриваются сшитые хитозаны или наночастицы в соответствии с настоящим изобретением или составы на их основе для применения в *in vivo* доставке лекарственных средств.

В соответствии с конкретным аспектом, предусматривается применение наночастицы в соответствии с настоящим изобретением в качестве системы доставки по меньшей мере одного биоактивного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, предусматривается композиция, содержащая по меньшей мере одно из сшитых хитозанов или наночастиц в

соответствии с настоящим изобретением, которая является пригодной во многих медицинских применениях, таких как система доставки по меньшей мере одного биоактивного средства или система доставки клеток в тканевой инженерии, системы культивирования клеток или биологической ткани и т. п.

Примеры, иллюстрирующие настоящее изобретение, будут описаны далее более подробно и со ссылкой на варианты осуществления, представленные на графических материалах.

ПРИМЕРЫ

Следующие сокращения относятся соответственно к нижеуказанным определениям:

DMF (диметилформамид); **DMSO** (диметилсульфоксид); **MWCO** (граница отсечки по молекулярной массе)

Пример 1. Синтез хитозана по настоящему изобретению

Наночастицы хитозана по настоящему изобретению синтезировали, как описано на схеме 1 выше, причем используемые исходные материалы были следующими.

a) Предоставление хитозана и подвергание указанного хитозана стадии набухания в отсутствие воды (например, в апротонном растворителе)

450 г сухого хитозана (хитозан может быть высушен *in vacuo* на оксиде фосфора, *in vacuo* с умеренным нагреванием, азеотропной перегонкой с этанолом, ацетонитрилом, ацетоном или любым другим подходящим растворителем) помещали в реактор в инертной атмосфере (например, продували аргоном). Этот реактор предпочтительно представляет собой круглодонную двухлитровую колбу, оборудованную магнитной мешалкой, двурогой форсункой, в которую вводят форсунку из колбы Дрекселя для продувки инертным газом (например, аргоном) и капельная воронка с противодавлением для добавления реагентов.

Затем 1400 мл апротонного растворителя (например, DMF) выливали в реактор и обеспечивали набухание хитозана в течение приблизительно 1 часа при комнатной температуре.

В случае предоставления невысушенного хитозана 1500 мл апротонного растворителя (например, DMF) выливали в реактор и обеспечивали набухание хитозана в течение 1 часа при комнатной температуре, затем 300 мл апротонного растворителя (например, DMF) отгоняли *in vacuo*, а затем 200 мл DMF добавляли к высушенному хитозану в реакторе и обеспечивали набухание хитозана в течение 1 часа при комнатной температуре.

Реакционную среду с набухшим хитозаном затем охлаждали до приблизительно 2-6°C на ледяной бане или с помощью бани, соединенной с термостатом, при приблизительно 2-6°C. На той же бане также охлаждали реактор объемом 250 мл (например, круглодонную колбу) с 100 мл сухого DMF. После охлаждения ацилирующее средство добавляли в апротонный растворитель (100 мл DMF) по каплям, с перемешиванием и избегая местного перегрева, при перемешивании растворителя**.** Раствор ацилирующего средства в DMF можно нагревать до приблизительно комнатной температуры.

b) Ацилирование аминогрупп указанного хитозана акриловым соединением формулы (I) в отсутствие воды.

Раствор акрилоилового соединения, полученного выше, добавляли в суспензию хитозана, полученного выше, в течение приблизительно 15 минут при энергичном перемешивании, при предпочтительно осторожном встряхивании реактора (например, вручную), в то же время прекращая добавление акрилоилового соединения, поскольку это обеспечивает вымывание комков хитозана струями растворителя с верхней стенки колбы. После завершения добавления раствора акрилоилового соединения, капельную воронку промывали минимальным количеством апротонного растворителя (например, DMF) порядка 10-15 мл и этот раствор добавляли в реакционную среду. Систему охлаждения удаляли и перемешивание продолжали в течение еще двух часов с периодическим встряхиванием, обеспечивая нагревание реакционной среды до комнатной температуры. После перемешивания колбу помещали в ультразвуковую ванну на приблизительно 15 минут и реакционную смесь подвергали ультразвуковой обработке. В течение этого времени ультразвукового воздействия происходило только незначительное нагревание реакционной смеси до не более чем 30°C.

c) ***Подвергание продукта ацилирования стадии b) реакции нуклеофильного присоединения (аза-присоединение по Михаэлю) в присутствии ненуклеофильного основания.***

После этого ненуклеофильное основание (например, триэтиламин, диизопропилэтиламин) добавляли в избытке по сравнению с количеством акрилоилового соединения, используемого на стадии b), в реакционную среду (например, с помощью капельной воронки) в течение приблизительно 15 минут при энергичном перемешивании и периодическом встряхивании. Смесь оставляли перемешиваться в течение ночи или приблизительно 15-18 часов при комнатной температуре. Затем реактор помещали в баню с температурой приблизительно 55°C и смесь перемешивали в течение приблизительно 6 часов. Реактор снимали с бани и помещали в ультразвуковую баню, предварительно нагретую до приблизительно 55°C, на приблизительно 15 минут и реакционную смесь подвергали ультразвуковой обработке.

После ультразвуковой обработки реактор переносили в роторный испаритель и ненуклеофильное основание отгоняли, если летучее органическое ненуклеофильное основание использовали. Если нелетучее основание использовали, тогда реактор охлаждали до комнатной температуры или более низкой температуры и эквивалентное количество кислоты (например, хлористоводородной кислоты) добавляли при энергичном перемешивании. pH полученной реакционной среды регулировали для обеспечения нейтральной реакционной среды.

d) ***Получение сшитого хитозана по настоящему изобретению***

Сшитый хитозан получали на стадии c) в суспензии в апротонном растворителе (например, DMF) с примесями солей. Таким образом, продукт подвергали стадии очистки, например, посредством диализа относительно деионизированной воды. Например, для этой цели реакционный раствор, полученный на стадии c), переносили в диализные мешки, закрытые зажимами, и помещали в контейнеры с перемешиваемой с помощью магнитной мешалки деионизированной водой. Диализ можно контролировать различными способами, например, путем контроля содержания солей посредством измерения проводимости промывочных жидкостей или путем контроля содержания DMF с помощью УФ-поглощения при длине волны менее 260 нм. Если после

инкубации деионизированной воды с диализированным продуктом в течение 20 минут нет значительных различий ни в электропроводности, ни в УФ-поглощении, то процесс диализа считается завершенным.

e) ***Необязательное получение сшитого хитозана по настоящему изобретению в сухом состоянии***

Можно использовать влажный продукт, полученный на **стадии d),** без его высушивания. Однако его можно также высушить, например, для составления/хранения или транспортировки.

Очищенный продукт, полученный на стадии d), затем высушивали. Например, высушивание можно осуществлять в сублимационной сушилке с предварительным замораживанием продукта; сначала в присутствии фосфорного ангидрида или любого подходящего обезвоживающего вещества, такого как молекулярные сита, гидроксид калия и т. п.) под атмосферным давлением для поглощения большей части воды, а затем под вакуумом в присутствии фосфорного ангидрида или любого подходящего обезвоживающего вещества или с предварительным испарением на роторном испарителе и повторной азеотропной перегонкой воды с этанолом и последующим вакуумным высушиванием на фосфорном ангидриде или любом подходящем обезвоживающем веществе.

В общем, выход способа по настоящему изобретению составляет приблизительно 90%. Потери вероятнее всего связаны с уносом наночастиц при высушивании, а также потерями при переносе из реакционной емкости, диализных мешков, поскольку приоритет стерильности и отсутствия загрязнения выше, чем приоритет выхода.

f) ***Дополнительный сшитый хитозан по настоящему изобретению в сухом состоянии***

Необязательно очищенный сшитый хитозан, полученный на **стадии c), стадии d) или стадии e)**, можно подвергать омылению. Для этой цели сшитый хитозан, полученный на стадии d), помещали в реактор в инертной атмосфере (например, продувают аргоном). 1200 мл деионизированной воды выливали в колбу и щелочной раствор (например, NaOH в воде) с 20% мольным избытком относительно количества акрилоилового соединения, используемого в приблизительно 100 мл деионизированной воды, добавляли при энергичном перемешивании в течение приблизительно 15 минут.

Целесообразно аккуратно встряхивать колбу вручную, при этом останавливая добавление щелочи, поскольку эта процедура обеспечивает вымывание комков хитозана, которые попали с брызгами растворителя на верхние стенки реактора. После перемешивания реактор помещали в ультразвуковую баню и реакционную смесь подвергали ультразвуковой обработке; после достижения реакционной массой приблизительно 55°C ультразвуковую обработку продолжали в течение еще 2 часов при этой температуре. После этого полученный продукт можно либо нейтрализовать эквивалентным количеством кислоты, осуществлять диализ, либо высушивать без нейтрализации, и после высушивания снова подвергать по меньшей мере одному циклу **стадий b)-c) (или d)/e)**. Применение более одного цикла последовательности **стадий b)-c) (или d)/e)** позволяет повысить насыщение сшитого хитозана карбоксильными функциональными группами.

Пример 2. Пример синтеза сшитых хитозанов по настоящему изобретению

Различные сшитые хитозаны по настоящему изобретению (CHI) синтезировали согласно способу, описанному в данном документе, в то же время изменяя природу и соотношение сшивающего средства. Примеры представлены ниже в таблице 1.

В каждом случае 450 граммов хитозана использовали в качестве исходного материала. Примеры 2a-2r и C1, акрилоиловое соединение представляет собой акрилоилхлорид (регистрационный номер по CAS: 814-68-6). Примеры 2t-2al, акрилоиловое соединение представляет собой метакрилоилхлорид (регистрационный номер по CAS: 920-46-7). Реакцию проводили, как описано на стадиях a)-c) способа по настоящему изобретению. Примеры 2am-2as, акрилоиловое соединение представляет собой различные акрилоилхлориды.

Таблица 1

CHI	**Хитозан**	**Акрилоиловое соединение**	**Сшивание/хитозан - теоретическое число связей или процент сшивок**
2a	MW: 11,5 кДа DD: 62%	4,250 г (20% избыток для хитозана)	1
2b	MW: 10,7 кДа DD: 91%	4,570 г (20% избыток для хитозана)	1

CHI	Хитозан	Акрилоиловое соединение	Сшивание/хитозан - теоретическое число связей или процент сшивок
2c	То же, что и 2a	11,278 г	9,8% амидных/аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана (4,9%, полученных на стадии b, и 4,9%, полученных на стадии c)
2d	То же, что и 2b	12,112 г	То же, что и 2c
2e	То же, что и 2a	71,35 г	Всего аминогрупп
2f	То же, что и 2b	112,47 г	То же, что и 2e
2g	MW: 53,0 кДа DD: 70%	0,922 г (20% избыток для хитозана)	1
2h	MW: 50,3 кДа DD: 91%	0,972 г (20% избыток для хитозана)	1
2i	То же, что и 2g	3,754 г	3,2% амидных/аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана (1,6%, полученных на стадии b, и 1,6%, полученных на стадии c)
2j	То же, что и 2h	3,953 г	То же, что и 2i
2k	То же, что и 2g	82,12 г	То же, что и 2e
2l	То же, что и 2h	112,40 г	То же, что и 2e
2m	MW: 543,4 кДа DD: 60%	90 мг (20% избытка для хитозана)	1
2n	MW: 501 кДа DD: 93%	98 мг (20% избытка для хитозана)	1
2o	То же, что и 2m	4,60 г	4,0% амидных/аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана (2,0%, полученных на стадии b, и 2,0%, полученных на стадии c)
2p	То же, что и 2n	5,00 г	То же, что и 2o
2q	То же, что и 2m	68,72 г	То же, что и 2e
2r	То же, что и 2n	115,53 г	То же, что и 2e

CHI	Хитозан	Акрилоиловое соединение	Сшивание/хитозан - теоретическое число связей или процент сшивок
C1	Глюкозамин MW: 179,17 г/моль DD: 100%	113,66 г	То же, что и 2e
2t	То же, что и 2a	4,908 г (20% избытка для хитозана)	1
2u	То же, что и 2b	5,275 г (20% избытка для хитозана)	1
2v	То же, что и 2a	13,025 г	То же, что и 2c
2w	То же, что и 2b	13,988 г	То же, что и 2c
2x	То же, что и 2a	82,40 г	То же, что и 2e
2y	То же, что и 2b	129,89 г	То же, что и 2e
2z	То же, что и 2g	1,065 г (20% избытка для хитозана)	1
2aa	То же, что и 2h	1,122 г (20% избытка для хитозана)	1
2ab	То же, что и 2g	4,335 г	То же, что и 2i
2ac	То же, что и 2h	4,565 г	То же, что и 2i
2ae	То же, что и 2g	94,84 г	То же, что и 2e
2af	То же, что и 2h	129,81 г	То же, что и 2e
2ag	То же, что и 2m	104 мг (20% избытка для хитозана)	1
2ah	То же, что и 2n	113 мг (20% избытка для хитозана)	1
2ai	То же, что и 2m	4,233 г	То же, что и 2i
2aj	То же, что и 2n	4,591 г	То же, что и 2i
2ak	То же, что и 2m	79,37 г	То же, что и 2e
2al	То же, что и 2n	133,42 г	То же, что и 2e

CHI	Хитозан	Акрилоиловое соединение	Сшивание/хитозан - теоретическое число связей или процент сшивок
2am	То же, что и 2n	α,β-Диметилакрилоил хлорид (CAS [49651-33-4], M.W. 118,56 г/моль, 5,207 г	То же, что и 2i
2an	То же, что и 2n	Хлорид 2-метилендодекановой кислоты (CAS [52756-21-5], M.W. 230,77 г/моль, 10,135 г	То же, что и 2i
2ao	То же, что и 2n	Хлорид (Z)-урокановой кислоты (CAS [91788-89-5], M.W. 138,13 г/моль, 6,066 г	То же, что и 2i
2ap	То же, что и 2n	(Z)-2-Хлор-2-бутеноилхлорид (CAS [56030-36-5], M.W. 138,98 г/моль, 6,104 г	То же, что и 2i
2aq	То же, что и 2n	Хлорид муконовой кислоты (CAS [58823-55-5], M.W. 179,00 г/моль, 3,931 г	То же, что и 2i
2ar	То же, что и 2n	(Z)-2-Метилгепт-2-ен-6-иноилхлорид (CAS [313217-54-8], M.W. 156,61 г/моль, 6,878 г	То же, что и 2i
2as	То же, что и 2n	Малеиновый ангидрид (CAS [108-31-6], M.W. 98,06 г/моль, 4,307 г	То же, что и 2i
2at	То же, что и 2h	То же, что и 2j	Исходные значения температуры на стадии b) и стадии c) составляли -70°C, и реакцию проводили при -20°C в течение 10 дней.

CHI	Хитозан	Акрилоиловое соединение	Сшивание/хитозан - теоретическое число связей или процент сшивок
2au	То же, что и 2h	1/1000 часть того же, что и 2j, 4 мг	Реакцию проводили, как описано на стадии b) и стадии c) общего способа, но при в 1000 раз меньшей массе и в герметичном реакторе объемом 5 мл. Исходные значения температуры на стадии b) и стадии c) составляли - 70°C, и реакцию проводили при +150°C в течение 30 минут.
2av	Полученный на ***2f***		Реакцию проводили, как описано на стадии f). При этих условиях конечное количество модифицированных пропионовой кислотой аминогрупп соответствует половине аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана.
2ax	Полученный на ***2k***		Тот же, что и ***2av***
2ay	Полученный на 2r		Тот же, что и ***2av***
2az	Полученный на ***2av***	56,24 г акрилоилхлорида	Реакцию проводили, как описано на стадии b), на стадии c), на стадии f). При этих условиях 75% аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана, подвергаются модификации пропионовой кислотой.
2ba	Полученный на 2ax	41,05 г акрилоилхлорида	То же, что и 2az
2bb	Полученный на 2ay	57,77 г акрилоилхлорида	То же, что и 2az
2bc	Полученный на 2r		Реакцию проводили, как описано на стадии f), но омыление начинали при 0°C и продолжали 10 дней при этой температуре, при этом количество основания эквимолярно используемому акрилоилхлориду. При этих условиях конечное количество модифицированных пропионовой кислотой аминогрупп соответствует половине аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана.

CHI	Хитозан	Акрилоиловое соединение	Сшивание/хитозан - теоретическое число связей или процент сшивок
2bd	Полученный на 2r		Реакцию проводили, как описано на стадии f), но омыление начинали при 0°C и продолжали 30 минут при 140°C под давлением, количество основания эквимолярно используемому акрилоилхлориду. При этих условиях конечное количество модифицированных пропионовой кислотой аминогрупп соответствует половине аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана.
2be	Полученный на 2r		Реакцию проводили, как описано на стадии f), но омыление начинали при 0°C и продолжали 10 дней 0°C, при этом количество основания составляет 10 эквивалентов используемого акрилоилхлорида. При этих условиях конечное количество модифицированных пропионовой кислотой аминогрупп соответствует половине аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана.
2bf	Полученный на 2r		Реакцию проводили, как описано на стадии f), но омыление начинали при 0°C и продолжали 30 минут при 140°C под давлением, при этом количество основания составляет 10 эквивалентов используемого акрилоилхлорида. При этих условиях конечное количество модифицированных пропионовой кислотой аминогрупп соответствует половине аминогрупп, изначально присутствующих в макромолекуле хитозана, и происходит некоторое омыление ацетильных групп.
2bg	То же, что и 2a	143 г акрилоилхлорида	Реакцию проводили, как описано на стадии b). При этих условиях все аминогруппы, изначально присутствующие в макромолекуле хитозана, подвергаются модификации акриловой кислотой, образуя акрилоиламиды, содержащие двойную связь.

CHI	Хитозан	Акрилоиловое соединение	Сшивание/хитозан - теоретическое число связей или процент сшивок
2bh	2000 кДа, DD 10%	3,278 г акрилоилхлорида и 10% раствор LiCl в N,N-диметилацетамиде в качестве растворителя	Реакцию проводили, как описано на стадии b) и стадии c). То же, что и 2i.

Пример 3. Определение характеристик наночастиц хитозана по настоящему изобретению

Образец 3,2% сшитого 501 кДа хитозана (**пример 2i),** полученный как описано выше, адсорбировали в течение 30 секунд на покрытой формваром/углеродом медной решетке и окрашивали уранилацетатом в течение 5 секунд. Микрофотографию окрашенного материала затем получали с использованием просвечивающего электронного микроскопа Jem1400 (Jeol) и камеры Veleta (SIS, Германия) (фиг. 1A), которая показала, что основной объем препарата состоял из глобулярных частиц с примерным диаметром 15 нм, что является аналогичным размеру небольших вирусов млекопитающих. Некоторые большие частицы также могут наблюдаться, с диаметрами в диапазоне 60-80 нм, соответствующие диаметрам вирусных частиц среднего размера.

Кроме того, высушенные пленки стандартного линейного хитозана (MW: 501 кДа, 93% DD) (Bioavanta) и сшитого хитозана согласно настоящему изобретению, полученного из того же хитозана **(пример 2i)**, получали посредством выливания раствора 2% хитозана в 1% водной янтарной кислоте на чашку Петри, за счет чего обеспечивается образование 1 мм слоя, который затем высушивали под вакуумом на фосфорном ангидриде до постоянной массы при комнатной температуре, и эти пленки затем анализировали с помощью атомно-силового микроскопа «Solver Bio» (NT-MDT, Зеленоград, Россия), в полуконтактном режиме. Трехмерное представление 100 мкм x 100 мкм площади поверхности пленки стандартного образца хитозана (MW: 501 кДа, 93% DD) показало, что поверхность гладкая, с линейными полимерами хитозана вероятно расположенными коллинеарно (**фиг. 1B1**), тогда как площадь поверхности соответствующего образца сшитого хитозана **примера 2i** шероховатая, с «пиками» и «углублениями», образованными скоплениями глобулярных структур (**фиг. 1B2**). На **фиг. 1B3** и **B4** посредством атомно-силовой микроскопии визуализированы

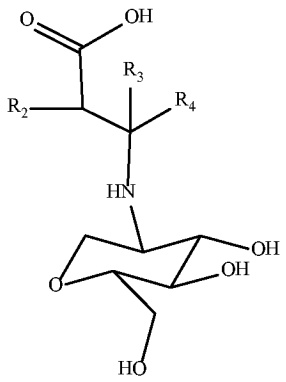
пленки, содержащие бактериальную наноцеллюлозу, пропитанную раствором 1% вес/вес сшитого хитозана согласно настоящему изобретению в воде. Измерения AFM проводили в полуконтактном режиме на сканирующем зондовом микроскопе Solver Next (NT-MDT, Россия) при стандартных комнатных условиях на воздухе (T = 26°C, RH = 15%). Зонды AFM ScanAsyst-AIR (Bruker, США) с жесткостью кантилеверной балки ~0,4 Н/м с резонансной частотой ~70 кГц и стандартным радиусом кривизны (острота зонда AFM) 2 нм использовали для оптимальной силы давления (заданная величина). Все измерения проводили при скорости сканирования 0,5 Гц и разрешении 512×512 точек. Последующую обработку проводили в программе ImageAnalysis 3.5 путем вычитания наклонной плоскости и удаления погрешностей измерения («залипания»). Анализ полученных изображений, представленных на **фиг. 1 B3 и B4**, продемонстрировал наличие глобулярных структур, равномерно распределенных по поверхности образца (**фиг. 1 B3 и B4**), со средним диаметром глобул 20 нм, что соответствует размеру мелких вирусов, таких как представители *Caliciviridae, Picornaviridae, Parvoviridae*. Наличие структур, наблюдаемых в случае AFM, подтверждали данными ранее проведенной просвечивающей электронной микроскопии **(фиг. 1 A).**

Структурные различия между стандартным хитозаном (отрицательный контроль) и сшитым хитозаном **(пример 2i)** по настоящему изобретению и сшитым глюкозамином (сравнительный пример C1) (положительный контроль) дополнительно оценивали в инертной атмосфере (например, аргона) посредством способа обратного кислотного гидролиза, который позволяет анализировать низкомолекулярные вещества точным образом для идентификации маркерного вещества, образующегося только в случае успешного сшивания, как показано ниже.

Образцы (100 мг каждый) добавляли при энергичном перемешивании в раствор 1 мл ацетилхлорида в 5 мл метиленхлорида, охлажденного до -20°C. Смесь затем нагревали до 0°C и выдерживали при энергичном перемешивании в течение 30 минут. Добавляли диизопропилэтиламин (1 мл) и смесь нагревали до комнатной температуры и выдерживали при энергичном перемешивании в течение еще 30 минут. Нейтрализация полученного гидрохлорида, затем будет обеспечивать вымывание водой всех веществ, которые препятствуют анализу, а также присутствие ненуклеофильного сильного основания обеспечивает проведение ацетилирования полностью или наиболее полно. Все растворители тщательно выпаривали *in vacuo* и остаток промывали трижды с

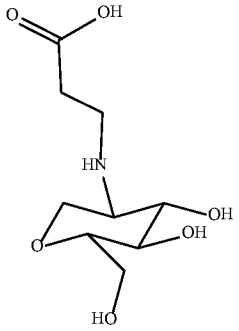
помощью образцов 1 мл воды. Промывочную воду удаляли, и 10 мл 28% хлористоводородной кислоты добавляли в твердые осадки и нагревали при температуре образования флегмы в течение 2 часов. Реакционные смеси тщательно выпаривали под вакуумом и остатки (прибл. 100 мг) повторно суспендировали в 100 мл 2% водной уксусной кислоты. В этот момент образцы готовы. Полный гидролиз полимера до глюкозамина и производного глюкозамина происходил затем при данных условиях. Таким образом, поскольку **вещество формулы (II)** не обнаруживается в природном хитине и хитозане, его можно только получать посредством аза-реакции Михаэля с оставшейся акриловой кислотой и, таким образом, обнаружение такого вещества можно использовать для идентификации сшитого хитозана, полученного посредством способа по настоящему изобретению.

Если какой-либо акрилоилхлорид (например, хлорид любой акриловой кислоты, используемой на стадии сшивания согласно настоящему изобретению) формулы (I) используют в качестве сшивающего реагента (например, для **примера 2i**) после предварительного получения образца (например, ацетилирования, промывания), кислотный гидролиз с обратным холодильником полученных полимеров, который приводил не только к гидролизу гликозидных связей между глюкозаминовыми структурными единицами, но также амидных связей как ацетилглюкозамина, так и созданных при ацилировании со сшивающим средством (например, активированные для ацилирования замещенные или незамещенные производные акриловой кислоты), будет приводить к образованию следующего производного глюкозамина и пропионовой кислоты формулы (IIIa):



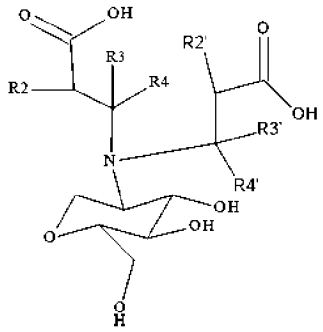
(IIIa),

где R_2-R_4 определены в настоящей заявке, в частности следующего производного глюкозамина и пропионовой кислоты формулы (II), если при ацилировании использовали незамещенную активированную акриловую кислоту:



(II).

Это вещество гидролитически стабильно и должно присутствовать в смеси, если сшивание изначально происходило. Аналогичные производные (IIIa) образуются, если используют другие сшивающие реагенты. В случае проведения процедуры с высокой степени сшивания определение производных формулы (**IIIb**) может быть использовано для идентификации сшитого хитозана, полученного посредством способа согласно настоящему изобретению,



(IIIb),

где R_2-R_4 определены в данном документе, $R_{2'}$-$R_{4'}$ определены соответственно таким же образом, как и R_2-R_4 в данном документе, при этом $R_{2'}$-$R_{4'}$ могут являться соответствующим образом идентичными каждому соответствующему R_2-R_4 или являться разными, если акриловые соединения формулы (I), используемые в последующей последовательности стадий b) - c) в способе по настоящему изобретению, отличались от используемых в первой последовательности.

Для подтверждения наличия сшивания в продукте, полученном в результате способа по настоящему изобретению, образцы растворов, полученные как описано выше, использовали в масс-спектрометрическом анализе (Bruker Daltonics TOF 180 мкл/ч, tune_low.m, ES в режиме сканирования положительных ионов, N2- 4 л/мин, 190 C, Nb.=0,4, время спектрального анализа 1 с) непосредственно, без предварительной хроматографии. В массовом спектре в области представляющих интерес ионов (ниже соотношения масса/заряд) как для сравнительного стандартного хитозана (**фиг. A2**), так и сшитого хитозана по настоящему изобретению (**фиг. B2**), специфичный для глюкозамина пик наблюдали (масса/заряд = 180,073), отражающий наличие целых остатков аминоглюкозы. Однако для сшитого хитозана по настоящему изобретению возникал новый пик с масса/заряд =252,077 (**фиг. B2**), соответствующий продукту формулы (II), полученному алкилированием аминоглюкозы пропионовой кислотой. В этом примере интенсивность пика низкая, что отражает низкий процент сшивания образца (3,2% сшивания, что определено условиями реакции 2i. Это харакетристический пик, который подтверждает успешное сшивание хитозана согласно способу по настоящему изобретению. Он присутствовал во всех образцах, полученных в результате способа по настоящему изобретению, проводимым при различных соответствующих условиях, как описано в таблице 1 выше (включая сравнительный глюкозаминовый положительный контроль), и отсутствовал во всех тестируемых хитозанах и хитинах.

Для подтверждения определения пиков для глюкозамина и соединения (II) с соотношением масса/заряд = 180 и масса/заряд =252 исследования столкновения проводили при различных значениях энергии удара (AB SCIEX Triple Quad™ 3500) (5B и 15B). В этом случае предварительно обработанные сухие остатки (после гидролиза реакционные смеси выпаривали под вакуумом) растворяли в водном растворе, содержащем 10% метанола и 0,1% муравьиной кислоты. При фрагментировании при более высокой энергии удара (прибор Sciex) соединение с соотношением масса/заряд = 180 наблюдали спектр с потерей воды (-18 масса/заряд, -2*18 масса/заряд, -3*18 масса/заряд) (**фиг. 5A и 5B**). С повышением энергии столкновения интенсивность пиков потери воды также повышалась. Это явление характерно для углеводов. Аналогичная картина наблюдается для иона соединения с соотношением масса/заряд = 252 (**фиг. 5B и 5C**). Однако как производное углевода, оно может быть более стабильным относительно потерь воды, при таких же значениях энергии столкновения.

Следовательно, наблюдаемые относительные значения интенсивности пиков, представляющих собой потери воды, являются более низкими.

Стабильность 3,2% сшитого 501 кДа хитозана по настоящему изобретению (**пример 2i**), полученного как описано выше, контролировали посредством масс-спектрометрии после добавления 500 мкл раствора лизоцима яйца в концентрации 10 мг на мл в натрий ацетатном буфере (pH 5,5) в 5 мг соединения по настоящему изобретению. Смесь инкубировали на встряхивателе при 37°C в течение 7 дней, пока дополнительные изменения в массовом спектре больше не наблюдались. На этом этапе массовый спектр показал характерный «гребне»-подобный паттерн высокомолекулярных соединений: периодически вставленные пики с периодически повышающейся интенсивностью при соотношениях масса/заряд 955-958, 1023-1024, 1101-1104, 1193-1196. Пики соответствовали таким же фрагментам, отличающимся единицей заряда. Для заданных масс заряды иона составляли +15, +14, +13 и +12. Масса основного фрагмента составляла 14305 Да. Аналогичные результаты получали с образцами, инкубируемыми в течение более длительных периодов, до 3 недель. Это показывает, что гидролаза, ответственная за гидролиз хитозана и его производных как в лизоциме яичного белка, так и тканях теплокровных животных, способна гидролизовать сшитый хитозан только до довольно больших фрагментов с массой приблизительно 14 кДа. Таким образом, это подтверждает, что высокомолекулярный и деацетилированный хитозан, используемый для получения наночастиц, более стабилен, чем для ферментативного гидролиза.

Таким образом, эти данные подтверждают большую разницу в структуре между сшитым хитозаном по настоящему изобретению, образующим наночастицы, и стандартным хитозаном, используемым в качестве исходного материала. Кроме того, способ, основанный на детектировании вещества формулы (II) или связанных веществ, является высокочувствительным и высокоспецифическим в отношении обнаружения наночастиц, полученных способом по настоящему изобретению.

Пример 4. Клеточная интернализация наночастиц хитозана по настоящему изобретению

Способность наночастиц хитозана по настоящему изобретению интернализироваться клетками была протестирована следующим образом с помощью флуоресцентной

микроскопии, используя проникание меченного флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и 5-(и 6-)карбоксифлуоресцеином (FAM) хитозана внутрь роговицы мышей.

Меченные флуоресцеином сшитые хитозаны получали с помощью, либо стандартного исходного хитозана с молекулярной массой 501 кДа и степенью деацетилирования 93%, либо 3,2% сшитого хитозана согласно настоящему изобретению (пример 2p). DMF (1 мл), предварительно охлажденный на ледяной бане, добавляли к обоим хитозанам (100 мг) в пробирках Eppendorf, и суспензию оставляли набухать в течение 1 часа. Растворы 2,85 мг флуоресцеин-5-изотиоцианата (FITC) или сукцинимидилового эфира 5-(и 6-)карбоксифлуоресцеина (NHS-флуоресцеин) в 250 мкл DMF затем добавляли в ультразвуковую баню, заполненную ледяной водой, и подвергали ультразвуковой обработке. Первые двадцать минут температуру бани поддерживали при 0°C, а затем баню нагревали до 40°C и реакцию проводили при этой температуре в течение 100 минут. Содержимое пробирок переносили в пробирки для диализа 12-14 кДа и осуществляли диализ относительно воды. После 20 процедур диализа относительно 100 мл воды, 50 мг янтарной кислоты добавляли в каждую пробирку для диализа, хитозаны растворяли и процедуру диализа повторяли. Полученные растворы лиофилизировали и затем повторно суспендировали с получением 0,25% растворов.

Лейкоциты мышей инкубировали с этими растворами в течение 4 часов при 37°C, окрашивали ДНК-специфическим красителем (Hoechst 33258) и анализировали посредством флуоресцентной микроскопии. Флуоресцентный анализ (**фиг. 2**) показал, что зеленая флуоресценция (C) является равномерной по всей цитоплазме, указывая, что меченный FITC сшитый хитозан находится внутри клетки и, таким образом, был подвергнут эндоцитозу (простая связь меченного хитозана с клеточной мембраной будет создавать флуоресцирующее кольцо на границе клетки (A). Синяя флуоресценция, наблюдаемая снаружи ядра (D), может быть вызвана началом апоптоза.

Те же растворы соединения, меченного (0,25%) флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и 5(6)-карбоксифлуоресцеином (FAM), применяли в отношении глаз мыши CBA (одна капля на глаз). Через 6 часов экспериментальных животных умерщвляли и глаза фиксировали в формалине, окрашивали, как описано в *Stradleigh et al., 2015, Prog Retin Eye Res., 48: 181–202,* и анализировали посредством флуоресцентной микроскопии. Наблюдали, что тогда как стандартный хитозан концентрировался предпочтительно на поверхности роговицы и склеры (**фиг. 3A**), наночастицы хитозана по настоящему

изобретению (ярко-зеленая флуоресценция) проникали глубоко в роговицу равномерным образом (**фиг. 3B**).

Эти данные подтверждают, что наночастицы сшитого хитозана по настоящему изобретению будут пригодны для повышения способностей проникания в клетки плохо проникающих в клетки (гидрофильных) или непроникающих в клетки (больших молекул) активных ингредиентов или во внутриклеточные места посредством опосредованного наночастицами эндоцитоза и/или вероятно через клетки посредством опосредованного наночастицами трансцитоза.

Пример 5. Биосовместимость наночастиц хитозана по настоящему изобретению

Биосовместимость сшитого хитозана по настоящему изобретению (**пример 2i**) оценивали в *in vitro* культурах мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека (MSC), собранных у здоровых доноров посредством аспирации костного мозга, как описано в *Bieback et al., 2008, Transfus Med Hemother., 35(4): 286–294, doi: 10.1159/000141567*, для оценки его возможного влияния на культивирование и рост MSC.

MSC выделяли, как описано в *Bieback, et al., 2008*, выше, посредством центрифугирования в градиенте плотности 1077 г/мл, с последующими 2 промываниями и ростом в питательной среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки Mesecult, L-глутамин и антибиотики. Чистоту культуры подтверждали с помощью проточной цитометрии. Культивированные MSC показывали следующий фенотип: CD44+/CD73+/CD90+/CD105+/CD34-/HLA-DR- с показанной способностью к хондрогенной, остеогенной и липогенной дифференциации при добавлении специфической среды, как описано в *Ciuffreda et al., 2016, Methods Mol Biol. 2016;1416:149-58. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0_8*. В исследовании использовали клетки после 4 пассажей.

Стенки 25 $см^2$ чашек для культивирования покрывали пленкой сшитого хитозана, чашки сушили, промывали дважды питательной средой и на них высеивали клетки. На необработанных чашках для культивирования того же размера осуществляли аналогичное высевание для сравнения. Присутствие сшитого хитозана на пластиковых стенках чашек для культивирования не препятствует прикреплению клеток и росту клеток. В течение 3-4 часов после инокуляции клетки распределялись и принимали

свою характерную веретеновидную форму. Скорость роста несколько меньше в обработанных сшитым хитозаном чашках. Слияние достигалось через 48-56 часов в стандартных чашках для культивирования и через 68-76 часов в обработанных сшитым хитозаном чашках для культивирования.

В заключение, сшитый хитозан по настоящему изобретению поддерживает рост и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, хотя и с меньшей эффективностью, чем при стандартных условиях.

Пример 6. Применение хитозана по настоящему изобретению в областях применения, связанных с сельским хозяйством

Применимость сшитого хитозана по настоящему изобретению (**пример 2i)** тестировали на семенах яровой пшеницы следующим образом. Суспензии сшитого хитозана в воде по настоящему изобретению получали в двух различных концентрациях, семена погружали в суспензии, и каждый эксперимент включал следующие группы семян в зависимости от применяемой обработки:

(A) контроль (без обработки семян);

(B) обработка 0,1% (вес/вес) сшитым хитозаном,

(C) обработка 0,05% (вес/вес) сшитым хитозаном.

Оценка способствующих росту эффектов на начальных стадиях органогенеза

После 24-часовой обработки семена выкладывали на влажный субстрат (фильтры с хлопковым слоем) в чашки Петри (12 семян на чашку в квадруплетах) при естественном освещении, t = +20-22°C. Энергию прорастания определяли, как описано в *Domin et al., 2020,*_Sustainability *2020,* 12*(1), 46* и измеряли через 1 и 3 дня после приведения в контакт с влажным субстратом, а прорастаемость (число проросших семян, деленное на общее количество протестированных семян за вычетом пустых семян) определяли через 7 дней после приведения в контакт с влажным субстратом. Показатели роста на начальных стадиях органогенеза регистрировали через 3 дня (длина корней каждого проростка, общая длина проростков) и через 7 дней (количество корней на проросток, длина проростков, общая масса корней и побегов на проросток и масса каждого корня) после приведения в контакт с влагой.

Положительный эффект обработки сшитым хитозаном по настоящему изобретению был продемонстрирован при самой низкой концентрации, как показано на **фиг. 6** в случае прорастания и как обобщено в **таблице 2** ниже в случае развития проростков на начальных стадиях органогенеза.

Таблица 2

Продолжительность роста	**Показатели роста**	**A**	**B**	**C**
3 дня	Количество корней на проросток	2,9	3,0	3,0
	Длина корня на проросток, см	7,79 ± 0,27	8,64 ± 0,46	10,20 ± 0,94
	Длина отдельного корня, см	2,60 ± 0,12	2,86 ± 0,08	3,4 ± 0,11
	Длина побега, см	1,84 ± 0,09	2,29 ± 0,03	2,69 ± 0,30
7 дней	Количество корней на проросток	4,41	4,68	4,83
	Длина побега, см	10,05 ± 0,75	10,11 ± 0,69	11,27 ± 0,26
	Высушенная на воздухе биомасса корней на проросток, мг	8,20 ± 0,07	9,60 ± 0,56	9,40 ± 0,20
	Высушенная на воздухе биомасса 1 корня, мг	1,86 ± 0,02	2,06 ± 0,15	1,95 ± 0,08
	Высушенная на воздухе биомасса 1 проростка, мг	15,13 ± 0,13	17,25 ± 0,19	16,45 ± 0,41

Более высокие показатели скорости появления первичных корешков наблюдали в течение одного дня после обработки сшитым хитозаном. Наиболее сильный эффект наблюдали при использовании суспензии с низкой концентрацией (увеличение на 22,9% при использовании 0,05% сшитого хитозана; увеличение на 14,6% при использовании 0,1% сшитого хитозана при 75% для контроля исходного уровня). Ту же тенденцию наблюдали при измерении энергии прорастания (увеличение на 6,2%) и прорастаемости (контроль = 93,8%). Обработка семян высококонцентрированной суспензией сшитого хитозана обеспечивала увеличение прорастаемости на 4,1%. На ранних стадиях органогенеза сшитый хитозан приводил к увеличению роста корней. Через 3 дня общая длина корней была на 10,9% и 30,9% выше в группах обработки 0,1% сшитым хитозаном и 0,05% сшитым хитозаном соответственно (контроль = 7,79 см). В то же время наиболее равномерное увеличение наблюдали в группе обработки сшитым хитозаном в высокой концентрации (коэффициент однородности для 0,1%

сшитого хитозана = 81% (n = 45); 0,05% сшитого хитозана = 78,2% (n = 48); контроля = 68,9% (n = 45)). Такую же тенденцию наблюдали при измерении высоты проростков. Если увеличение после обработки 0,05% сшитым хитозаном (на 46,2% выше, чем контроль = 1,84 см) было более значительным, чем после обработки 0,1% сшитым хитозаном (на 24,4% выше, чем контроль), коэффициент однородности был выше для группы, обработанной сшитым хитозаном в высокой концентрации (0,1% сшитый хитозан = 75,4%; 0,05% сшитый хитозан = 72,8%, контроль = 61,7%).

По результатам измерений, проведенных через 7 дней после начала эксперимента, обработка сшитым хитозаном в низкой концентрации обеспечивала усиление образования корней в наибольшей степени (0,05% сшитый хитозан: увеличение на 9,5%; 0,1% сшитый хитозан: увеличение на 6,1%, среднее количество корней в контрольной группе: 4,41 на проросток). Это же было обнаружено для увеличения суммарной длины проростков (0,05% сшитый хитозан: увеличение на 7,7%; контроль: 10,05 см). Напротив, наибольшее увеличение биомассы наблюдали после обработки более концентрированной суспензией сшитого хитозана как для корней (0,1% сшитый хитозан: увеличение на 17,1%; 0,05% сшитый хитозан: увеличение на 14,6%), так и для всего проростка (0,1% сшитый хитозан: увеличение на 12,9%; 0,05% сшитый хитозан: увеличение на 8,7%).

Оценка эффектов в отношении роста и развития проростков яровой пшеницы в почвенном субстрате

Семена обрабатывали за 7 дней до посева (солонцеватый чернозем, 500 грамм на пластиковый горшок/12 горшков, повторяли 4 раза, естественное освещение, t =20-22°C, контролируемая влажность почвы). Измеряли энергию прорастания, прорастаемость, высоту и биомассу проростков. Параметры роста регистрировали в течение первых 7 дней. Через 24 часа наблюдали более высокую скорость появления первичных корешков у семян, обработанных сшитым хитозаном, особенно при более высокой концентрации (контроль: 70,8%, относительное увеличение для обработанных семян: 27,1% и 23%). 100% прорастание достигалось после обработки высококонцентрированным сшитым хитозаном, как показано в **таблице 3** ниже и на **фиг. 6**.

Таблица 3

Показатели			Экспериментальные группы		
			A	**B**	**C**
Энергия прорастания, %	Через 1 день	Появление первичных корешков	70,8	97,9	93,8
	Через 2 дня	Нормально проросшие проростки, %	95,9	93,8	100
	Через 3 дня		97,9	100	83,4
Прорастание, %		Через 7 дней	93,8	100	83,4
Длина нормально развитого побега, см		Через 2 дня	0,71 ± 0,05	1,11 ± 0,05	0,85 ± 0,03
		Через 3 дня	2,87 ± 0,13	3,40 ± 0,13	2,92 ± 0,06
		Через 7 дней	18,95 ± 0,30	20,48 ± 0,24	19,31 ± 0,28
Высушенная на воздухе биомасса, мг		Всего проростков	16,65 ± 0,32	18,95 ± 0,41	20,90 ± 0,37
		Корней на проросток	6,93 ± 0,14	8,53 ± 0,23	9,33 ± 0,22

Высокий начальный уровень стимуляции роста в результате обработки 0,1% сшитым хитозаном (56,3% через 2 дня) снижался в 3 раза через 3 дня (сшитый хитозан, 0,05%, в 11,6 раза) и в 2,3 раза через 7 дней. Увеличение биомассы через 7 дней по сравнению с контролем (16,63 мг) было выше как в группе 0,1% обработки (на 14% выше для общей биомассы и на 23,8% для корней), так и в группе 0,05% обработки (на 25,7% выше для общей биомассы и на 35,1% для корней). Обработка 0,05% сшитым хитозаном приводила к увеличению общей биомассы в 1,8 раза и биомассы корней в 1,5 раза.

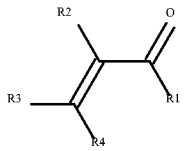
В целом, эти данные подтверждают, что процедуры обработки сшитым хитозаном по настоящему изобретению приводили к значительной стимуляции роста в случае прорастающей яровой пшеницы.

Формула изобретения

1. Способ получения сшитого хитозана, предусматривающий следующие стадии:

a) предоставление хитозана и обеспечение набухания указанного хитозана в растворителе;

b) ацилирование аминогрупп указанного хитозана с помощью акрилового соединения формулы (I):



(I) ,

где R_1 представляет собой галоген или любую другую уходящую группу, которая при удалении обеспечивает ацилирование аминогруппы, такую как 3-гидроксибензотриазоловый сложный эфир, ангидрид (включая смешанные ангидриды), N-гидроксисукцинимид, пентахлорфенол, 2-нитро-4-сульфофеноловые сложные эфиры и другие подобные уходящие группы; R_2, R_3 и R_4 независимо выбраны из H, необязательно замещенного алкила (например, C_1-C_6алкила), необязательно замещенного алкенила (например, C_2-C_6алкенила), необязательно замещенного алкинила (например, C_3-C_6алкинила), необязательно замещенного циклоалкила (например, C_3-C_8циклоалкила), необязательно замещенного циклоалкенила (например, C_4-C_8циклоалкенила), необязательно замещенного циклоалкинила (например, C_5-C_8циклоалкинила), необязательно замещенного гетероциклоалкила; необязательно замещенного арила (например, необязательно замещенного фенила), необязательно замещенного гетероарила и необязательно замещенного арил-C_1-C_6алкила, в частности бензила; причем термин «замещенный» означает группы, замещенные 1-5 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, -COOR', -NR'R", =O, -OR', -COR', -CONR'R", -SR', -SO_3R', -SO_2NR'R ", -SOR', -SO_2R', -NO_2 или -CN; или R_1 и R_2, или R_1 и R_3, или R_1 и R_4 вместе образуют 4-24-членный арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил (например, 6-24-членный арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил, такой как 8-24-членный арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил);

c) введение в реакцию продукта ацилирования со **стадии b)** в присутствии основания (аза-реакция Михаэля);

d) проведение очистки сшитого хитозана, полученного на **стадии c)** (например, от примесей солей и/или апротонного растворителя).

2. Способ по п. 1, где указанный способ дополнительно включает **стадию e)** высушивания продукта со **стадии d)**.

3. Способ по п. 1, где хитозан, предоставленный на стадии a), имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 2000 кДа, в частности, от приблизительно 150 до 2000 кДа.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где R представляет собой галоген, в частности хлор.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где акриловое соединение выбрано из акрилоилхлорида и метакрилоилхлорида.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где указанный способ дополнительно предусматривает **стадию f)** омыления после **стадии c)** или **d)** в щелочных условиях, и полученный продукт может быть дополнительно подвергнут воздействию в ходе осуществления по меньшей мере одной последовательности **стадий b) – c) (или d))**.

7. Сшитый хитозан, получаемый посредством способа по любому из пп. 1-6, или любые его фармацевтически приемлемые соли.

8. Сшитый хитозан, характеризующийся масс-спектрограммой, содержащей пик с соотношением масса/заряд = 252,077 ± 0,01 при электрораспылении положительных ионов, или любые его фармацевтически приемлемые соли.

9. Композиция, содержащая по меньшей мере один сшитый хитозан по любому из пп. 7-8 и по меньшей мере один носитель.

10. Композиция по п. 9, где указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, и при этом указанный носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель.

11. Композиция по п. 9, где указанная композиция представляет собой среду для культивирования клеток или тканей, дополнительно содержащую питательные вещества для клеток или тканей.

12. Композиция по п. 9, где указанная композиция представляет собой ткань для реконструкции.

13. Композиция по п. 9, где указанная композиция представляет собой сельскохозяйственную композицию.

14. Композиция по п. 9, где указанная композиция представляет собой косметическую композицию, и при этом указанный носитель представляет собой косметически приемлемый носитель.

15. Наполнитель для мягких тканей, раневая повязка или ткань для реконструкции, содержащие по меньшей мере один сшитый хитозан по любому из п. 7 или п. 8 или композицию на его основе.

16. Наночастицы, содержащие один сшитый хитозан, соответствующий по меньшей мере одному сшитому хитозану по любому из пп. 7-8.

17. Среда для культивирования, предназначенная для клеток или биологической ткани, содержащая по меньшей мере один сшитый хитозан по любому из пп. 7-8.

18. Применение сшитого хитозана по любому из пп. 7-8 для получения среды для культивирования клеток, или биологического материала, или ткани для реконструкции.

19. Сшитый хитозан по любому из пп. 7-8 или композиция на его основе для применения в предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, выбранного из сердечно-сосудистых состояний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия, патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хрящей, костей, связок или синовиальной капсулы, патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы, заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит, нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или

химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные ожоги, язвы, геморрой, заболевания периодонта и зубов, повреждения твердой мозговой оболочки, такого как после случайного повреждения или хирургии мозга и центральной нервной системы, злокачественных и доброкачественных новообразований, в частности, видов карциномы, видов саркомы, видов лимфомы и видов меланомы, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, опухолей или сосудистых патологий.

20. Способ получения системы доставки лекарственных средств для биоактивного средства, при этом указанный способ включает стадии:

- предоставления сшитого хитозана по любому из п. 7 или п. 8 во влажном или сухом состоянии;

- предоставления-биоактивного средства, подлежащего доставке;

- растворения биоактивного средства в растворителе или сверхкритической жидкости;

- загрузки наночастиц указанного сшитого хитозана по настоящему изобретению путем либо пропитки сшитого хитозана раствором биоактивного средства, либо прямого введения в наночастицы с помощью электрофореза или ускорения электрического поля;

- сбора полученной таким образом композиции или наночастиц, загруженных биоактивным средством (например, лекарственным средством).

21. Способ предупреждения, лечения или снижения выраженности симптомов медицинского нарушения и, в частности, сердечно-сосудистых состояний, таких как виды аритмии сердца, в частности, фибрилляция предсердий и гипертензия, патологий суставов и заболеваний суставов, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, спондилоартрит, и последствий случаев травм, приводящих к повреждению хрящей, костей, связок или синовиальной капсулы, патологий и повреждений глаз, таких как синдром сухого глаза, увеит, глаукома, повреждения роговицы, заболеваний соединительной ткани, таких как волчанка и полимиозит, нарушений со стороны кожи/слизистых оболочек или их повреждений, таких как раны, шрамы, псориаз, акне, экзема, розацеа, ожоги физической или химической природы, в частности, хирургические раны и солнечные ожоги, язвы, геморрой, заболевания периодонта и

зубов, повреждения твердой мозговой оболочки, такого как после случайного повреждения или хирургии мозга и центральной нервной системы, злокачественных и доброкачественных новообразований, в частности, видов карциномы, видов саркомы, видов лимфомы и видов меланомы, послеоперационных осложнений, таких как фистулы и инфекции, опухолей или сосудистых патологий, при этом указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества по меньшей мере одного сшитого хитозана по любому из пп. 7-8 или фармацевтического состава на его основе.

22. Набор, содержащий по меньшей мере один сшитый хитозан по любому из пп. 7-8 или композицию на его основе, например, в лиофилизированной форме.

23. Способ идентификации сшитого хитозана, получаемого посредством способа по любому из пп. 1-6, при этом указанный способ включает стадии:

- предоставления хитозана, подлежащего определению характеристик, в растворителе;

- ацилирования указанного хитозана при интенсивном перемешивании;

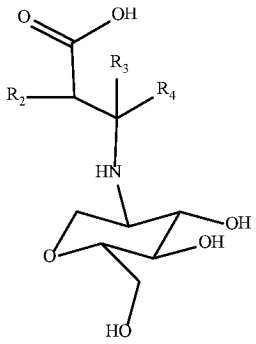
- нейтрализации реакционной среды с помощью основания**;**

- выпаривания растворителей и промывания полученного нейтрализованного продукта;

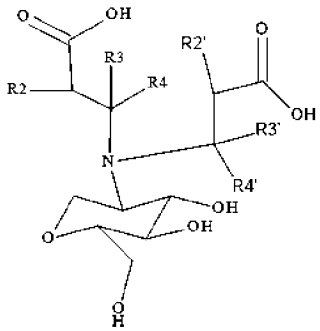
- подвергания продукта кислотному гидролизу с обратным холодильником**;**

- выпаривания реакционной смеси и повторного суспендирования гидролизованных продуктов в слабой кислоте, такой как уксусная кислота;

- определения присутствия или отсутствия продукта, выбранного из продукта, соответствующего формуле (III**a**) или соответствующего формуле (III**b**),



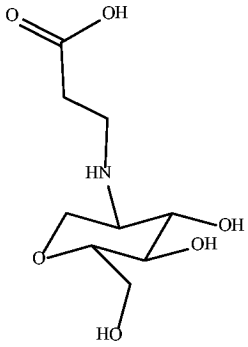
(IIIa);



(IIIb);

где R_2-R_4 определены в любом из предыдущих пунктов, $R_{2'}$-$R_{4'}$ определены соответственно таким же образом, как и R_2-R_4 в любом из предыдущих пунктов, и при этом присутствие продукта формулы (III**a**) и/или (III**b**) указывает на наличие сшитого хитозана, полученного посредством способа по любому из пп. 1-6.

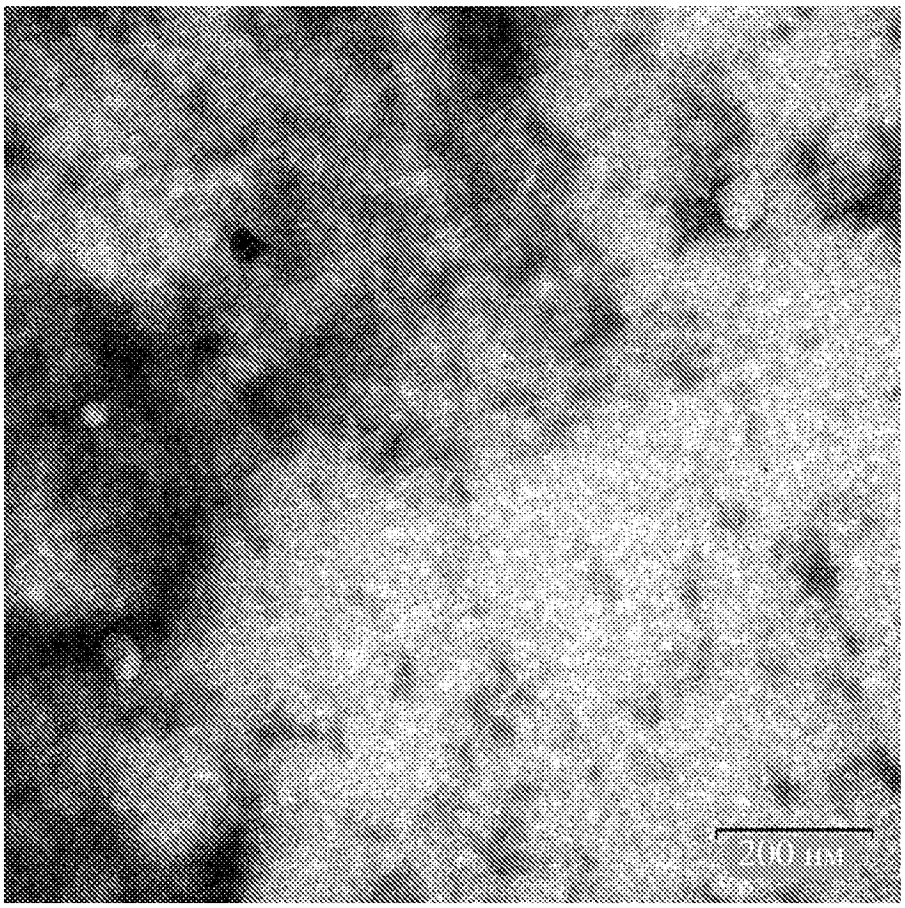
24. Способ по п. 23, где определение присутствия или отсутствия продукта, соответствующего формуле (III), в частности формуле (II),



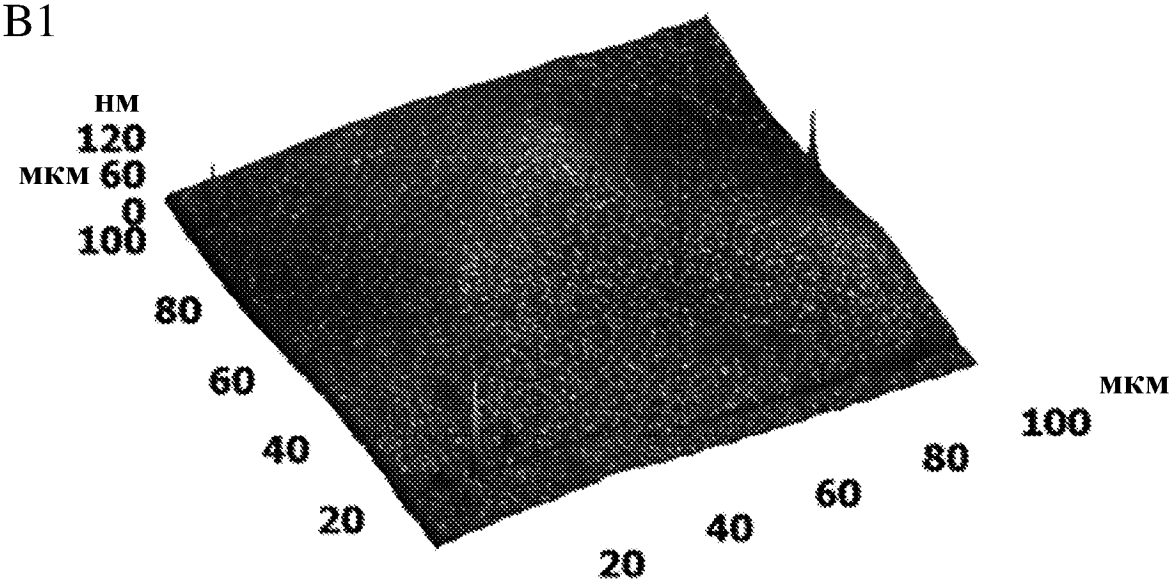
(II),

проводят путем анализа посредством масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

A

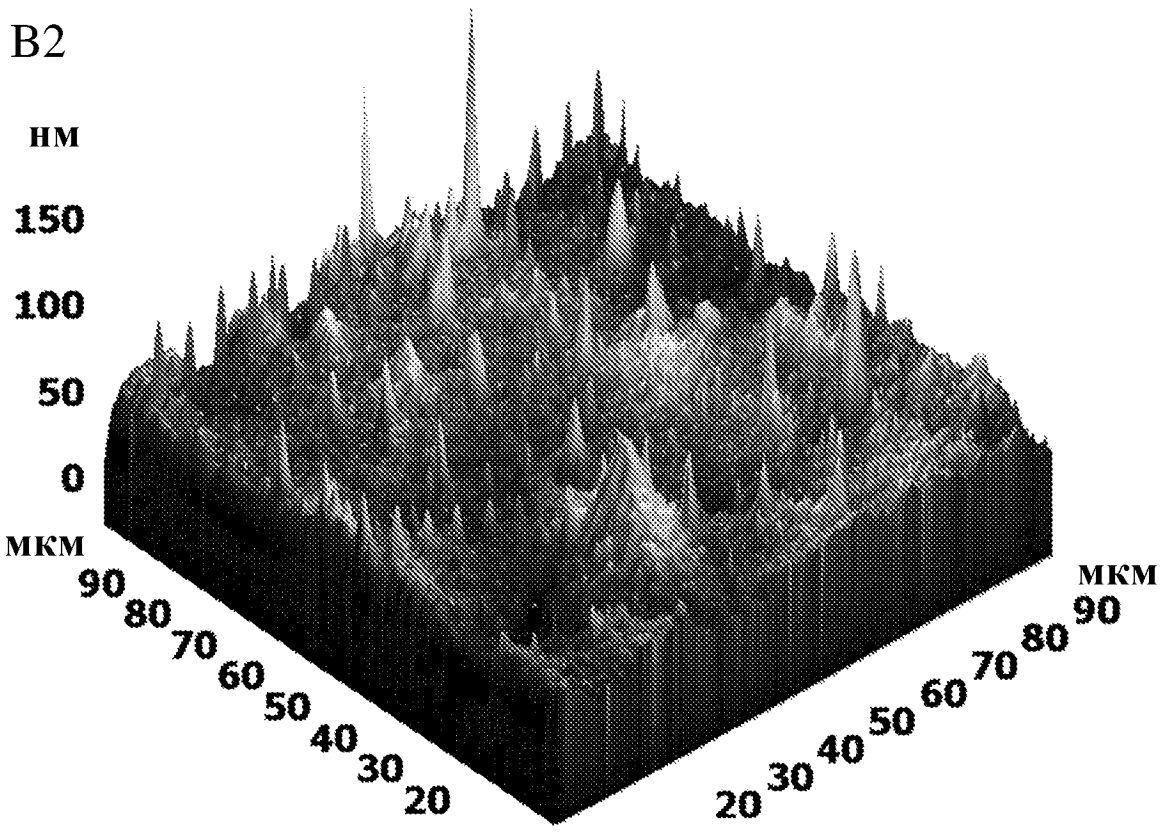


B1

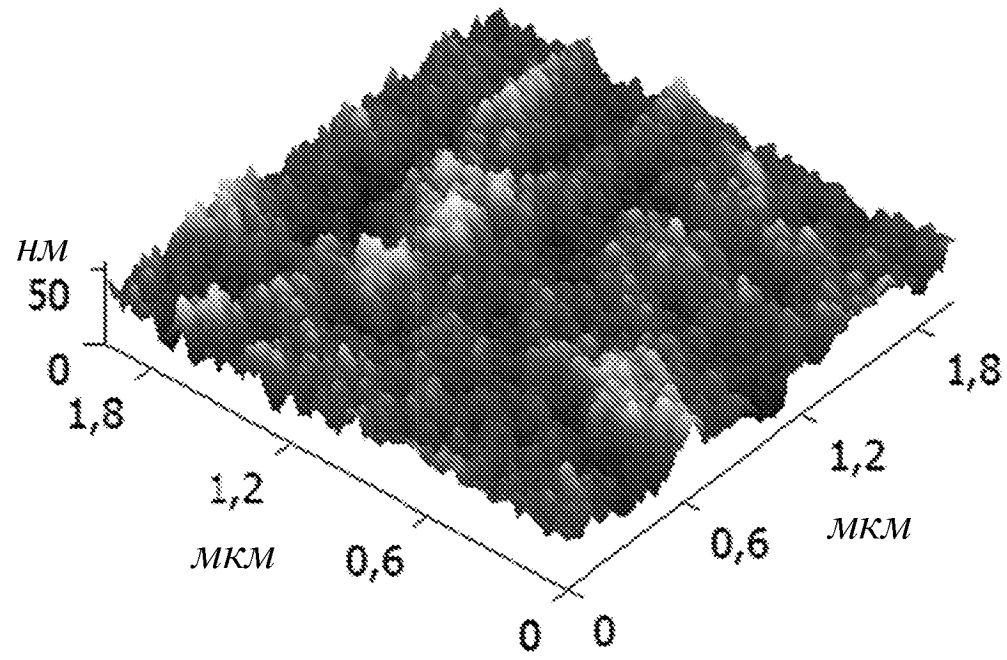


Фигура 1

B2

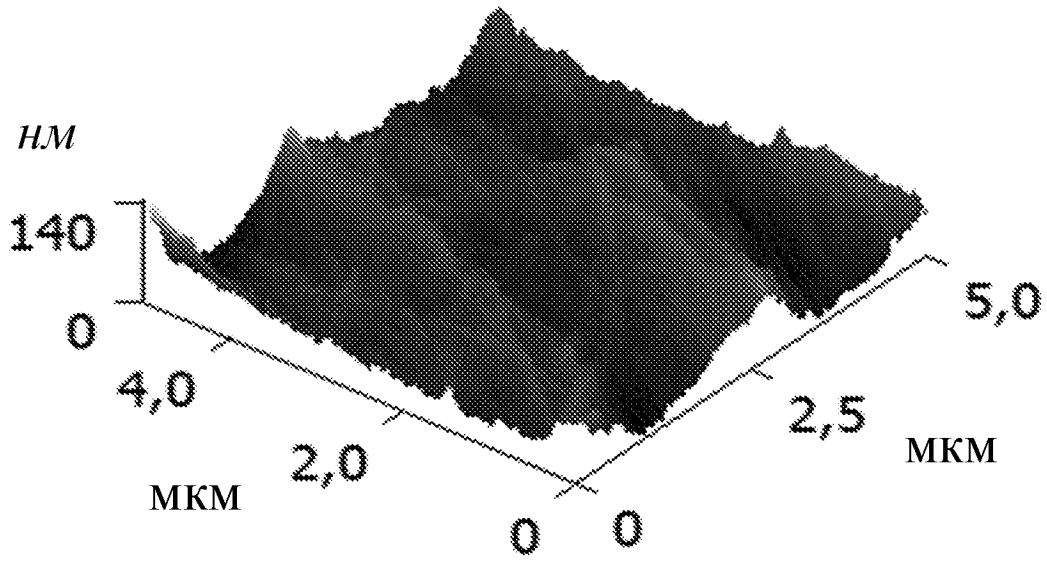


B3

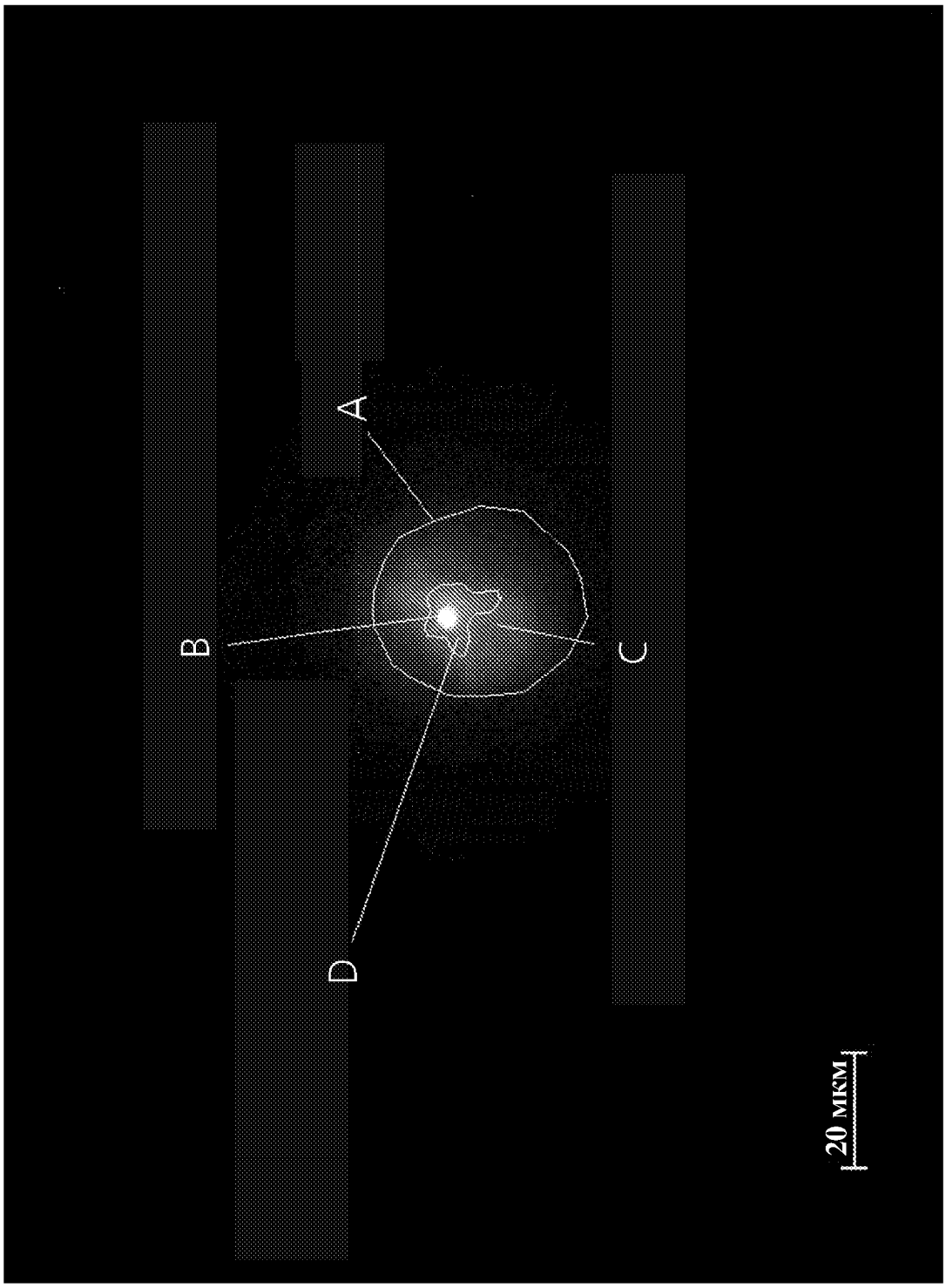


Фигура 1 (продолжение)

B4

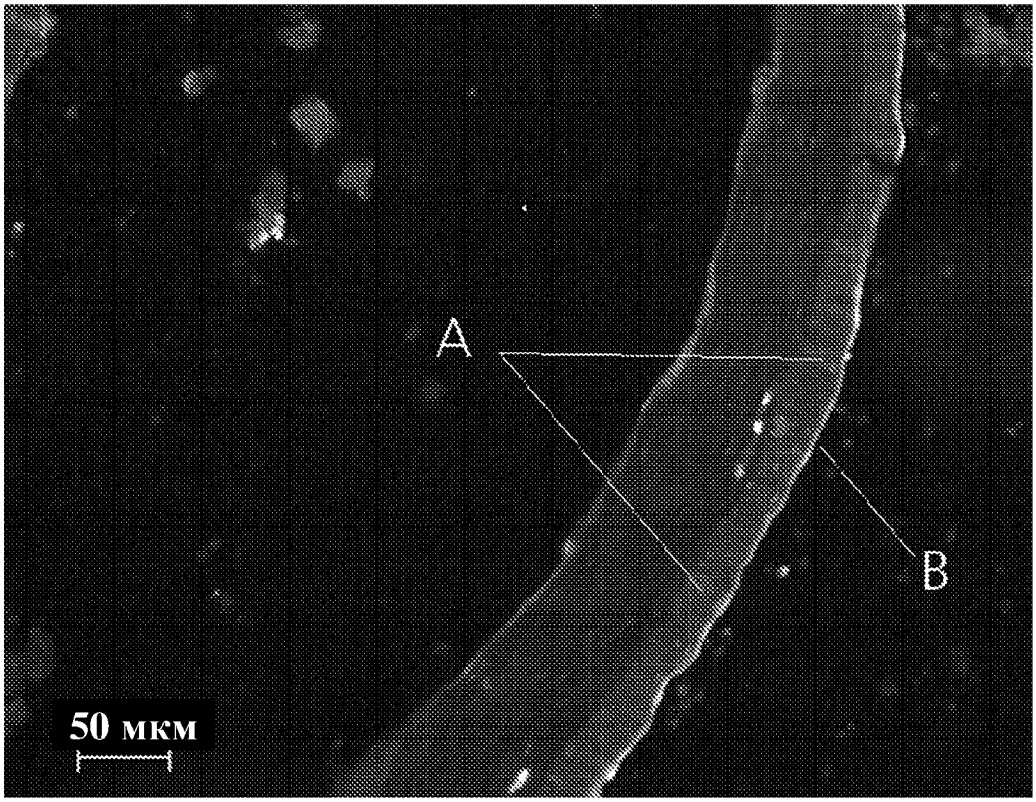


Фигура 1 (продолжение)

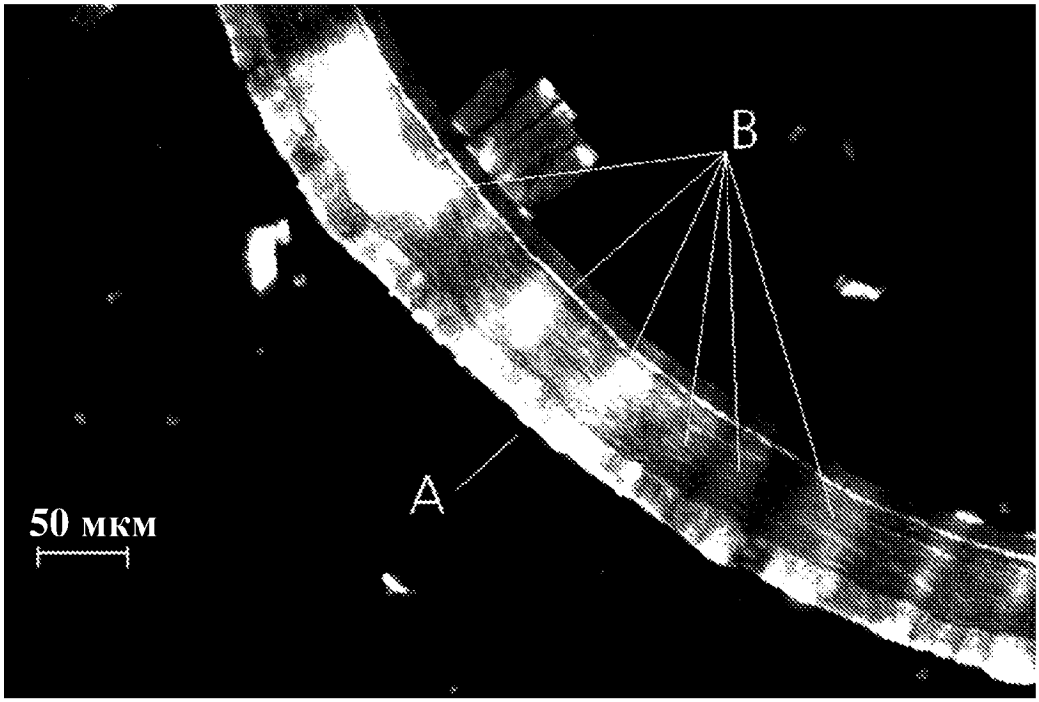


Фигура 2

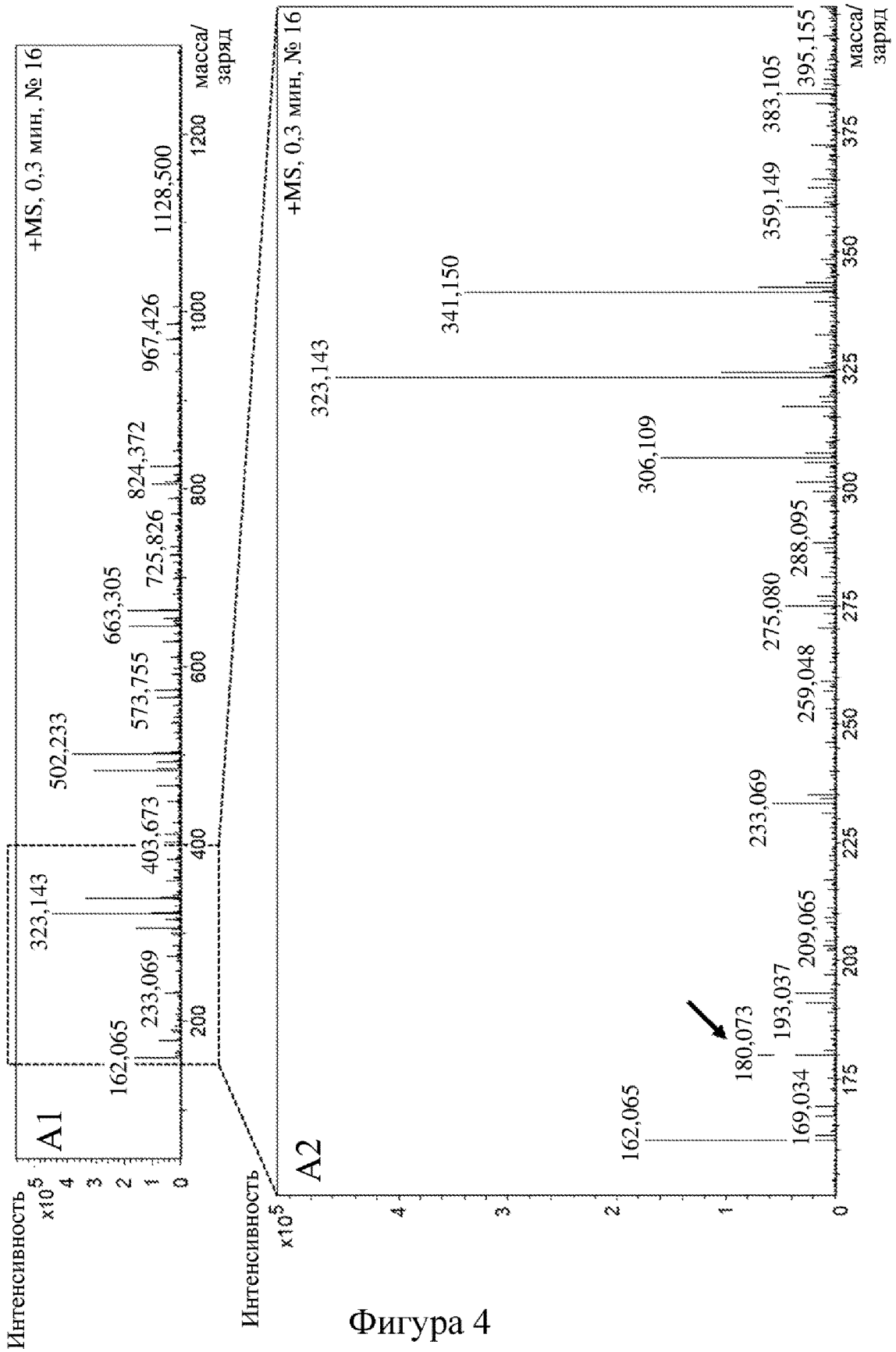
A



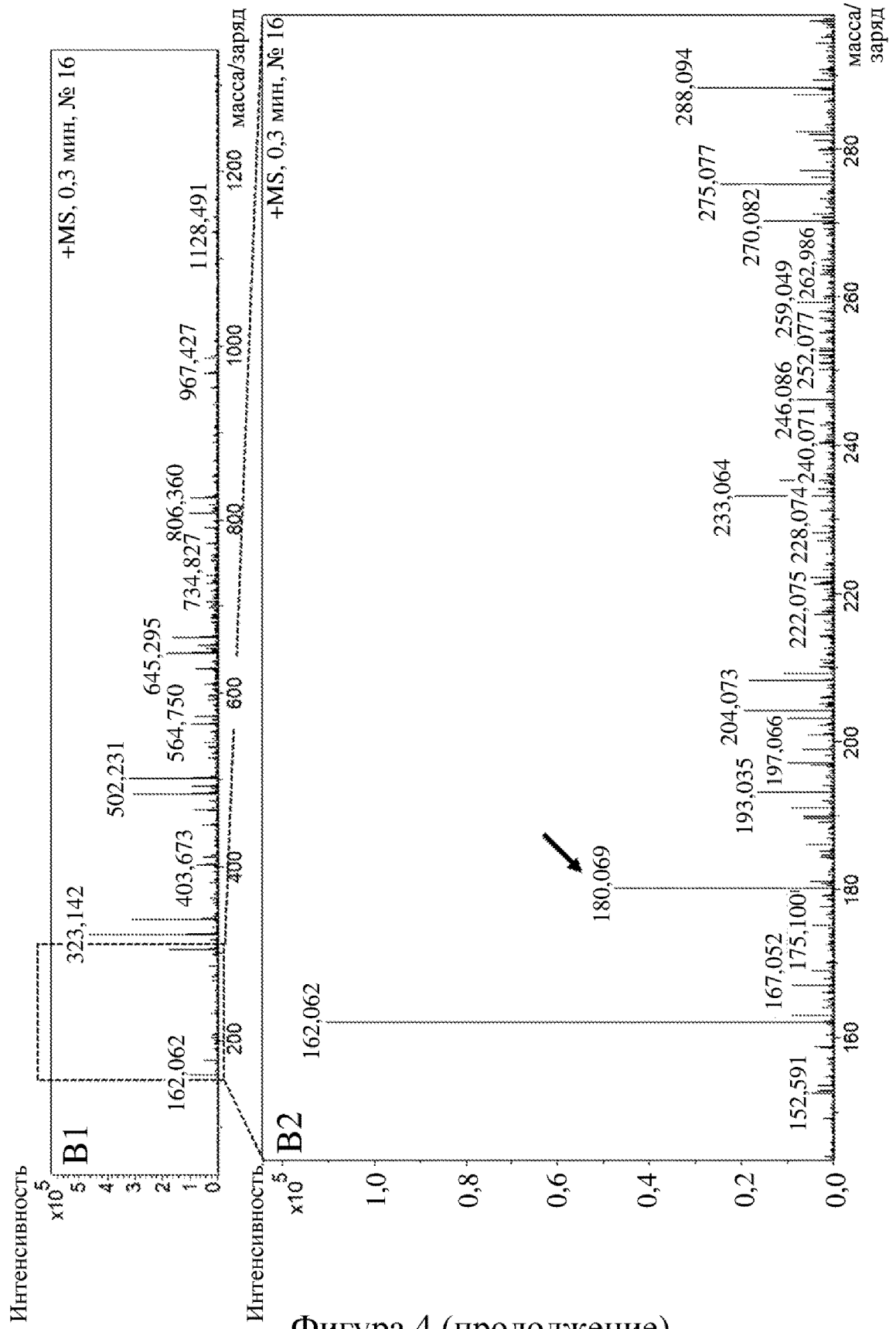
B



Фигура 3

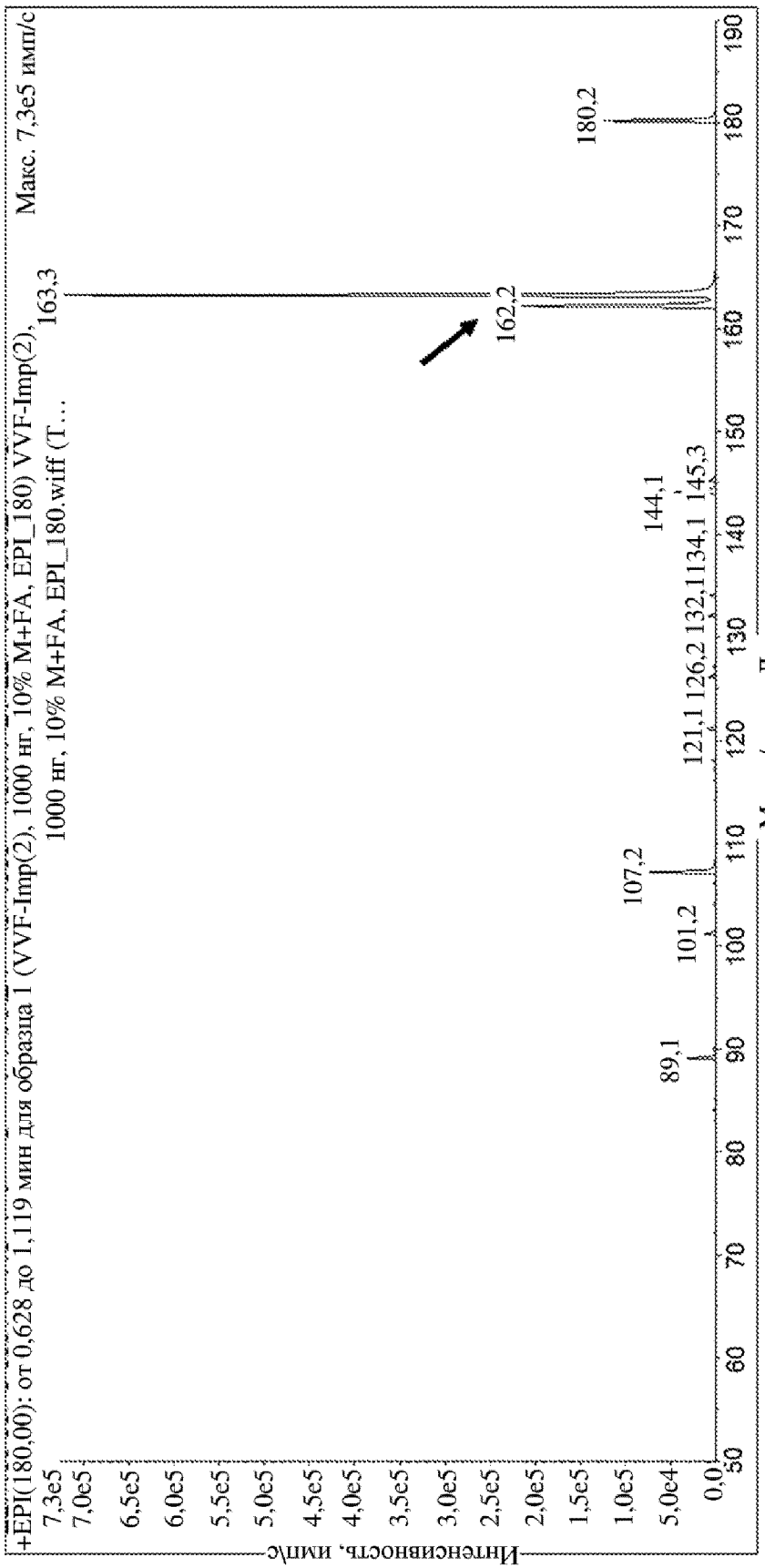

Интенсивность
x10^5
A1
+MS, 0,3 мин, № 16
162,065
233,069
323,143
403,673
502,233
573,755
663,305
725,826
824,372
967,426
1128,500
масса/заряд
Интенсивность
x10^5
A2
+MS, 0,3 мин, № 16
162,065
169,034
180,073
193,037
209,065
233,069
259,048
275,080
288,095
306,109
323,143
341,150
359,149
383,105
395,155
масса/заряд

Фигура 4



Фигура 4 (продолжение)

A

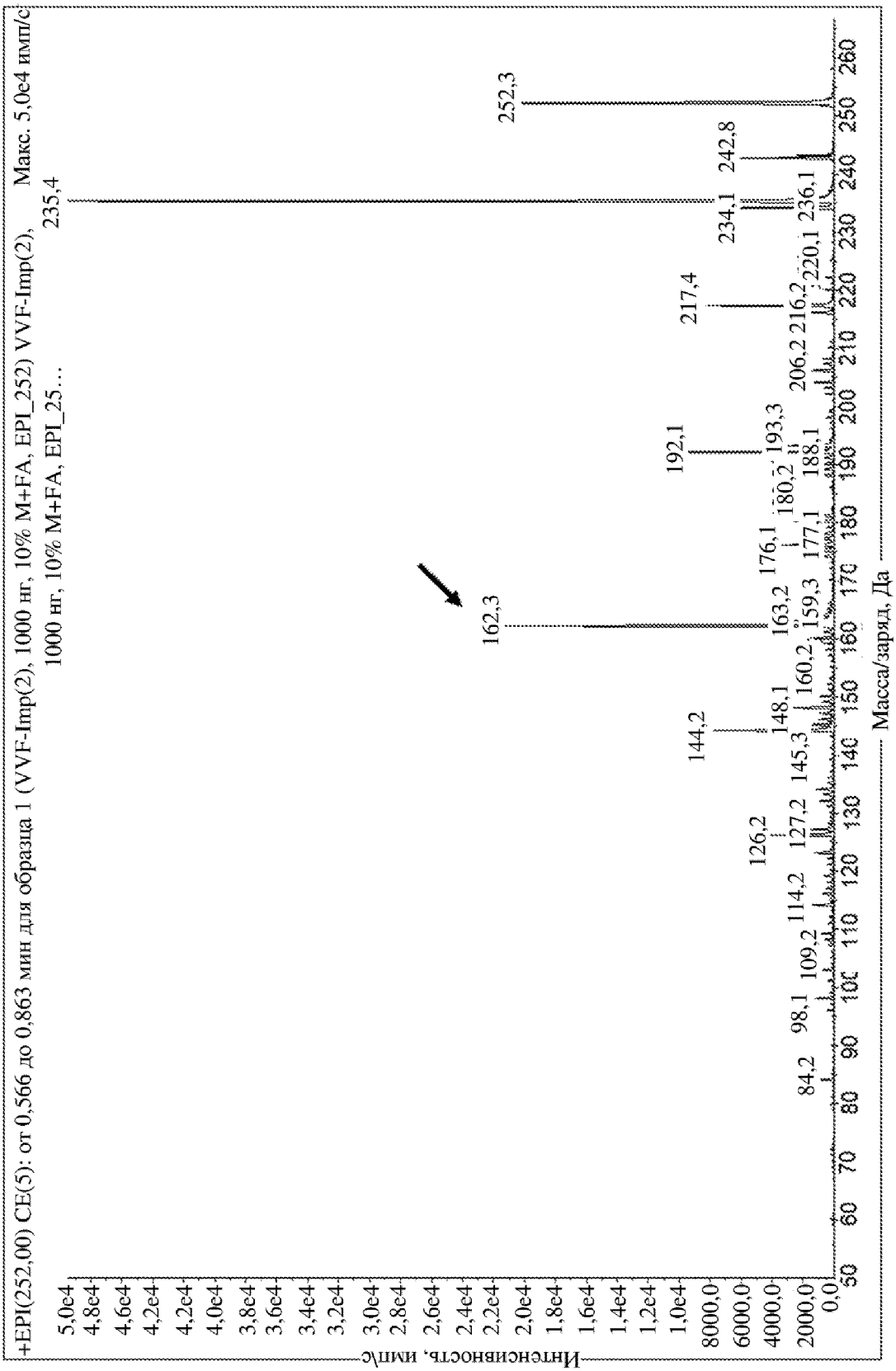

+EPI(180,00): от 0,628 до 1,119 мин для образца 1 (VVF-Imp(2), 1000 нг, 10% M+FA, EPI_180) VVF-Imp(2), 1000 нг, 10% M+FA, EPI_180.wiff (T…
Макс. 7,3e5 имп/с
Интенсивность, имп\с
Масса/заряд, Да
163,3
162,2
180,2
144,1
107,2
101,2
89,1
121,1
126,2
132,1
134,1
145,3

Фигура 5

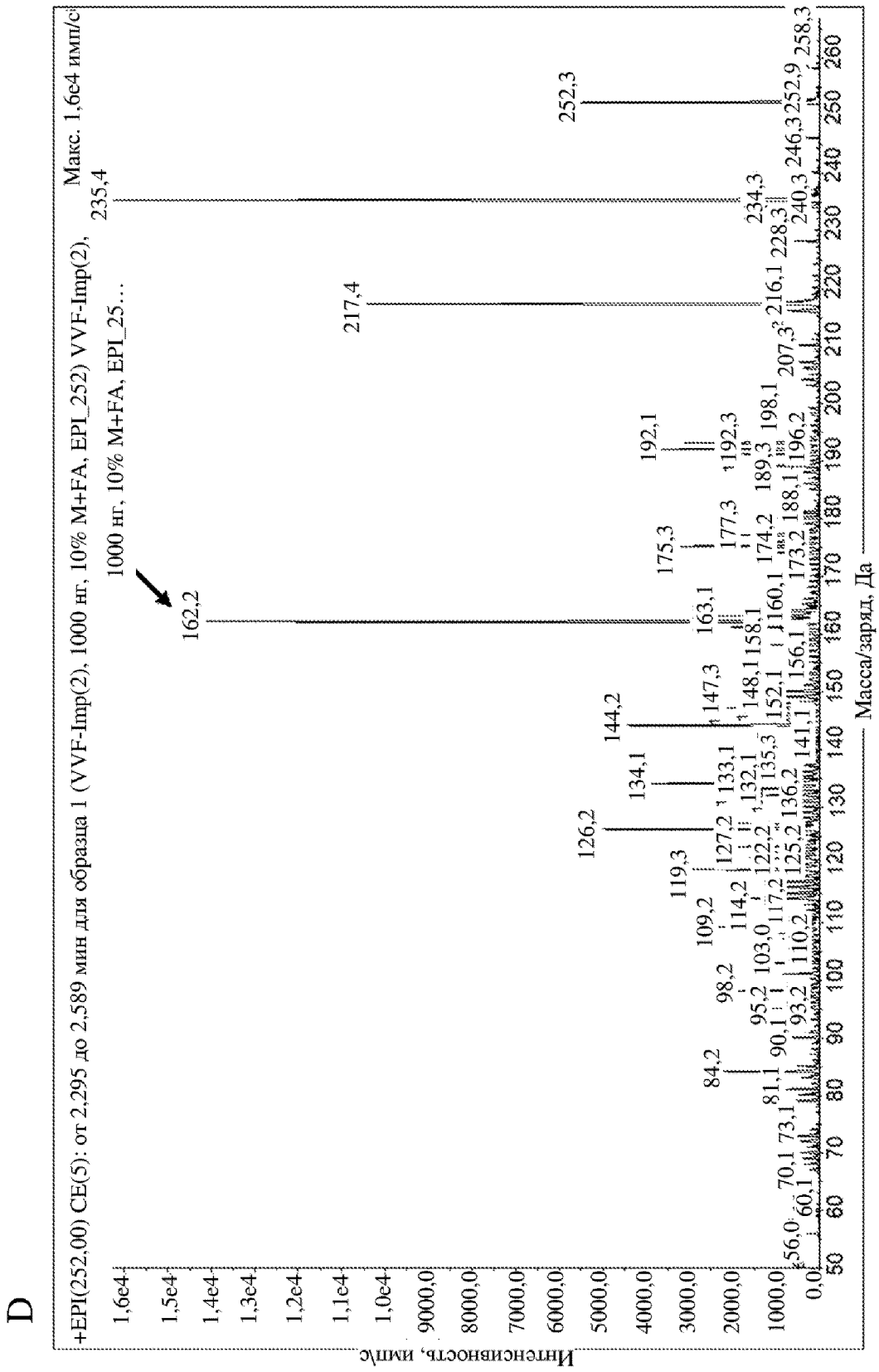
Фигура 5 (продолжение)

B

C

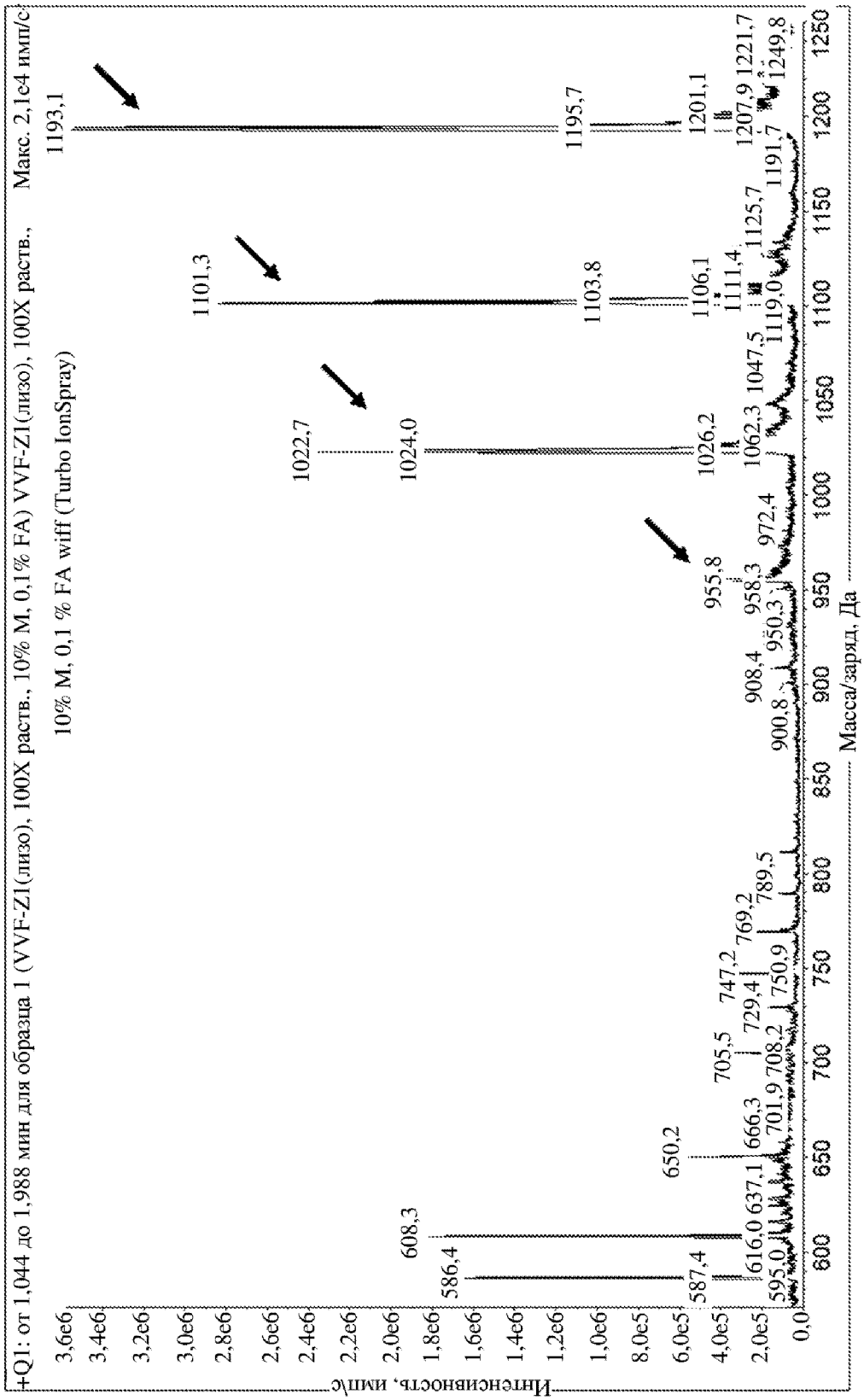


Фигура 5 (продолжение)



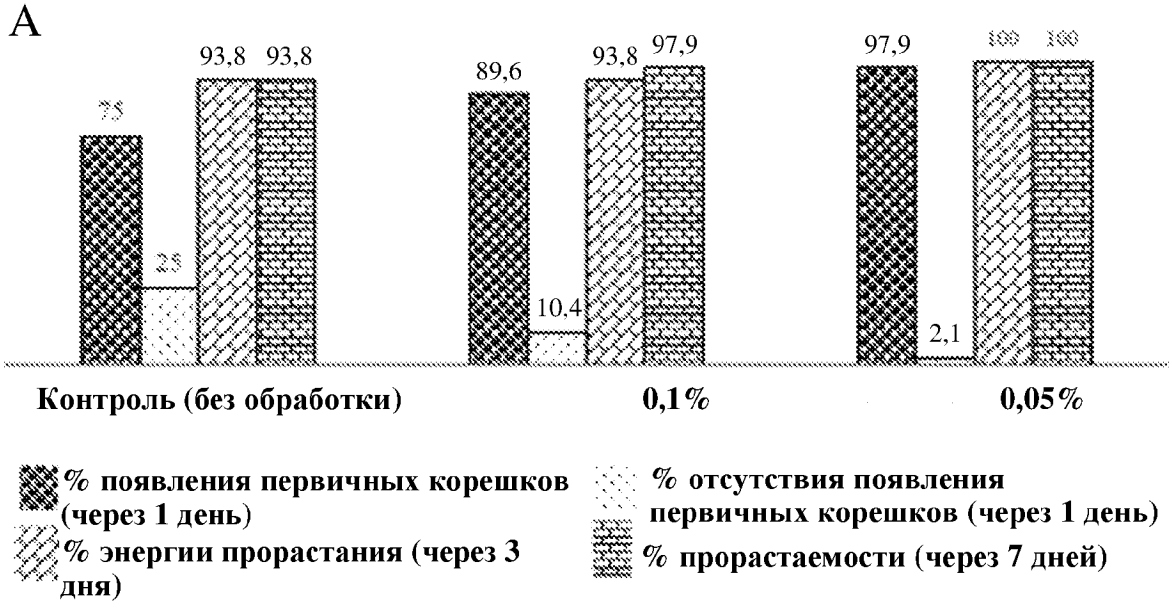
Фигура 5 (продолжение)

E

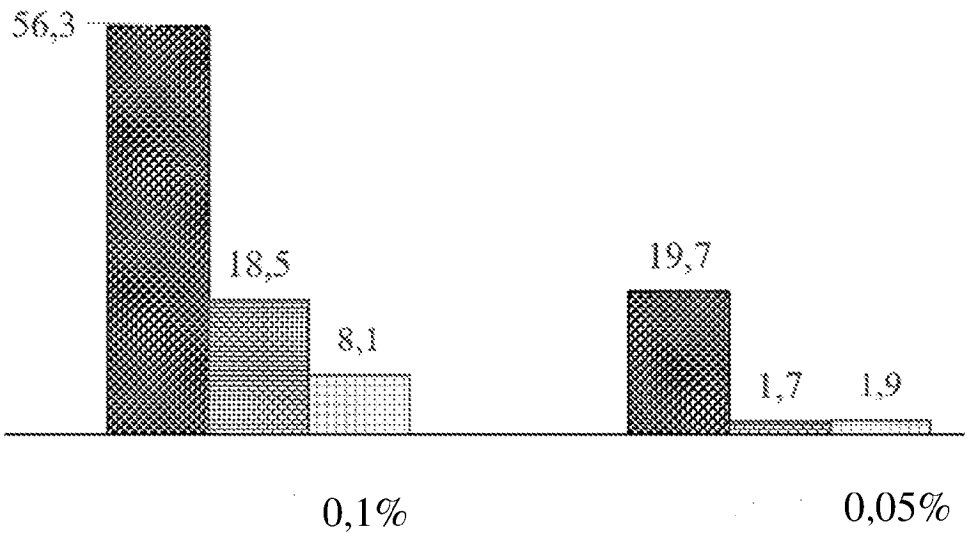


Фигура 5 (продолжение)

A


93,8
93,8
89,6
93,8
97,9
97,9
10,4
2,1
Контроль (без обработки)
0,1%
0,05%
% появления первичных корешков (через 1 день)
% отсутствия появления первичных корешков (через 1 день)
% энергии прорастания (через 3 дня)
% прорастаемости (через 7 дней)

B


56,3
18,5
8,1
19,7
1,7
1,9
0,1%
0,05%
После 2 дней
После 3 дней
После 7 дней

Фигура 6