



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126087** (13) **C2**
(51) МПК
C08B 37/08 (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2020 03180</p> <p>(22) Дата подання заявки: 09.11.2018</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 11.08.2022</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 1761323</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 28.11.2017</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: FR</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.09.2020, Бюл.№ 18</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 10.08.2022, Бюл.№ 32</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2018/080767, 09.11.2018</p>	<p>(72) Винахідник(и): Шоссон Мікаель (BE), Дует Пьер (BE), Готьє Сандрін Емілія (BE), Ваесен Філіп (BE), Шуман Уте (BE), Рокасальбас Гільєрмо (BE)</p> <p>(73) Володілець (володільці): КІОМЕД ФАРМА, Rue Haute Claire 4, 4040 HERSTAL, Belgium (BE)</p> <p>(74) Представник: Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Y.F. POON ET AL., "Cytocompatible Hydrogels Based on Photocrosslinkable Methacrylated O-Carboxymethylchitosan with Tunable Charge: Synthesis and Characterization", ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS, vol 17, no. 13, 03 septembre 2007 (2007-09-03), page 2139-2150, XP055482200, DOI: 10.1002/adfm.200600420, ISSN:1616-301X DI MARIO F ET AL., "Chitin and chitosan from Basidiomycetes", 01 juillet 2008 (2008-07-01), vol 43, no. 1, page 8-12, XP022705830, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2007.10.005, ISSN:0141-8130</p>
---	--

(54) КАРБОКСІАЛКІЛХІТОЗАН

(57) Реферат:

Винахід стосується карбоксіалкілхітозану та композицій, які його містять, способу його отримання і різних його застосувань, зокрема в галузі терапії, ревматології, офтальмології, естетичної медицини, пластичної хірургії, хірургії внутрішніх органів, дерматології або косметичній галузі.

UA 126087 C2

Даний винахід стосується карбоксиалкіл хітозану, композиції, яка його містить, способу його отримання та різноманітного застосування, зокрема, в галузі терапії, ревматології, офтальмології, естетичної медицини, пластичної хірургії, хірургії внутрішніх органів, дерматології або косметики.

5 Актуальний рівень техніки

Похідні хітозану вже відомі, зокрема, описані в патентних заявках Kiomed Pharma, опублікованих під номерами WO 2016/01646 3та WO 2016/016464, і відповідних патентах. Дані патентні заявки присвячені фізичним, хімічним або фізико-хімічним властивостям похідних хітозанів. Разом з тим, залишається необхідність удосконалення даних композицій, зокрема, в контексті терапевтичного лікування, в тому сенсі, що потрібно забезпечити пацієнтам, яким може виявитися необхідним прийом таких композицій, оптимізований терапевтичний ефект і, зокрема, збільшити співвідношення користь/ризик.

10 Отримання розчиненого хітозану можливе шляхом збільшення ступіню ацетилювання (DA), за допомогою реацетилювання грибного хітозану. Дійсно, можна отримати композиції, які є розчинними при фізіологічному рН, шляхом реацетилювання грибного хітозану, однак відмічається наступне:

- дуже швидка деградація in vivo або за аналогічних умов;

- у суб'єкта, якому вводять або імплантують даний хітозан, наприклад, шляхом ін'єкції або внутрішньосуглобної імплантації, виникає імунна реакція;

20 - хітозан не придатний для таргетних застосувань і, відповідно, не гарантує достатньо задовільного терапевтичного застосування хітозану, зокрема, за допомогою ін'єкції або внутрішньосуглобної імплантації.

Існують різні публікації, які стосуються карбоксиалкілювання хітозану і, зокрема, карбоксиметилювання хітозану, головним чином, з метою солюбілізації хітозану. У теорії, хітозан має формулу, яка не містить N-ацетил-глюкозамінової ланки, але на практиці хітозан отримують з хітину, який, зі свого боку, містить N-ацетил-глюкозамінові ланки, і хітозан має певний ступінь ацетилювання (DA), який виражається як частка N-ацетил-глюкозамінових ланок в хітозані. Ступінь ацетилювання (DA) хітозану, як правило, є низьким. Високий, зокрема вище 30 %, він, як правило, у реацетильованого хітозану.

30 Крім того, китайська патентна заявка CN1431229A стосується карбоксиметильованих похідних хітозану, зокрема, їх гідратуючих властивостей, однак зазначена патентна заявка обмежується цією відмінною ознакою.

Карбоксиметилювання хітину тваринного походження, зокрема, отриманого з ракоподібних, також розглядалося в попередньому рівні техніки. Однак хітин, джерелом походження якого є ракоподібні, погано піддається заміщенню; зокрема, необхідно його заморозити і збільшити лужність для забезпечення можливості його заміщення (див., наприклад, китайську заявку на патент CN106474569). Цей процес складно реалізувати і, зокрема, здійснити у промисловому масштабі. З іншого боку, такий процес заміщення хітину, отриманого з ракоподібних, є витратним з точки зору енергії, має низьку відтворюваність, і його полімер може розкладатись і ацетильні групи N-ацетил-глюкозамінових ланок значною мірою гідролізуватись, що при цьому також є важко контрольованим.

Мета винаходу

45 Метою винаходу є вирішення технічної проблеми, пов'язаної із забезпеченням відповідного похідного хітозану, яке є придатним для застосування для людей або тварин, зокрема, в галузі терапії, ревматології, офтальмології, естетичної медицини, пластичної хірургії, хірургії внутрішніх органів, дерматології або косметики.

Більш конкретно, метою винаходу є вирішення технічної проблеми, пов'язаної із забезпеченням відповідного похідного хітозану, яке є придатним для застосування для людей або тварин в терапевтичній галузі, і є, зокрема, придатним як віскосуплемент і, зокрема, може бути введене в синовіальну рідину або змішане з нею.

Зокрема, метою винаходу є вирішення технічної проблеми, пов'язаної із забезпеченням відновленої синовіальної рідини, тобто забезпечення композиції, яка відновлює властивості суглоба, наприклад, шляхом наділення його здатністю змащувати поверхні хряща.

55 Ще однією метою винаходу є вирішення технічної проблеми, пов'язаної із забезпеченням похідного хітозану або композиції, яка його містить, яка проявляє потрібні властивості і сумісність в поєднанні з синовіальною рідиною і, зокрема, з синовіальною рідиною суб'єкта людини або тварини, наприклад, для лікування артикулярної або суглобової патології, або для лікування погіршення зазначеної синовіальної рідини.

60 Метою винаходу також є вирішення технічної проблеми, пов'язаної із забезпеченням похідного хітозану або композиції, яка його містить, яка обмежує імунну реакцію суб'єкта і,

зокрема, суб'єкта людини або тварини, що отримує таку введення, наприклад, шляхом ін'єкції похідного хітозану або композиції, яка його містить.

5 Ще однією метою винаходу є також вирішення технічної проблеми, пов'язаної із забезпеченням похідного хітозану або композиції, яка його містить, характеристики яких мають низьку варіабельність залежно від рН.

Метою винаходу також є вирішення технічної проблеми, пов'язаної із забезпеченням похідного хітозану або композиції, яка його містить, яка має відповідну осмоляльність і значення рН, яке вважається придатним для її застосування в контакт з тканинами суб'єкта людини або тварини, і є прийнятною з точки зору тривалості життя *in situ*, імунологічної реакції і/або реакції на чужорідне тіло і біомеханічних властивостей, залежно від цільового терапевтичного показання, зокрема, в контексті регенеративної медицини.

Опис винаходу

15 Несподівано було виявлено, що запропоноване даним винаходом похідне хітозану дозволяє вирішити щонайменше одну, а ще краще, всі технічні проблеми, описані вище в цьому документі.

Зокрема, було виявлено, що похідне хітозану грибного походження дозволяє вирішити щонайменше одну, а ще краще, всі описані або запропоновані технічні проблеми. Зокрема, похідне хітозану грибного походження забезпечує засіб обмеження імунної відповіді суб'єкта, якому вводиться або похідне хітозану, або композиція, яка його містить, як правило, шляхом ін'єкції або імплантації.

20 Відповідно до першого аспекту, винахід стосується карбоксиалкіл хітозану грибного походження, який містить глюкозамінові ланки, N-ацетілглюкозамінові ланки і глюкозамінові ланки, заміщені карбоксиалкільною групою, причому вказаний карбоксиалкіл хітозан бажано має ступінь заміщення карбоксиалкільною групою, виражений у вигляді кількості молей замісника відносно кількості молей всіх ланок, що становить понад 20 %.

Увага також приділяється похідному хітозану або заміщеному похідному хітозану.

30 Зокрема, було показано, що похідне хітозану, яке демонструє статичну електрику (яка характеризується його дзета-потенціалом) в діапазоні рН, що приблизно відповідає рН середовища, в яке його вводять, і, зокрема, при рН, що дорівнює 7,5, тобто нижче певного значення, дозволило вирішити щонайменше одну, а ще краще, всі з поміж описаних або запропонованих технічних проблем. Зокрема, таке похідне хітозану забезпечує засіб обмеження імунної відповіді у суб'єкта, якому вводять похідне хітозану або композицію, яка його містить, як правило, шляхом ін'єкції або імплантації.

35 Відповідно до другого аспекту, винахід стосується похідного хітозану, що має глюкозамінові ланки, N-ацетил-глюкозамінові ланки та глюкозамінові ланки, заміщені карбоксиалкільною групою, при цьому зазначений карбоксиалкіл хітозан має дзета-потенціал, який вимірюється при рН 7,5, що дорівнює -10 мВ або менше, чи бажано дорівнює -15 мВ або менше.

Хітозан, наприклад, згадується в Chemical Abstracts Service за реєстраційним номером (номер CAS) 9012-76-4.

40 Джерелом походження запропонованого винаходом хітозану, який використовується у винаході, бажано є гриби, і бажано він отриманий з міцелію гриба типу Ascomycetes, і, зокрема, з *Aspergillus niger*, і/або з гриба Basidiomycetes, і, зокрема, *Lentinula edodes* (шиїтаке) і/або *Agaricus bisporus* (печериця). Бажано хітозан отриманий з *Agaricus bisporus*. Хітозан бажано має високий ступінь чистоти, тобто має надзвичайно низький вміст домішок, зумовлених його грибним походженням або процесом отримання і мікробіологічну якість, яка робить можливим його застосування як імплантат або фармацевтичну композицію. Одним із способів отримання хітозану є спосіб, описаний в патентах WO 03/068824 (EP 1483299; US 7556946).

45 Як правило, хітин поміщають в водну суспензію в присутності гідроксиду натрію, після чого середовище нагрівають до високої температури протягом різних періодів часу, які залежать від бажаної молекулярної маси. Потім хітозан очищають шляхом солюбілізації в кислому середовищі і осаджують в лужному середовищі, потім промивають і сушать.

Бажано хітозан має достатній ступінь чистоти, придатної для фармацевтичного застосування.

55 Хітозан переважно очищають і потім, бажано, висушують. Після очищення запропонований даним винаходом спосіб може передбачати стадію висушування карбоксиалкіл хітозану, потім необов'язково його подрібнення з отриманням порошку. Карбоксиалкіл хітозан може бути висушений, наприклад, шляхом випаровування води, наприклад, за допомогою процесу розпилювального висушування, процесу з псевдозрідженим шаром або за допомогою термічного висушування в вакуумі або за атмосферного тиску, або навіть шляхом ліофілізації.

Карбоксиалкіл хітозан може бути солубілізованим у водному розчині і, наприклад, у воді фармацевтично прийнятної якості, придатної для ін'єкцій або імплантації в організм і, зокрема, в організм людини.

5 Отриманий хітозан може мати різну молекулярну масу, яка, як правило, знаходиться в діапазоні від 10000 до 500000.

Відповідно до одного варіанту середня молекулярна маса становить від 20000 до 60000.

Відповідно до іншого варіанту середня молекулярна маса становить від 60000 до 100000.

Відповідно до іншого варіанту середня молекулярна маса становить від 100000 до 120000.

10 Відповідно до іншого варіанту середня молекулярна маса становить від 120000 до 150000.

Відповідно до іншого варіанту середня молекулярна маса становить від 150000 до 220000.

Відповідно до іншого варіанту середня молекулярна маса становить від 220000 до 300000.

Відповідно до іншого варіанту середня молекулярна маса становить від 300000 до 500000.

У випадку, коли хітозан є поперечно-зшитим, зрозуміло, що молекулярна маса поперечно-зшитого полімеру може бути набагато більшою.

15 Можна гідролізувати хітозан, щоб зменшити його молекулярну масу.

Переважно в даному документі середня молекулярна маса є середньою молекулярною масою за в'язкістю (M_v), розрахованою виходячи з в'язкості за рівнянням Марка-Хаувінка. Характеристична в'язкість вимірюється за допомогою капілярної віскозиметрії з використанням капілярного віскозиметра типу Ubbelohde відповідно до способу, описаного в монографії 2.2.9 Європейської фармакопеї. Вимірювання часу витікання розчину крізь відповідну капілярну трубку (Lauda, наприклад, капілярну трубку Ubbelohde 510 01 діаметром 0,53 мм) виконується за допомогою автоматичного віскозиметра I-Visc (Lauda), спочатку за початкової концентрації хітозану, потім для декількох розбавлень, наприклад, відповідно до рекомендацій в монографії 2.2.9. Понижена характеристична в'язкість виводиться для кожної з концентрацій. Понижену в'язкість наносять на графік залежно від температури, і значення за концентрації 0 екстраполюють, щоб вивести з неї характеристичну в'язкість. Наприклад, необхідно побудувати графік пониженої в'язкості (h_{red} в мл/г) і розбавлень залежно від концентрації C і розбавлень (г/мл) відповідно до формули 5.

Формула 2. $[h_{red}] = (t_1 - t_0) - (1 - C)$.

30 Щоб розрахувати середню віскозиметричну масу, застосовується рівняння Марка-Хаувінка з константами k і α , рекомендованими Rinaudo et al. (в: Int J Biol Macromol, 15, 281, 1993), відповідно до ступеня ацетилювання (DA) хітозану, згідно з однією з наступних трьох формул.

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

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

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

Для проміжних значень DA виконується лінійна інтерполяція для розрахунку середньої віскозиметричної маси (M_v).

40 Бажано використовувати хітозан, який має середню молекулярну масу в діапазоні від 120000 до 150000 або навіть в діапазоні від 150000 до 220000, або більше того, навіть в діапазоні від 220000 до 300000, або навіть вище 300000, чи яка зазвичай становить до 500000.

Також, можна виміряти кінцеву молекулярну масу карбоксиалкіл хітозану: наприклад, можна виміряти його характеристичну в'язкість за допомогою капілярної в'язкості, отримуючи з неї середню молекулярну масу (M_w) (попередньо визначивши параметри K і α карбоксиалкіл хітозану), або хроматографічним методом, наприклад, гель-проникаючою хроматографією.

45 Як правило, в запропонованому винаході карбоксиалкіл хітозані глюкозамінові ланки є D-глюкозаміновими ланками (D-глюкозаміновими ланками, N-ацетил-D-глюкозаміновими ланками і при цьому щонайменше одна з поміж D-глюкозамінових ланок і N-ацетил-D-глюкозамінових ланок є зміщеною).

50 Відповідно до одного варіанту заміщений хітозан має заміщення тільки D-глюкозамінових ланок.

Відповідно до іншого варіанту заміщений хітозан має заміщення D-глюкозамінових і N-ацетил-D-глюкозамінових ланок одночасно, в яких карбоксиалкільна група ковалентно зв'язана з аміногрупами тільки хітозану Відповідно до одного варіанту або одночасно з аміногрупами і гідроксильними групами хітозану відповідно до іншого варіанту.

55 Заміщення є, як правило, тільки частковим, не всі ланки є обов'язково заміщеними.

Відповідно до одного варіанту реалізації ступінь заміщення D-глюкозамінових ланок, що виражається як кількість молей D-глюкозамінових ланок відносно кількості молей всіх ланок (D-глюкозамінових і N-ацетил-D-глюкозамінових ланок, заміщених або незаміщених) заміщеного хітозану, становить від 30 % до 250 %.

Відповідно до одного варіанту реалізації ступінь заміщення карбоксиалкільною групою становить понад 50 %, що виражається як кількість молей замісника відносно кількості молей всіх ланок.

Відповідно до одного варіанту реалізації ступінь заміщення D-глюкозамінових ланок, що виражається як кількість молей D-глюкозамінових ланок відносно кількості молей всіх ланок (D-глюкозамінових і N-ацетил-D-глюкозамінових ланок, заміщених або незаміщених) заміщеного хітозану, становить від 50 % до 200 %, а ще краще, більше 70 %.

Відповідно до одного варіанту реалізації ступінь заміщення карбоксиалкільною групою становить менше 80 %, що виражається як кількість молей замісника відносно кількості молей всіх ланок.

Як правило, заміщення здійснюється шляхом зв'язування ковалентним зв'язком.

Відповідно до одного варіанту карбоксиалкіл хітозан є N, O-карбоксиалкіл хітозаном. Частина ланок, заміщених карбоксиалкільною групою в O-положенні (O3 або O6 глюкозамінових і/або N-ацетил-глюкозамінових ланок) і/або в N-положенні (глюкозамінових ланок) варіюється. Ступінь заміщення може, таким чином, становити понад 100 %.

Бажано ступінь заміщення (DS) і ступінь ацетилювання (DA) карбоксиалкіл хітозану визначають за допомогою твердофазної ^{13}C -спектроскопії ядерного магнітного резонансу (ЯМР) з використанням спектрометра Bruker Spectrometer (Avance III HD 400 МГц), оснащеного датчиком PH MAS VTN 400 SB BL 4 NP/H. Наприклад, спектр реєструють за температури навколишнього середовища, при цьому час релаксації становить від 1 до 8 секунд і кількість сканувань становить від 64 до 512. Площі сигналів вуглецю визначають після деконволюції. Розглядаються наступні атоми вуглецю: "ацетил CH_3 " (метильний вуглець ацетильної групи N-ацетил-глюкозамінових ланок, заміщених або незаміщених), "C1" (вуглець в положенні 1 глюкозамінових і N-ацетил-глюкозамінових ланок) і "C=O" (карбонільний вуглець карбоксиметильного замісника і карбонільний вуглець C=O ацетильної групи N-ацетил-глюкозамінових ланок, заміщених або незаміщених). Щоб визначити DS за даного карбоксиалкіл хітозану, необхідно також реєструвати спектр ЯМР на ядрах ^{13}C попередника хітозану цього карбоксиалкіл хітозану. Виходячи із спектра попередника хітозану розраховується "співвідношення CSU", тобто співвідношення площі сигналу групи "ацетил CH_3 " (метильний вуглець ацетильної групи N-ацетил-глюкозамінових ланок) до площі сигналу "C = O" (карбонільний вуглець ацетильної групи N-ацетил-D-глюкозамінових ланок). DA карбоксиалкіл хітозану розраховують за формулою 1, і DS за формулою 2, де I є площею сигналу розглянутого вуглецю.

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

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

DA і DS можуть бути визначені за допомогою інших відомих способів для карбоксиалкіл хітозанів, наприклад, за допомогою протонного ЯМР у водному середовищі, з використанням магнітно-резонансного спектрометра, наприклад, відповідно до способу, описаного Liu et al. (B: Carb Polym 137, 600, 2016), наприклад, за допомогою попереднього гідролізу карбоксиалкіл хітозану шляхом додавання до нього концентрованого розчину дейтерованої соляної кислоти перед аналізом.

Якщо існує інший спосіб ЯМР, який є більш вигідним для надійної оцінки ступеня заміщення, слід використовувати цей альтернативний спосіб. Вищевказані способи повинні бути адаптовані фахівцем в даній галузі стосовно підготовки зразка та інтегрованих сигналів, зокрема, залежно від розрізнення, стійкості і положення протонів сигналів, які використовуються для розрахунку ступеня заміщення.

Ступінь карбоксиалкілювання хітозану бажано може варіюватися від 20 % до 250 %, бажано від 50 % до 200 % і, наприклад, від 70 % до 170 %, що виражається як кількість молей карбоксиалкілу відносно кількості молей всіх ланок.

Відповідно до одного варіанту ступінь карбоксиалкілювання хітозану бажано може варіюватися від 40 % до 130 % і, наприклад, від 70 % до 130 %, що виражається як кількість молей карбоксиалкілу відносно кількості молей всіх ланок.

Ступінь заміщення хітозану зазвичай корелює з масовим співвідношенням вихідних реагентів відносно хітозану на початку реакції. Серед карбоксиалкілюючих агентів можна згадати хлориди кислот (або їх солі, наприклад, монохлорацетат натрію), наприклад, ті, які

Відповідно до одного конкретного варіанту заміщений хітозан бажано має середню молекулярну масу від 220000 до 300000, ступінь заміщення в діапазоні від 90 % до 200 %, а краще від 90 % до 150 %, і ступінь ацетилювання в діапазоні від 50 % до 75 %, причому молекулярна маса бажано записана до заміщення.

5 Відповідно до одного варіанту карбоксиалкіл хітозан є поперечно-зшитим. Таким чином, кілька ланцюгів хітозану можуть бути поперечно зшитими, наприклад, шляхом реакції зі зшиваючим агентом, таким як, наприклад, зшиваючі агенти, які використовуються для поперечного зшивання полісахаридів, такі як, наприклад, геніпін, бутилгліциділовий ефір, глутаральдегід, епіхлоргідрин, 1-бром-3,4-епоксибутан, 1-бром-4,5-епоксипентан, 1-хлор-2,3-епітіопропан, 1-бром-2,3-епітіо-пропан, 1-бром-3,4-епітіобутан, 1-бром-4,5-епітіопентан, 2,3-дибромпропанол, 2,4-дибромбутанол, 2,5-дибромпентанол, 2,3-дибромпропантиол, 2,4-дибромбутантиол і 2,5-дибромпентантиол епіхлоргідрин, 2,3-дибромпропанол, 1-хлор-2,3-епітіопропан, диметиламінопропілкарбодіімід, окислений декстран, галова кислота, епігалокатехін галлат, куркумін, дубильні кислоти або навіть дізоціанатні сполуки, такі як гексаметилендізоціанат або толуолдізоціанат.

15 При використанні поперечно-зшитого карбоксиалкіл хітозану молекулярна маса може бути дуже високою.

20 Шляхом заміщення хітозану можна приготувати розчин карбоксиалкіл хітозану, який є розчинним у водному середовищі, рН якого варіює в широких межах, тоді як незаміщений хітозан розчинний тільки при рН нижче 5,5-6,5. Таким чином, карбоксиалкіл хітозан має здатність солюбілізуватися за різних значень рН завдяки присутності карбоксиалкільних груп, які модифікують його профіль розчинності, і, зокрема, за фізіологічного рН або рН фізіологічних рідин, які модифіковані внаслідок патології, наприклад, запальної патології. Відомо, що рН фізіологічних рідин, таких як синовіальна рідина суглоба, водяниста волога, склоподібне тіло і сльози, можуть значно відрізнятися у різних людей внаслідок різних факторів, таких як вік, патологія тощо. Отже, бажано, щоб карбоксиалкіл хітозан міг залишатися розчинним в широкому діапазоні рН, наприклад, від 6,0 до 8,5, або навіть від 5,0 до 8,5, або навіть від 4,5 до 8,5.

30 Відповідно до одного варіанту реалізації композиція заміщеного хітозану має осмоляльність від 100 до 700 мОсм/кг, переважно від 200 до 500 мОсм/кг.

Бажано осмоляльність композиції заміщеного хітозану становить від 250 до 400 мОсм/кг, чи ще краще, від 275 до 325 мОсм/кг.

Відповідно до одного варіанту композиції заміщеного хітозану має осмоляльність, яка сумісна з суглобом.

35 Відповідно до одного варіанту композиції заміщеного хітозану має осмоляльність, яка сумісна з очною або внутрішньоочною поверхнею.

Бажано, щоб осмоляльність композиції заміщеного хітозану становила від 250 до 400 і більше конкретно, від 250 до 380 мОсм/кг.

40 Термін "розчинний у воді" означає, що карбоксиалкіл хітозан не проявляє будь-якої каламутності, видимої неозброєним оком, при його поміщенні в водний розчин. Зокрема, можна підтвердити розчинність, тобто відсутність будь-якої каламутності, розчину карбоксиалкіл хітозану при концентрації, наприклад, 1 % (маса/маса) в воді або буфері, наприклад, фосфатному буфері, з оптичною щільністю/для оптичної щільності менше 0,5, чи ще краще, менше 0,2, визначеної за допомогою спектрометрії у видимій УФ-області на довжині хвилі 500 нм, з посиланням на еталонний резервуар, який містить лише водний розчинник, який використовується для вимірюваного зразка, але в якому відсутній заміщений хітозан. Інший спосіб полягає в візуальному огляді відповідно до монографії 2.9.20 Європейської фармакопеї. Коли хітозан є недостатньо зміщенням, композиція не розчинна в задовільному діапазоні рН, наприклад, в діапазоні від 6,0 до 8,5 за температури навколишнього середовища.

50 Ступінь ацетилювання (DA) хітозану визначають, як, наприклад, описано в патентних заявках WO 2017009335 та WO 2017009346, за допомогою потенціометричного титрування. Альтернативно, ступінь ацетилювання (DA) може бути визначений іншими способами, відомими для хітозану, такими як спектроскопія протонного ядерного магнітного резонансу (ЯМР), твердотільна спектроскопія ЯМР ¹³C, інфрачервона спектроскопія.

55 Бажано карбоксиалкіл хітозан має ступінь ацетилювання в діапазоні від 5 % до 80 %, що виражається як кількість молей N-ацетил-глюкозамінових ланок відносно кількості молей всіх ланок. Ступінь ацетилювання виражається як кількість N-ацетил-D-глюкозамінових ланок відносно кількості всіх присутніх N-ацетил-D-глюкозамінових і D-глюкозамінових ланок.

Бажано карбоксиалкіл хітозан має ступінь ацетилювання, що становить від 40 % до 80 %, що виражається як кількість молей N-ацетил-глюкозамінових ланок відносно кількості молей всіх ланок.

- Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 5 % до 20 %.
- 5 Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 15 % до 25 %.
- Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 20 % до 45 %.
- Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 20 % до 30 %.
- Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 25 % до 40 %.
- Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 40 % до 50 %.
- 10 Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 50 % до 60 %.
- Відповідно до одного варіанту ступінь ацетилювання композиції становить від 60 % до 75 %.

Ступінь ацетилювання визначають за допомогою спектроскопії ЯМР на ядрах ^{13}C або протонного ЯМР відповідно до того ж самого способу, який використовують для визначення ступеня заміщення (DS). Карбоксиалкіл хітозан бажано має контрольовану ступінь ацетилювання. Термін "хітозан, який має контрольовану ступінь ацетилювання" відноситься до продукту, для якого ступінь ацетилювання, тобто частка N-ацетил-глюкозамінових ланок, може регулюватися контрольованим чином, зокрема, за допомогою реакції ацетилювання.

- Згідно з одним варіантом, композиція запропонована даним винаходом може бути представлена у формі розчину і не може бути перетворена на гель при зміні температури (не здатна до термогелювання).
- 20

Згідно з одним варіантом, реологічні характеристики розчину запропонованого даним винаходом, можуть змінюватися з температурою, але без проходження золь-гель переходу. Реологічні характеристики розчину запропонованого даним винаходом можуть, зокрема, бути підтверджені модулем пружності (G') і/або модулем втрат (G''), або навіть комплексним модулем G^* .

25

Згідно з одним варіантом, реологічні характеристики розчину запропонованого даним винаходом, є власне постійними незалежно від температури.

Згідно з одним варіантом, композиція запропонована даним винаходом, може бути представлена у формі розчину і бути здатною до термогелювання.

- 30 Згідно з одним варіантом, композиція запропонована даним винаходом, може бути представлена у формі гелю і не здатна до термогелювання.

Таким чином, винахід дозволяє, відповідно до одного варіанту, приготувати здатну до термогелювання композицію, яка є текучою за температури нижче температури використання, зазвичай за температури нижчої, ніж фізіологічна температура, наприклад $37\text{ }^\circ\text{C}$, але яка знаходиться у формі гелю за температури використання, зазвичай за фізіологічної температури, наприклад $37\text{ }^\circ\text{C}$, за нейтрального рН (рН 7) або за фізіологічного рН і, наприклад, від 7 до 8,5, з осмолальністю, яка є придатною для передбачуваного застосування. Це, наприклад, фізіологічна осмолальність.

35

- 40 Згідно з одним варіантом, композиція, здатна до термогелювання, має термозворотний золь-гель-перехід.

Бажано даний винахід дозволяє забезпечити композицію з низькою концентрацією заміщеного хітозану.

Бажано концентрація карбоксиалкіл хітозану становить менше 10 %, наприклад, дорівнює 5 % або менше за масою відносно загальної маси композиції (маса/маса).

- 45 Відповідно до одного варіанту концентрація хітозану становить менше 4 %, наприклад, дорівнює 3 % або менше, або навіть, наприклад, дорівнює 2 % або менше за масою відносно загальної маси композиції (маса/маса).

Бажано композиція запропонована даним винаходом також може містити біополімер, який відрізняється від заміщеного хітозану. Відповідно до одного варіанту біополімер є полісахаридом, незалежно від того, чи є він окисленим чи ні, поперечно-зшитим або не зшитим ковалентними зв'язками, наприклад, гіалуроновою кислотою або гіалуронатом натрію.

50

Гіалуронова кислота може мати молекулярну масу до 5 мільйонів Да. Молекулярна маса гіалуронової кислоти може бути визначена за її в'язкістю або її динамічною в'язкістю в розчині. Гіалуронова кислота може мати щільність в діапазоні від 1 до $4\text{ м}^3/\text{кг}$ і, наприклад, може характеризуватися як така, що має низьку (наприклад, приблизно від 1 до $2\text{ м}^3/\text{кг}$) або високу (наприклад, приблизно від 2 до $4\text{ м}^3/\text{кг}$) молекулярну масу.

55

Бажано концентрація гіалуронової кислоти становить менше 4 %, наприклад, дорівнює 3 % або менше, або навіть, наприклад, дорівнює 2 % або менше за масою відносно загальної маси композиції (маса/маса).

Відповідно до одного конкретного варіанту концентрація гіалуронової кислоти становить менше 1,9 % (маса/маса), що виражається як маса відносно маси кінцевої композиції. Бажано концентрація гіалуронової кислоти становить від 0,5 % до 1,5 % (маса/маса), що виражається як маса відносно маси кінцевої композиції. Відповідно до одного конкретного варіанту концентрація гіалуронової кислоти становить приблизно 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,5 % (маса/маса), що виражається як маса відносно маси кінцевої композиції.

Співвідношення між хітозаном і гіалуроновою кислотою може, наприклад, варіювати від 5 % до 95 %, наприклад, від 10 % до 90 %, і навіть, наприклад, від 30 % до 70 % заміщеного хітозану, і від 5 % до 95 %, наприклад, від 10 % до 90 % і навіть, наприклад, від 30 % до 70 %, відповідно, гіалуронової кислоти, при цьому відсотки виражені відносно: суха маса заміщеного хітозану/суха маса гіалуронової кислоти. Відповідно до одного варіанту це співвідношення між хітозаном і гіалуроновою кислотою становить 1/1 (тобто 50 % хітозану і 50 % гіалуронової кислоти). Відповідно до іншого варіанту співвідношення між хітозаном і гіалуроновою кислотою становить 1,5/0,5 (тобто 75 % хітозану і 25 % гіалуронової кислоти).

Відповідно до одного варіанту гіалуронова кислота може бути зшита між різними ланцюгами гіалуронової кислоти.

Даний винахід також відноситься до способу отримання карбоксиалкіл хітозану.

Відповідно до одного варіанту спосіб отримання карбоксиалкіл хітозану запропонований даним винаходом, включає отримання хітозану грибного походження, реацетилювання хітозану і карбоксиалкілювання реацетильованого хітозану. Таким чином, винахід відноситься до реацетильованого хітозану або реацетильованого карбоксиалкіл хітозану.

Відповідно до одного варіанту реалізації можна, таким чином, розчинити хітозан у водному середовищі, бажано дещо підкисленому (наприклад, рН 6). До розчину хітозану один або кілька разів може бути доданий оцтовий ангідрид. Потім додають основний агент, такий як, наприклад, гідроксид натрію і/або сечовина. Після цього додають алкілюючий агент, такий як, наприклад, монохлорацетат натрію (тобто натрієва сіль хлороцтової кислоти) або хлороцтова кислота, потім заміщений хітозан очищають, відновлюють і висушують.

Відповідно до одного варіанту спосіб отримання карбоксиалкіл хітозану запропонований даним винаходом включає отримання хітозану, карбоксиалкілювання хітозану, потім реацетилювання карбоксиалкілюваного хітозану. Бажано такий спосіб забезпечує точний контроль ступеня ацетилювання кінцевого карбоксиалкіл хітозану і, зокрема, отримання високого ступеня ацетилювання, наприклад, вище 40 %. Таким чином, винахід відноситься до реацетильованого, а потім карбоксиалкілюваного хітозану або реацетильованого карбоксиалкіл хітозану.

Відповідно до одного варіанту спосіб отримання карбоксиалкіл хітозану запропонований даним винаходом включає отримання хітину грибного походження, карбоксиалкілювання хітину і необов'язково реацетилювання карбоксиалкілюваного хітину для отримання карбоксиалкіл хітозану запропонованого даним винаходом.

Відповідно до одного варіанту запропонований даним винаходом спосіб отримання карбоксиалкілюваного хітозану включає отримання хітину грибного походження, деацетилювання хітину, карбоксиалкілювання хітину і необов'язково реацетилювання карбоксиалкілюваного хітину для отримання карбоксиалкіл хітозану запропонованого даним винаходом.

Відповідно до одного варіанту реалізації стадія карбоксиалкілювання включає стадію підлужування для підвищення лужності гідроксильних груп хітозану, щоб сприяти високому ступеню заміщення і, наприклад, як в N-положенні глюкозамінових ланок, так і в O-положенні глюкозамінових і N-ацетил-глюкозамінових ланок.

Відповідно до одного варіанту реалізації запропонований даним винаходом спосіб включає стадію підвищення лужності, яка передбачає диспергування хітозану в розчині спирту, такому як ізопропанол, в присутності лужного агента, такого як, наприклад, гідроксид натрію, і перемішування протягом періоду часу, що становить щонайменше одну годину за температури мінімум -32 °C і бажано максимум 15 °C. До цієї суспензії потім додають алкілюючий агент, такий як, наприклад, монохлороцтова кислота. Після цього заміщений хітозан очищають, виділяють і потім висушують.

Відповідно до одного варіанту запропонований даним винаходом спосіб отримання карбоксиалкілюваного хітозану включає отримання хітозану, карбоксиалкілювання хітозану і потім реацетилювання карбоксиалкілюваного хітозану.

Відповідно до одного варіанту реалізації стадія карбоксиалкілювання не включає стадію підвищення лужності.

Стадія реацетилювання карбоксиалкіл хітозану може, наприклад, включати одне або кілька додавань оцтового ангідриду до розчину карбоксиалкіл хітозану.

Кінцеві стадії очищення, фільтрації та висушування для збору очищеного карбоксиалкіл хітозану проводять відповідно до відомих способів з метою отримання карбоксиалкіл хітозану відповідно до бажаного ступеню чистоти, який в цілому залежить від передбачуваного застосування, наприклад, за допомогою циклів осадження і солюбілізації або шляхом діалізу.

Відповідно до одного варіанту співвідношення оцтовий ангідрид/хітозан (об'єм/маса) змінюється від 0,1 до 10 і бажано від 0,1 до 2 під час стадії реацетилювання.

Відповідно до одного варіанту масове співвідношення карбоксиалкілюючий агент/хітозан змінюється від 1 до 50 і бажано від 2,5 до 25 під час стадії карбоксиалкілювання.

Відповідно до одного варіанту використовують таке масове співвідношення реагентів, що забезпечують карбоксиалкільну групу (тобто алкілюючих агентів), відносно основного агента, яке є необхідним і достатнім для отримання бажаного ступеня заміщення. Наприклад, масове співвідношення алкілюючого агента до основного агента становить більше 1 і менше 10, і бажано знаходиться в діапазоні від 1,4 до 3,3.

Винахід також відноситься до способу отримання композиції запропонованої даним винаходом.

Відповідно до одного варіанту спосіб зазвичай включає:

- розчинення заміщеного хітозану в водному розчині, бажано в забуференому розчині, який бажано має рН в діапазоні від 6,2 до 8,5 і бажано від 6,5 до 7,5;

- необов'язково доведення рН до бажаного значення рН, як правило, до фізіологічного рН для цільового застосування, наприклад, шляхом додавання буферного агента, кислоти або підстави;

- необов'язково додавання інших допоміжних речовин, таких як, наприклад, відновлювальний цукор, наприклад, сорбіт або манітол;

- необов'язково регулювання кінцевої осмоляльності композиції.

Багато способів також включає додаткову стадію наповнення для наповнення пристрою для ін'єкції або імплантації, такого як, наприклад, шприц, карбоксиалкіл хітозаном або композицією. Яка його містить. Багато ін'єкційний пристрій, такий, наприклад, як шприц, може бути потім підданий процесу стерилізації паром. Цей пристрій, наприклад, шприц, може бути потім упакований, бажано стерильним способом. Це може бути також пакет, флакон або пляшка, яка служить для інстиляції розчину карбоксиалкіл хітозану.

Багато використовувати хітозан, який має достатній ступінь чистоти для передбачуваного застосування.

Багато способів також включає додаткову стадію наповнення для наповнення пристрою для ін'єкції, імплантації або інстиляції, такого як, наприклад, шприц, запропонованою даним винаходом композицією. Багато ін'єкційний пристрій, такий як, наприклад, шприц, може бути потім підданий процесу стерилізації паром. Цей пристрій, наприклад, шприц, може бути потім упаковано, бажано стерильним способом.

Відповідно до одного варіанту, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан стерилізують шляхом фільтрації і/або стерилізації паром перед наповненням ним пристрою для ін'єкції, імплантації або інстиляції, такого, наприклад, як шприц або флакон.

Багато використовувати хітозан, який має достатній ступінь чистоти для передбачуваного застосування.

Більш конкретно, даний винахід відноситься до композиції для ін'єкції, яка містить запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан.

Винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить щонайменше один запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан.

Відповідно до одного варіанту, карбоксиалкіл хітозан або композицію, яка його містить, використовують як фармацевтичну композицію, яка може бути ін'єктована, імплантована або придатна для інстиляції, або як медичний пристрій для ін'єкції, імплантації або придатний для інстиляції.

Винахід також охоплює карбоксиалкіл хітозан або композицію, яка його містить в сухій формі, зокрема, в ліофілізованій формі. Зокрема, можна (ре)диспергувати і бажано солюбілізувати ліофілізований продукт перед застосуванням.

Більш конкретно, даний винахід відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування в терапевтичному лікуванні, яке, наприклад, передбачає ін'єкцію зазначеної композиції підшкірним, внутрішньошкірним, внутрішньоочним або внутрішньосуглобовим шляхом, наприклад, для відновлення, регенерації або заповнення щонайменше однієї тканини організму, яка потребує відновлення або заповнення.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан проявляє імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження при використанні моделі "повітряний мішок" у мишей, через 24 години після ін'єкції, що виражається в кількості білих кров'яних клітин, яка становить менше 10×10^6 клітин/мл і бажано менше 8×10^6 клітин/мл.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан проявляє імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження при використанні моделі "повітряний мішок" у мишей, через 24 години після ін'єкції, що виражається концентрацією інтерлейкіну 1 бета (IL1-бета), яка становить менше 10×10^{-9} г/мл, чи краще менше 5×10^{-9} г/мл.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан проявляє імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження при використанні моделі "повітряний мішок" у мишей, через 24 години після ін'єкції, що виражається концентрацією хемокінового ліганда 1, який містить C-X-C мотив (KC/CXCL1), яка становить менше 50×10^{-9} г/мл і бажано менше 30×10^{-9} г/мл.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан проявляє імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження при використанні моделі "повітряний мішок" у мишей, через 24 години після ін'єкції, що виражається концентрацією фактора некрозу пухлини альфа (TNF-альфа), яка становить менше 150×10^{-9} г/мл і бажано менше 125×10^{-9} г/мл.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан проявляє імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження при використанні моделі "повітряний мішок" у мишей, через 24 години після ін'єкції, що виражається концентрацією хемокінового ліганда 1, який містить мотив C-X-C (KC/CXCL1), яка становить менше 50×10^{-9} г/мл і бажано менше 30×10^{-9} г/мл.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан проявляє імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження при використанні моделі "повітряний мішок" у мишей, через 24 години після ін'єкції, одночасно відповідаючи максимальним межам, зазначеним в цьому документі вище відносно кількості білих кров'яних клітин і концентрацій IL1-бета, KC/CXCL1 і TNF-альфа.

Вимірювання кількості білих кров'яних клітин і концентрацій IL1-бета, KC/CXCL1 і TNF-альфа здійснюють відповідно до протоколів, зазначених в прикладах.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан має період напіврозпаду в присутності суміші ферментів лізоциму і гіалуронідази при 37°C , який становить понад 500 хвилин відповідно до протоколу вимірювання в Прикладі 6.

Бажано, відповідно до одного варіанту реалізації, зокрема, при внутрішньосуглобному застосуванні, запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан має коефіцієнт тертя (COF₀) менше 5 і бажано дорівнює 4 або менше (згідно з протоколом в Прикладі 9).

Винахід стосується, зокрема, запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в лікуванні в галузях ревматології, офтальмології, естетичної медицини, пластичної хірургії, хірургії внутрішніх органів, наприклад, для запобігання утворенню післяопераційних спайок тканин, в косметичній чи дерматологічній хірургії.

Відповідно до одного варіанту, тканини організму обирають з поміж тканин, до яких належать голосові зв'язки, м'язи, зв'язки, сухожилля, хрящі, статеві органи, кістки, суглоби, очі, шкіра, епідерміс, один або декілька шарів шкіри, мезодерма або будь-які з поміж їх комбінацій і, більш конкретно, які належать до очей, шкіри і мовно-артикулярних суглобів.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в терапевтичному лікуванні синдрому сухого ока, пошкодження або травми рогівки, або запалення суглобів.

Крім того, даний винахід відноситься до застосування запропонованої даним винаходом композиції за допомогою інстиляції на поверхню очей для попередження або боротьби з пошкодженням чи травмою рогівки, або синдромом сухого ока, зокрема, з метою змазування або регенерації очної поверхні.

Таким чином, винахід також відноситься до композиції очних крапель, що містить запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан.

Відповідно до одного варіанту, суб'єкт вражений запальною патологією (наприклад, остеоартроз).

Більш конкретно, даний винахід відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для лікування артрозу (остеоартриту), артрити або відновлення дефекту хряща, наприклад, шляхом ін'єкції в синовіальну порожнину або шляхом імплантації в ділянку дефекту хряща.

5 Більш конкретно даний винахід відноситься до медичного пристрою, наприклад, медичного імплантату, який відрізняється тим, що містить або складається із запропонованої даним винаходом композиції.

Відповідно до одного варіанту, винахід, таким чином, відноситься до медичного пристрою, який має камеру, яка містить карбоксиалкіл хітозан в сухій формі, зокрема, в ліофілізованій формі, і необов'язково одну або кілька інших камер, що містять один або кілька активних продуктів, добавок або допоміжних речовин.

10 Запропонована даним винаходом композиція може також містити одну або кілька добавок або допоміжних речовин, які дозволяють модулювати її властивості.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в способі терапевтичного лікування, який включає, наприклад, інстиляцію або 15 ін'єкцію зазначеної композиції підшкірним, внутрішньошкірним, очним, внутрішньоочним або внутрішньосуглобовим шляхом, наприклад, для відновлення або заповнення щонайменше однієї тканини організму, яка потребує відновлення або заповнення.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для її застосування в способі лікування остеоартриту або для відновлення дефекту хряща, 20 наприклад, шляхом ін'єкції в синовіальну рідину або після змішування з кров'ю і імплантації в хрящ.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в способі лікування або способі естетичної допомоги, що надається шляхом заповнення дерми ("дермального заповнення"). Зокрема, це передбачає, наприклад, ін'єкцію 25 запропонованої даним винаходом композиції підшкірно або внутрішньошкірно.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в способі лікування поверхні шкіри за допомогою багаторазових ін'єкцій внутрішньошкірним шляхом. Такі композиції, як правило, можуть бути використані в 30 дерматології як засіб лікування в естетичних цілях. Такий спосіб, наприклад, призначений для збільшення об'єму шкіри, щоб вона втратила свій зморшковатий вигляд (лікування зморшок і/або тонких ліній). Таке лікування може застосовуватися до суб'єкта, який бажає поліпшити вигляд своєї шкіри шляхом омолодження.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в способі лікування, в якому композиція є агентом віскосуплементатії. В цьому випадку, наприклад, він передбачає введення запропонованої винаходом композиції в ділянку 35 всередині суглоба, зокрема, для зменшення тертя хрящових поверхонь суглоба.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її як клітинного вектора, для одного або декількох типів клітин, і/або одного або декількох активних агентів. Це можуть бути активні агенти з фармацевтичною або біологічною 40 точки зору. Запропонована даним винаходом композиція може бути фактично сумісною з присутніми клітинами, бажано живими клітинами. Серед живих клітин, які представляють інтерес, можна згадати, наприклад: хондроцити (суглобовий хрящ), фіброхондроцити (меніск), фібробласти зв'язок (зв'язки), фібробласти шкіри (шкіра), теноцити (сухожилля), міофібробласти (м'язи), мезенхімальні стовбурові клітини, червоні кров'яні клітини (кров) і кератиноцити (шкіра). 45 Запропонована даним винаходом композиція також може розглядатися як терапевтичний вектор для таргетної доставки і/або контрольованого вивільнення щонайменше одного терапевтичного агента.

Відповідно до одного варіанту додавання до запропонованої даним винаходом композиції крові або плазми, або лізату тромбоцитів, або збагаченої тромбоцитами плазми, або будь-якої 50 біологічної рідини дозволяє тим самим, наприклад, поліпшити характеристики продукту.

Відповідно до одного варіанту запропонована даним винаходом композиція скомпонована у твердій формі (наприклад, має форму плівки або пористої піни), яка солюбілізується після імплантації.

Відповідно до одного варіанту композиція скомпонована в формі композиції, яка розпилюється за допомогою небулайзера (інгаляцією). 55

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в способі лікування або способі естетичного догляду за однією або декількома тканинами або органами, які зазнали впливу надмірної температури, як у випадках опіків.

Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в способі лікування хряща для відновлення хряща (наприклад, шляхом імплантації в дефект хряща, щоб сприяти регенерації такого хряща).

5 Даний винахід також відноситься до запропонованої даним винаходом композиції для застосування її в способі лікування для запобігання спайок тканин після операції: продукт наносять на тканини в кінці операції, наприклад, гінекологічної хірургії, абдомінальної хірургії тощо.

Даний винахід також відноситься до композиції, яку застосовують як штучну синовіальну рідину, яка містить запропонований даним винаходом карбоксиалкіл хітозан.

10 Запропонована даним винаходом композиція забезпечує здатність імітувати здорову синовіальну рідину або покращувати здорову або дефектну, або дегенеративну синовіальну рідину, наприклад, шляхом поліпшення її змащувальних властивостей, для зменшення тертя в суглобі і/або його демпфінгуючої здатності (визначається модулем пружності G'), при цьому вона легко вводиться, наприклад, для наповнення шприца або для ін'єкції в організм людини
15 або тварини. Тільки в ілюстративних цілях модуль пружності G' здорової синовіальної рідини становить від 40 до 100 Па, і його модуль втрат G'' становить від 1 до 10 Па.

Відповідно до одного варіанту карбоксиалкіл хітозан або композицію, яка його містить, вводять в формі розчину. Бажано, відповідно до цього варіанту, карбоксиалкіл хітозан або композицію, яка його містить, легко вводять крізь тонку голку, наприклад, голку діаметром 21
20 калібру за кімнатної температури. Термін "легке" введення означає, що сила, яка прикладається до такого шприца, під дією якої запропонована даним винаходом композиція протікає крізь голку 21 калібру, бажано становить менше 50 ньютонів, ще краще, сила становить менше 20 ньютонів.

Даний винахід також відноситься до композиції, яка містить запропонований даним
25 винаходом карбоксиалкіл хітозан, яку застосовують як штучні сльози.

Як правило, діапазони значень осмоляльності і рН, необхідні в біомедичних застосуваннях, близькі до наступних діапазонів:

- осмоляльність:

- ізоосмолярна з плазмою: 285-295 мОсм/кг;

30 - ізоосмолярна з синовіальною рідиною: 404±57 мОсм/кг відповідно до "Clin Orthop Relat Res, 235, 289-95, 1988" і "Biochem Biophys Res Comm, 422, 455-461, 2012 року";

- від 280 до 350 мОсм/кг.

- рН:

35 Як правило, фізіологічне значення рН становить вище 6,8, зокрема, вище 7,0 і, зокрема, так само 7,4 (як для плазми або синовіальної рідини).

Як правило, значення рН плазми дорівнює 7,4. Як правило, значення рН синовіальної рідини дорівнює 7,768±0,044 відповідно до "J Bone Joint Surg Br, 41-B (2), 388-400, 1959"; або 7,3 відповідно до "Acta Orthop Scand 634-641, 1969", або також відповідно до "Clin Rheumatol 25, 886-888, 2006".

40 Як правило, вважають, що значення рН синовіальної рідини при остеоартриті або артриті є нижчим, ніж для здорової синовіальної рідини.

Таким чином, даний винахід відноситься до суміші синовіальної рідини з запропонованою даним винаходом композицією, наприклад, на основі об'ємного співвідношення між (i) карбоксиалкіл хітозаном або композицією, яка його містить та (ii) синовіальною рідиною, яка знаходиться в діапазоні від 20/80 до 80/20 (об./об.) і становить, наприклад, 50/50 (об./об.).
45

Бажано, запропонована даним винаходом композиція є стерильною. Дуже бажаною є стерилізація запропонованої даним винаходом композиції шляхом підвищення температури, бажано в автоклаві.

Відповідно до одного варіанту, запропоновані даним винаходом композиції є прозорими або
50 такими, що просвічуються.

Термін "просвічується" означає, що об'єкт можна спостерігати, якщо між зазначеним об'єктом і оком спостерігача поміщують композицію. Термін "прозора" означає, що можна розрізнати букви і цифри символи, коли композицію поміщують між оком спостерігача і вказаними символами. Як правило, цю оцінку проводять на композиції товщиною приблизно 1
55 см. Також можна використовувати спосіб, описаний в монографії 2.9.20 Європейської фармакопеї, для візуального огляду. Також можна вимірювати оптичну щільність композиції, наприклад, за допомогою спектрометрії у видимій УФ-області при 500 нм і переконатися, що оптична щільність становить менше 0,5, бажано 0,2 в порівнянні з еталонним розчинником.

60 Згідно з одним варіантом, запропоновані даним винаходом композиції не є або є лише трохи опалесцентними.

Термін "опалесцентний" означає, що розчин спричиняє дифракцію видимого неозброєним оком світла, наприклад, шляхом візуального спостереження відповідно до способу, описаного в монографії 2.9.20 Європейської фармакопеї, шляхом порівняння з еталонними розчинами з Європейської фармакопеї, які мають різні рівні опалесценції. Відповідно до одного варіанту запропонована даним винаходом композиція є безбарвною, тобто, зокрема, спостерігач, який спостерігає її неозброєним оком, не приписує композиції будь-який конкретний колір. Відповідно до одного варіанту, опалесценція є нижчою від максимально допустимого рівня для передбачуваного застосування.

Винахід відноситься, зокрема, до виробів або упаковки, бажано стерильної, яка містить один або кілька пристроїв для інстиляції або ін'єкції, попередньо наповнених запропонованою даним винаходом композицією. Як правило, це пристрої, які дозволяють вводити продукт у формі крапель або в попередньо наповнених шприцах.

Запропонована даним винаходом композиція бажано може бути стерилізованою. Таким чином, винахід відноситься до стерилізованого карбоксиалкіл хітозану. Таким чином, карбоксиалкіл хітозан є стерильним, зокрема, для застосувань, в яких це необхідно.

Відповідно до одного варіанту, запропоновану даним винаходом композицію стерилізують за допомогою пари, наприклад, шляхом підвищення температури вище 100 °C і бажано вище 120 °C, наприклад, в інтервалі від 121 °C до 138 °C в автоклаві, протягом періоду часу, достатнього для стерилізації, наприклад, як правило, протягом від 15 до 20 хвилин. Відповідно до іншого варіанту композиція може бути стерилізована шляхом фільтрації з використанням фільтрів, пристосованих для цієї мети, наприклад, фільтрів з пористістю, меншою або рівною 0,2 мкм.

Перевага полягає в тому, що Відповідно до одного варіанту реалізації втрата в'язкості карбоксиалкіл хітозану під час процесу стерилізації паром становить менше 40 %.

Винахід також охоплює запропоновану даним винаходом композицію в сухій формі, зокрема, в ліофілізованій формі.

Зокрема, можливо (ре)диспергувати цю ліофілізовану композицію перед застосуванням.

Даний винахід також охоплює спосіб терапевтичного лікування, що включає ін'єкцію запропонованої даним винаходом композиції.

Даний винахід також поширюється на використання запропонованої даним винаходом композиції для виготовлення фармацевтичної композиції, зокрема, для терапевтичного лікування, наприклад, як це визначено більш конкретно у винаході.

Даний винахід також охоплює спосіб естетичного догляду, іншими словами, нетерапевтичний спосіб, який передбачає ін'єкцію запропонованої даним винаходом композиції. Це включає, наприклад, заповнення зморшок або заповнення однієї або декількох областей пошкодженої видимої тканини, наприклад, після нещасного випадку або хірургічного втручання, в естетичних цілях.

Тканина є групою подібних клітин, які мають однакове походження, згрупованих разом як функціональна одиниця, тобто такі, що виконують одну і ту саму задану функцію. Серед тканин можна згадати: епітеліальну тканину, сполучну тканину, м'язову тканину і нервову тканину.

Термін "запропонована даним винаходом композиція" або еквівалентні терміни слід розуміти, як такі, під які підпадають композиції, визначення яким дано в даному винаході, в тому числі таким, що відповідають будь-яким з варіантів, конкретних або специфічних варіантів здійснення, незалежно чи відповідно до будь-якої з їх комбінацій, в тому числі відповідно до бажаних відмітних ознак.

Інші об'єкти, відмітні ознаки і переваги винаходу стануть очевидними для фахівця в даній галузі після прочитання пояснювального опису, в якому робиться посилання на приклади, наведені виключно для ілюстрації, і які жодним чином не обмежують обсягу винаходу.

Приклади є невід'ємною частиною даного винаходу, і будь-яка відмітна ознака, яка представляється як нова у порівнянні з будь-яким документом попереднього рівня техніки на основі опису, розглядаються в цілому, включаючи приклади, і становить невід'ємну частину винаходу щодо її функції і можливості застосування.

Таким чином, кожен приклад є загальним щодо сфери застосування.

З іншого боку, в прикладах всі процентні частки розраховані за масою, якщо не вказано інше, температура приведена в градусах Цельсія, якщо не вказано інше, і тиск є атмосферним тиском, якщо не вказано інше.

Приклади

Хітозани-попередники заміщених хітозанів відповідно до винаходу мають середню молекулярну масу за в'язкістю (яка визначається шляхом капілярної віскозиметрії) і ступінь ацетилювання (DA, вміст ланок N-ацетил-D-глюкозаміну, визначений за допомогою

5 потенціометричного титрування), які знаходяться в діапазонах, зазначених в Таблиці 1. Молекулярна маса хітозану може бути також визначена за динамічною в'язкістю розчину, який має концентрацію 1 % (маса/маса) хітозану в оцтовій кислоті, що має концентрацію 1 % (об./об.), визначеною за допомогою віскозиметра з обертовим шпинделем, наприклад, віскозиметра Брукфільда, як це описано в Таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристики хітозанів-попередників

Діапазон	Діапазон середньої молекулярної маси (капілярна віскозиметрія)	Діапазон в'язкості при 1 % (мПа.с)	Діапазон DA (мол. %)
«Наднизький»	прибл. 20000-60000	5-20	5-20 %
«Низький»	прибл. 60000-120000	20-50	15-25 %
«Середній»	прибл. 120000-150000	50-80	20-30 %
«Високий»	прибл. 150000-220000	80-120	25-40 %
«Надвисокий»	прибл. 220000-300000	120-200	25-40 %
«400k»	прибл. 300000-500000	200-600	35-50 %

В даному винаході використовували наступні способи, якщо не вказано іншого.

Спосіб вимірювання дзета-потенціалу

10 Композицію, яка підлягає аналізу, розбавляли в фосфатному буфері з метою отримання кінцевої концентрації полімеру 0,05 %, потім несильно перемішували до досягнення гомогенізації. Потім розчин розділяли на різні фракції, і рН кожної з фракцій доводили до бажаного значення, що знаходиться в діапазоні рН 4-8, або шляхом додавання 0,1 N розчину гідроксиду натрію, або шляхом додавання 0,1 N розчину соляної кислоти. Дзета-потенціал кожної фракції вимірювали за допомогою приладу "Nano-Z" (діапазон Zeta-Sizer, Malvern Instruments).

Спосіб вимірювання діапазону розчинності хітозанових полімерів

20 Діапазон розчинності встановлювали шляхом приготування дослідного розчину полімеру при концентрації 1 % і рН 9, шляхом розділення його на декілька фракцій, рН яких доводили до різних значень рН в діапазоні від 9 до 1. Для кожної фракції полімер перевіряли, щоб переконатися в тому, що він розчинився - тобто він не утворює будь-якого помутніння - відповідно до способу візуального контролю, описаного в монографії 2.9.20 Європейської фармакопеї. Відзначали діапазон рН, в якому полімер є розчинним або нерозчинним.

Модель підшкірного "повітряного мішка" у мишей

25 Модель підшкірного "повітряного мішка" у мишей використовували для оцінки реакції на чужорідні тіла і імуносумісності декількох різних полімерів, отриманих з хітозану грибного походження. У цій моделі порожнину "повітряного мішка" отримували шляхом повторних підшкірних ін'єкцій стерильного повітря в спину миші. Мішок, утворений надуванням повітря, імітує синовіальну порожнину, забезпечуючи тим самим локалізоване середовище, в якому можна вивчати стимуляцію запальної відповіді в рідині, яка витікає з повітряного мішка і навколишніх тканин, як описано Segwick et al. (B: J Pathol 141, 483, 1983) і Sin et al. (B: Ann Rheum Dis 45, 873, 1986). Порожнина повітряного мішка дозволяє вводити до 1 мл продукту тварині вагою близько 30 г. Згідно з протоколом, описаним Dawson et al. (B: Int J Tiss Reac 8, 171, 1991), повітряний мішок встановлювали у неспоріднених самців мишей-альбіносів лінії CD-1 Swiss (безпатогенні, маса тіла при надходженні 25-35 г) згідно з графіком на День 0 і День 4 шляхом повторної ін'єкції 5 мл, а потім 3 мл стерильного повітря. На День 7 одноразову підшкірну ін'єкцію 1 мл продукту вводили безпосередньо в порожнину повітряного мішка. Ін'єкції 1 мл фізіологічного розчину і 1 % розчину карагану виконували роль негативного і позитивного контролів, відповідно. Тварин регулярно спостерігали протягом декількох годин після ін'єкції, щоб виявити можливі клінічні ознаки системної або місцевої токсичності, і набір маси тіла і температуру вимірювали на момент ін'єкції і смертності. Тварин забивали після 24-годинного контакту з продуктом (3 тварини на продукт). Імунологічні оцінки промивної рідини, вилученої з мішка, включали цитологічний аналіз (підрахунок і розподіл білих і червоних кров'яних клітин) і кількісну оцінку основних медіаторів запалення (IL-1-бета, TNF-альфа і KC/CXCL1) з використанням наборів "ELISA" (AbCam), яка здійснюється відповідно до інструкцій. Проводили макроскопічний аналіз і гістопатологічний аналіз шляхом фарбування гематоксиліном/еозином навколишніх тканин шкіри. Особлива увага приділялася локалізації продукту на оточуючих тканинах, а також його резорбції в рідині.

Модель для оцінки локальної переносимості внутрішньосуглобового введення на овечій моделі

Згідно з літературними даними і рекомендаціями Міжнародного товариства з вивчення остеоартриту (Osteoarthritis Research Society International, OARSI), вівці визнані добре охарактеризованою моделлю для оцінки ефектів внутрішньосуглобової ін'єкції інноваційних засобів для лікування (Little et al. In: Osteoarthritis Cartilage 18, S80 2010; Edouard et al. In: Phys Ther Sport 14, 116, 2013; McCoy et al. In: Vet Pathol 52, 803, 2015). Овеча модель забезпечує можливість внутрішньосуглобової ін'єкції деякого об'єму композиції, яка імітує клінічне застосування віскосаплементарної терапії у людей (Fraser et al. In: Semin Arthritis Rheum 22, 9, 1993). Вимірювання локальної переносимості включають клінічні ознаки синовіального запалення (випіт, кульгавість, комфорт) шляхом використання валідованих напівкількісних клінічних шкал, описаних Shafford et al. (В: Vet Anaesth Analg 31, 20, 2004) і Kaler et al. (В: Vet J 180, 189, 2009), а також цитологічного дослідження синовіальної рідини. У деяких випадках ці аналізи можуть бути доповнені анатомічною і гістологічною оцінкою кінцівки, в яку була зроблена ін'єкція. Об'єм 2 мл композиції ін'єктували в суглоб (коліно) здорової вівці (віком від 2 до 6 років; вага від 60 до 80 кг). Після ін'єкції клінічні ознаки у тварин реєстрували щодня протягом 15 днів на основі напівкількісної шкали від 0 до 4 для випоту (шляхом пальпації колінного суглоба) і кульгавості. Повідомлялося про ряд ознак для кожної з оцінок за весь період спостереження. Щоб оцінити ефекти повторної ін'єкції тієї ж самої заданої композиції, через 1 місяць проводили другу ін'єкцію в суглоб тих же тварин, і тварин спостерігали за тим же протоколом, що і для першої ін'єкції. Крім того, пункцію синовіальної рідини виконували на 15 день, і макроскопічні (колір, в'язкість), цитологічні (кількість і розподіл білих і червоних кров'яних клітин) параметри, а також кількість загальних сироваткових білків визначали звичайними способами. Синовіальна рідина вважалася нормальною, якщо вона мала прозорий, в'язкий і дещо жовтуватий зовнішній вигляд, і цитологічний аналіз показував, що кількість білих кров'яних клітин становить менше 1×10^5 клітин/мл, і що концентрація загальних білків становить приблизно 25 мг/мл.

Приклад 1. N-сукциніл-хітозани

N-сукциніл-хітозани, які мають різну молекулярну масу і молекулярну структуру (ступінь ацетилювання (DA) і ступінь заміщення сукцинільною групою (DS)), отримували і характеризували відповідно до загального способу, описаного в заявці на патент WO 2016/01646 Забо WO 2016/016464 (патент EP 3016663). Першу стадію ацетилювання шляхом додавання оцтового ангідриду проводили для збільшення ступеня ацетилювання, за винятком полімеру CSS-1 (таблиця 1а).

Композиції готували з даними N-сукциніл-хітозанами (CSS) при концентрації 2 % за фізіологічного pH і осмолярності, та упаковували в скляні шприци. Шприци стерилізували в автоклаві з використанням стандартного циклу (15 хвилин при 121 °C). Композиції перевіряли, щоб упевнитися в тому, що вони не проявляють присутності будь-якої нерозчинної речовини або каламутності в широкому діапазоні pH навколо фізіологічного pH (pH від 6,5 до 7,5) шляхом візуального огляду відповідно до способу, описаного в монографії 2.9.20 Європейської фармакопеї. Проводили перевірку того, щоб рівень бактеріальних ендотоксинів в композиціях становив менше 20 ОЕ/мл відповідно до способу, описаного в монографії 2.6.14 (D) Європейської фармакопеї, і щоб мікробіологічне навантаження становило менше 100 КУО/г відповідно до способу, описаного в монографії 2.6.12 Європейської фармакопеї, до проведення оцінки їх імуносумісності in vivo.

Таблиця 1а

Характеристики N-сукциніл-хітозанів

No	Діапазон молекулярної маси*	DA** (мол. %)	DS** (мол. %)
CSS-1	Середня	12	62
CSS-6	низька	50	34
CSS-8	низька	49	32
CSS-10	висока	61	37

* Молекулярна маса хітозану-попередника згідно з Таблицею 1;

** DA і DS вимірювали методом протонного ЯМР згідно способу, описаного в патенті EP 3016663.

Імуносумісність композиції CSS оцінювали за допомогою моделі підшкірного "повітряного мішка" у мишей (таблиця 1b). Наявну реакцію порівнювали з реакцією, яка спостерігається після ін'єкції фізіологічного розчину (негативний контроль), високо реакційного позитивного контролю (1 % розчин карагенану) і комерційно доступного продукту на основі Hylan GF-20, частково зшитого гіалуронової кислоти (Synvisc®, Sanofi).

Таблиця 1b

Імуносумісність композиції N-сукциніл-хітозану з використанням моделі "повітряного мішка" у мишей, через 24 годин після ін'єкції*

№	кількість білих кров'яних клітин (10 ⁶ кліт./мл)	концентр. IL1-бета (10 ⁻⁹ г/мл)**	концентр. KC/CXCL1 (10 ⁻⁹ г/мл)	концентр. TNF-альфа (10 ⁻⁹ г/мл)**
CSS-1	1,5	/	/	/
CSS-6	0,7	<3	137	<125
CSS-8	3,7	/	/	/
CSS-10	2,1	<3	>700	<125
Контролі				
Негативний контроль (фіз. розчин)	0,2	17	23	272
Позитивний контроль (1 % карагенан)	33,2	28	700	767
Synvisc® (Hylan GF-20)	0,7	4	46	<125

* середнє значення по 3 тваринам;

** межа виявлення: 3,10⁻⁹ г/мл для IL1-бета і 125,10⁻⁹ г/мл для TNF-альфа.

В цілому, було виявлено, що ці композиції на основі CSS викликають імунологічну реакцію типу реакції на чужорідне тіло, про що свідчить кількість білих кров'яних клітин в клітинному інфільтраті, яка є вищою, ніж для негативного контролю, проте не такою високою, як для позитивного контролю (1 % карагенан). Реакція, індукована композиціями, відрізняється активацією нейтрофілів, про що свідчить більш висока концентрація маркера KC/CXCL1 в порівнянні з негативним контролем і продуктом Synvisc®. Що стосується маркерів IL1-бета і TNF-альфа, їх рівні є низькими.

Модифікація DA і/або DS CSS або фактично модифікація його молекулярної маси не призводить до будь-яких відмінностей в імунологічній реакції. Хоча композиції CSS мають будь-якого шкідливого впливу на тканини локально, необхідно мати можливість отримати більш високий рівень імуносумісності у випадку терапевтичних застосувань, які націлені на тканини, які ослаблені відповідною патологією, наприклад, такою як синдром сухого ока, ушкодження рогівки або запалення, пов'язані з патологіями суглобів.

Приклад 2. Карбоксиметил хітозани тваринного походження

Можливе отримання двох карбоксиметил хітозанів тваринного походження для фармацевтичного або медичного застосування, які можливо імплантувати або ін'єкувати (СС-1 і СС-2 в Таблиці 2а).

Тестували два інших карбоксиметил хітозани:

- один СС, отриманий шляхом карбоксиметилування хітину тваринного походження (СС-3);
- один СС, отриманий шляхом карбоксиметилування хітозану тваринного походження, причому хітозан отримували шляхом деацетилування хітину тваринного походження (СС-4).

Карбоксиметил хітозани (СС) характеризували за допомогою ЯМР на ядрах ¹³C, щоб підтвердити їх ідентичність і визначити значення DA (ступінь ацетилування) і DS (ступінь заміщення карбоксиметильною групою) з похибкою, оціненою приблизно в ±10 % (таблиця 2а). Електростатичний заряд полімеру характеризували шляхом вимірювання його дзета-потенціалу при концентрації 0,05 % (маса/маса) в діапазоні рН від 8 до 4, і реєстрували значення дзета-потенціалу при рН 7,5 (Таблиця 2а). Спостерігалось, що значення дзета-потенціалу при рН 7,5 відносно добре корелює зі значенням DS, визначеним за допомогою ЯМР на ядрах ¹³C. Наприклад, полімер СС-3 заміщений більшою мірою, ніж полімер СС-4, аніонною

карбоксиметильною групою (в карбоксилатної формі при рН 7,5) і має аналогічний DA, тому його загальний негативний заряд є вищим (-28 мВ проти -11 мВ при рН 7,5).

Спостерігається, що полімери СС-1 і СС-2 не досить розчинні у фізіологічному діапазоні рН (рН 6,5-7,5). Неможливо оцінити їх імуносумісність, використовуючи модель підшкірного "повітряного мішка" у мишей. Полімери СС-3 і СС-4 фактично розчиняються у всьому широкому діапазоні рН 1-9.

Таблиця 2а

Характеристики карбоксиметил хітозанів тваринного походження та їх композицій

№ (конц.)	DA* (мол. %)	DS* (мол. %)	Діапазон розчинності полімеру	Стерилізація композиції в автоклаві	Дзета-потенціал при рН 7.5 (мВ)
СС-1 (2 %)	8	124	Не розчиняється в діапазоні рН 3,6-8,1	/	/
СС-2 (2 %)	/	/	Не розчиняється при рН нижче 6,6	/	/
СС-3 (2 %)	71	149	Розчинний при всіх значеннях рН	немає	-28
СС-4 (1,5 %)	69	24	Розчинний при всіх значеннях рН	Так	-11

* Значення DA і DS для карбоксиметил хітозанових полімерів визначали за допомогою твердофазної спектроскопії ядерного магнітного резонансу (ЯМР) на ядрах ¹³C

Композиції СС-3(2 %) і СС-4 (1,5 %) потім отримували таким же способом, що і в Прикладі 1, упаковували в скляні шприци і потім стерилізували в автоклаві відповідно до стандартного циклу, що становить 15 хвилин, при 121 °С (таблиця 2а). Було виявлено, що 2 % композиції полімеру СС-3 не витримує кінцевої стерилізації в автоклаві, що підтверджується втратою її в'язкості приблизно на 60 %, бо свідчить про гідроліз полімеру, а також втратою на 98 % його модуля зберігання G'. Як альтернатива кінцевої стерилізації в автоклаві композицію СС-3 потім фільтрували перед упаковуванням в шприц, щоб отримати композицію, яку можна оцінити, використовуючи модель "повітряного мішка" у мишей.

Композиції СС-3 (2 %, фільтровані) і СС-4 (1,5 %, стерилізовані в автоклаві) перевіряли, щоб переконатися, що рівень ендотоксинів і мікробіологічне навантаження становлять нижче 20 ЕО/мл і 100 КУО/г, і потім оцінювали їх імуносумісність з використанням моделі підшкірного "повітряного мішка" у мишей (таблиця 2b).

Таблиця 2b

Імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану тваринного походження з використанням моделі підшкірного "повітряного мішка" у мишей, через 24 години після ін'єкції *

№	Кількість білих кров'яних клітин (×10 ⁶ клітин/мл)	Концентр. ІЛ 1-бета (×10 ⁹ г/мл)**	Концентр. КС/СХСL 1 (×10 ⁹ г/мл)	Концентр. TNF –альфа (×10 ⁻⁹ г/мл)**
СС-3	0,7	<3	49	<125
4	1,0	5	115	184
Контролі				
негативний контроль (фіз. розчин)	0,2	17	23	272
позитивний контроль (1 % карагенан)	33,2	28	> 700	767
Synvisc® (Hylan GF20)	0,7	4	46	<125

* середнє значення по 3 суб'єктам; ** межа виявлення: 3×10⁻⁹ г/мл для ІЛ1-бета і 125,10⁻⁹ г/мл для TNF-альфа

Композиція СС-4 спричиняє сильну реакцію, яка характеризується високою концентрацією в інфільтраті двох маркерів одночасно, КС/СХСL1 (активація нейтрофілів) і TNF-альфа. Маркер TNF-альфа не було виявлено після ін'єкції композиції СSS, описаних в Прикладі 2, або Synvisc® (Hylan GF-20). Однак небажано викликати реакцію, що характеризується маркером TNF-альфа. Оскільки бажано мати хорошу імуносумісність у випадку терапевтичних застосувань, щодо яких очікується, що композиція буде знаходитися в контакті з тканинами, ослабленими основною патологією, такою як, наприклад, синдром сухого ока, ушкодження або травма рогівки, або запалення суглобів, і уникнути активації нейтрофілів і TNF-альфа, карбоксиметил хітозан тваринного походження СС-4 є непридатним.

Композиція СС-3 індукує слабшу реакцію, яка характеризується кількістю білих кров'яних клітин і помірною концентрацією маркера КС/СХСL1, аналогічною з рівнями продукту порівняння Synvisc®, але вищою рівнів для негативного контролю (фізіологічний розчин). Таким чином, композиція СС-3, мабуть, є менш імунореактивною, ніж композиції СSS і композиція СС-4. Однак композиція СС-3 має той недолік, що вона має концентрацію маркера КС/СХСL1, яка може виявитися непридатною для способу терапевтичного лікування, коли суб'єкту потрібно дуже хороша імуносумісність, і в тому, що вона піддається дуже значному гідролізу макромолекулярних ланцюгів під дією тепла, що, таким чином, робить неможливою її стерилізацію в автоклаві на кінцевій стадії в кінці виробничого процесу, тобто після заповнення шприца композицією.

Приклад 3. Карбоксиметил хітозани грибного походження

Щоб отримати карбоксиметил хітозани подані в Таблицях 3а і 3б, з хітину або хітозану грибного походження, проводять такі реакції:

- реацетилування з подальшим карбоксиметилуванням грибного хітозану з "надвисокою" молекулярною масою (СС-5 в Таблиці 3а);

- карбоксиметилування з подальшим реацетилуванням грибного хітозану з "надвисокою" молекулярною масою (від СС-5 до СС-9);

- карбоксиметилування грибного хітозану з "надвисокою" молекулярною масою (СС-11);

- карбоксиметилування грибного хітину (СС-10).

Наприклад, СС-8 отримували наступним чином:

10 г хітозану з "надвисокою" молекулярною масою дисперговані в 220 мл ізопропанолу і 68 мл 40 % гідроксиду натрію (маса/об'єм). 45 г алкілюючого агента монохлороцтової кислоти (МСА) розчиняли в 45 мл ізопропанолу і додавали до суспензії хітозану. Реакції дозволяли відбуватися протягом 16 годин при 25 °С. Полімер виділяли осадженням в етанолі, потім очищали за допомогою циклів сольобілізації/осадження в етанолі. Осад сушили в вентильованій печі. Осад масою 15 г диспергували у воді і додавали до нього 3,75 мл оцтового ангідриду. Після 30 хвилин перемішування за кімнатної температури рН середовища доводили до 6, і до нього додавали 3,75 мл ангідриду кислоти (АС). Після 30 хвилин перемішування за кімнатної температури середу нейтралізували і осаджували в етанолі. Отриманий таким чином осад повторно розчиняли і потім знову осаджували. Кінцевий осад карбоксиметил хітозану (СС-8) сушили в вентильованій печі.

Параметри синтезу, які застосовуються для отримання інших СС, описані в таблицях 3а і 3б.

Таблиця 3а

Параметри синтезу карбоксиалкіл хітозану, з грибного хітозану

Параметри	СС-5	СС-6	СС-7	СС-8	СС-9	СС-11
Стадія карбоксиметилування						
Алкілюючі агенти (МСА або SCA)*	SCA	MCA	MCA	MCA	MCA	MCA
NaOH/хітозан (маса/маса)	11	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Сечовина	Так	немає	немає	немає	немає	немає
Алкілюючий агент/хітозан (маса/маса)	11,2	9	9	4, 5	4, 5	6, 8
Ізопропанол/алкілюючий агент (% , маса/маса)	0 %	80 %	80 %	80 %	80 %	80 %
Температура (°С)	15 °С	15 °С	25 °С	25 °С	35 °С	60 °С
Тривалість (год.)	22 год.	16 год.	16 год.	16 год.	4 год.	1 год.

Таблиця 3а (продовження)

Стадія реацетилювання						
До і після карбоксиметилювання	до	після	після	після	після	/
АС/хітозан (об'єм/маса)						
- першій доданий	0,3	0,25	0,25	0,25	0,25	/
- другій доданий	0,3	0,25	0,25	0,25	0,25	/
Тривалість і температура реакції	0,5 год. при 25 °С	0,5 год. при 25 °С	0,5 год. при 25 °С	0,5 год. при 25 °С	0,5 год. при 25 °С	/

* MCA: монохлороцтова кислота; SCA: натрієва сіль монохлороцтової кислоти

Таблиця 3б

Параметри синтезу карбоксиалкіл хітозану з грибного хітину

Параметри	CC-10
Хітин/сода/вода (маса/маса)	1/11,4/28,5
Тривалість і температура контакту з содою	16 год. при 4 °С
Алкілюючі агенти (MCA або SCA)	MCA
Хітин/ізопропанол/алкілюючий агент (маса/маса/маса)	1/28,5/4,5
Тривалість і температура реакції	16 год. при 25 °С

5 Отримані карбоксиметил хітозани (CC) грибного походження характеризували ЯМР на ядрах ^{13}C , щоб підтвердити їх структуру і визначити значення DA і DS (Таблиця 3с). Беручи до уваги стандартне відхилення, властиве методу спектрометрії ЯМР на ядрах ^{13}C (приблизно $\pm 10\%$), спостерігалось, що значення дзета-потенціалу при рН 7,5 корелює з молекулярною структурою, зокрема, з DS.

Таблиця 3с

Характеристики карбоксиметил хітозанів грибного походження і їх композиції

№ (концентрація)	DA* %	DS* %	Розчинність полімеру	Стерилізація в автоклаві**	Дзета-потенціал при рН 7.5 (мВ)
CC-5 (1,5 %)	67	18	Розчинний при будь-якому рН	Так	-12,5
CC-6 (2 %)	71	42	Розчинний при будь-якому рН	Так	-15
CC-7 (2 %)	57	70	Розчинний при будь-якому рН	Так	-18
CC-8 (2 %)	50	80	Розчинний при будь-якому рН	Так	-26
CC-9 (2 %)	41	101	Розчинний при рН>3,1	Так	-22
CC-10 (2 %)	46	167	Розчинний при будь-якому рН	Так	-24,5
CC-11 (2 %)	23	130	Розчинний при рН>3,5	Так	-26

* DA і DS, як визначено ^{13}C -ЯМР;

** вважається придатною для стерилізації, якщо втрата в'язкості до/після стерилізації становить менше 40 %.

10

Всі отримані CC є розчинними в широкому діапазоні рН, зокрема, в діапазоні рН 4,0-8,5, без опалесценції.

15

Композиції отримували при концентрації CC, рівній 1,5 % або 2 %, упаковували в скляні шприци, потім стерилізували в автоклаві відповідно до стандартного 15-хвилинного циклу при 121 °С. Щоб оцінити, чи можна стерилізувати композиції в автоклаві, характеристичну в'язкість полімерів вимірювали до і після автоклавовання за допомогою капілярної віскозиметрії після розведення в 25 разів фосфатним буфером. Втрата в'язкості CC складала менше 40 %, що вказує на прийнятну стійкість, на відміну від композиції CC-3, описаної в Прикладі 2 (яка втратила приблизно 60 % своєї в'язкості).

20

Візуальний огляд стерилізованих композицій, включених до таблиці 3с, показав, що вони є прозорими і не опалесцюючими. Потім їх перевіряли, щоб упевнитися в тому, що рівень

ендотоксинів і мікробіологічне навантаження становлять менше 20 ЕО/мл і 100 КУО/г, і після цього оцінювали їх імуносумісність, використовуючи модель підшкірного "повітряного мішка" у мишей.

Таблиця 3d

Імуносумісність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження з використанням моделі підшкірного "повітряного мішка" у мишей, через 24 годин після ін'єкції*

№	Кількість білих кров'яних клітин (×10 ⁶ клітин/мл)	Кон-ція IL1 бета (×10 ⁹ г/мл)	Кон-ція KC/CXCL1 (×10 ⁻⁹ г/мл)**	Кон-ція TNF-альфа (×10 ⁻⁹ г/мл)**
СС-5	1,9	6	28	391
СС-6	17	12	20	<125
СС-7	9,0	12	20	<125
СС-8	2,6	<3	20	<125
СС-9	6,5	7	20	<125
СС-10	2,4	<3	16	<125
Контролі				
негативний контроль (Фіз. розчин)	0,2	17	23	272
позитивний контроль (1 % карагенан)	33,2	28	>700	767
Synvisc® (Hylan GF20)	0,7	4	46	<125

* Середнє значення по 3 об'єктах; ** межа виявлення: 3×10⁻⁹ г/мл для IL1-бета і 125×10⁻⁹ г/мл для TNF-альфа.

5

В цілому, відзначається наявність високої імуносумісності композицій СС грибного походження з ослабленням або навіть пригніченням імунної реакції в порівнянні з композиціями N-сукцініл хітозану, описаними в Прикладі 1, і з композиціями карбоксиметил хітозану тваринного походження, описаними в Прикладі 2.

10

Відзначається, що низька концентрація маркера KC/CXCL1 індукована композиціями СС грибного походження, знаходиться на тому ж рівні, що і для негативного контролю (фізіологічний розчин), і нижча, ніж для продукту Synvisc®. Це свідчить про незначну або навіть відсутність активації нейтрофілів, на відміну від рівня, про який повідомлялося після введення композиції ССС (Приклад 1) і СС тваринного походження (Приклад 2).

15

Крім того, наголошується, що для деяких композицій СС грибного походження (а саме СС-8 і СС-10) чотири параметри імунної реакції є одночасно ослабленими або пригніченими, тобто загальна кількість білих кров'яних клітин, маркер IL1-бета, маркер KC-CXCL1 і маркер TNF-альфа. Цього не відбувалося зі композиціями ССС або зі композиціями СС тваринного походження.

20

Мабуть, для композиції СС грибного походження, композиції, які демонструють це одночасне ослаблення чотирьох параметрів, є композиціями з найвищим негативним зарядом (наприклад, -26 мВ для СС-8 і -24,5 мВ для СС-10 при рН 7,5).

25

Спостерігається, що композиції СС-4 тваринного походження, описані в Прикладі 2, і СС-5 грибного походження, слабо заміщені карбоксиалкільною групою, викликають певну активацію маркера TNF-альфа, і що, з іншого боку, тільки композиція СС-4 тваринного походження призводить до значної секреції маркера KC/CXCL1. Також спостерігається, що композиція СС-10 (грибного походження) не призводила до активації нейтрофілів, на відміну від композиції СС-3 тваринного походження, описаної в Прикладі 2.

30

Приклад 4. Оцінка локальної переносимості внутрішньосуглобового введення композиції карбоксиметил хітозану грибного походження з використанням овечої моделі

35

Композиції з 2 % двох карбоксиметил хітозанів грибного походження (СС-8 і СС-10), описані в Прикладі 3, готували для оцінки їх можливого застосування за допомогою внутрішньосуглобової ін'єкції на моделі овець (вівця). Об'єм 2 мл двох композицій вводили вівці, і місцеву реакцію, спричинену внутрішньосуглобовою ін'єкцією, оцінювали протягом 2 тижнів. Також, оцінювали ефекти другої ін'єкції композиції СС-8 в тому ж самому суглобі через 1 місяць після дати першої ін'єкції. Продукт Synvisc® вводили таким же способом в об'ємі 1 мл або 2 мл.

Клінічні ознаки щодня контролювали шляхом пальпації суглоба і спостереження за виникненням кульгавості протягом 15 днів і оцінювали на основі напівкількісної оцінки від 0 (немає сигналу) до максимального балу 3 для кульгавості і 5 для кульгавості. Загальний клінічний результат за період 15 днів представляли у вигляді частоти випадків виникнення в балах (таблиця 4), а також у вигляді характеристики синовіальної рідини, продукованої на 15 день.

Таблиця 4

Оцінка локальної переносимості композиції карбоксиметил хітозану грибного походження і Synvisc® з використанням моделі вівці шляхом внутрішньосуглобової ін'єкції

№ композиції об'єм (N: кількість тварин)	Частота випадків виникнення кульгавості за 15 днів (бал від 0 до 3)	Частота випадків виникнення кульгавості за 15 днів (бал від 0 до 5)	Характеристика синовіальної рідини, взятої шляхом пункції на 15 день
CC-8 Перша ін'єкція 2 мл (N=4)	Бал 0: 100 % Бали 1-3: 0 %	Бал 0: 100 % Бали 1-5: 0 %	Нормальна
CC-8 Друга ін'єкція 2 мл (N=2)	Бал 0: 100 % Бали 1-3: 0 %	Бал 0: 100 % Бали 1-5: 0 %	Нормальна
CC-10 Одна ін'єкція 2 мл (N=4)	Бал 0: 100 % Бали 1-3: 0 %	Бал 0: 100 % Бали 1-5: 0 %	Нормальна
Synvisc® (Hylan GF-20) N=8, з яких: одна ін'єкція 1 мл (N=4), - одна ін'єкція 2 мл (N=4)	Бал 0: 62,5 % Бал 1: 37,5 % Бали 2-3: 0 %	Бал 0: 62,5 % Бал 1: 37,5 % Бали 2-5: 0 %	Нормальна

Приклад 5. Оцінка локальної переносимості композиції карбоксиметил хітозану грибного походження після внутрішньошкірної ін'єкції у кроликів

Композиції трьох карбоксиметил хітозанів грибного походження при фізіологічному значенні рН і осмоляльності готували для оцінки можливості їх внутрішньошкірного введення на моделі кролика (Таблиця 5а). CC-12, CC-13, CC-14 і CC-15 грибного походження готували шляхом карбоксиметилювання з подальшим реацетилюванням відповідно до загального способу, описаного в Прикладі 3 для CC-8, при цьому модулюючи параметри синтезу таким чином, щоб викликати варіювання DA і DS (Таблиця 5а). CC-13 і CC-14 показали низьке значення DS, яке становило 41 % і 51 %, відповідно, і високе значення DA, яке становило 74 % і 69 %, відповідно.

Композиціями наповнювали скляний шприц об'ємом 1 мл і потім стерилізували в автоклаві відповідно до стандартного циклу (15 хвилин при 121 °C). Три композиції виявилися стійкими до стерилізації в автоклаві, при цьому втрата в'язкості складала менше 40 %. Наприкінці, композиції перевіряли, щоб упевнитися, що рівень бактеріальних ендотоксинів становить менше 40 ЕО/мл, і мікробіологічне навантаження становить менше 100 КУО/мл.

Композицію в об'ємі 200 мкл вводили кроликам шляхом внутрішньошкірної ін'єкції крізь голку діаметром 27 калібру (голка дуже маленького діаметру), згідно з протоколом, який відповідає стандарту ISO1099 3 (частина 10) для оцінки первинного подразнення, спричиненого внутрішньошкірним імплантатом. Шість кроликів отримували по три ін'єкції кожного композиції. Комерційно доступний продукт дермального філера на основі зшитої гіалуронової кислоти, Juvéderm® Voluma (Allergan), також вводили крізь голку діаметром 27 калібру. Макроскопічні сигнали подразнення шкіри реєстрували для всіх ін'єктованих через 12, 24 і 48 годин тварин і ділянок для визначення балу первинного подразнення шляхом оцінки можливої появи еритеми, виразки, набряку та ущільнення за напівкількісною шкалою, заснованої на балах від 0 (відсутність сигналу) до 4 (максимальний сигнал). Бал первинного подразнення для кожного продукту визначали наступним чином: складали середні значення балів еритеми для 18 ділянок, ін'єктованих через 24, 48 і 72 години. Суму середніх значень балу набряку розраховували аналогічним чином. Складали 2 суми (еритема і набряк), і потім ділили на 54 з отриманням середнього балу первинного подразнення. Такий же підхід до методики застосовували для продукту порівняння. Бали подразнення представлені в Таблиці 5b. Спостерігалось, що композиції CC продемонстрували відсутність ознак набряку і кілька ознак еритеми, при цьому бал виявився нижчим, ніж у кроликів, індукованих Juvéderm® Voluma у всіх випадках. Можна зробити висновок про те, що композиції не викликають подразнення і менше подразнюють ніж Juvéderm® Voluma.

Таблиця 5а

Характеристики карбоксиметил хітозанів грибного походження та їх складів

№ (конц-ція)	DA* (мол. %)	DS* (мол. %)	розчинність полімеру	Стерилізація в автоклаві**	Дзета-потенціал при рН 7.5 (мВ)
CC-12 (3 %)	41	50	Не розчиняється в інтервалі рН 3,1-6, 6	Так	-17
CC-13 (3 %)	74	45	Розчинний при будь-якому рН	Так	-20
CC-14 (3 %)	69	51	Розчинний вище рН 3,6	Так	-17***
CC-15 (2 %)	55	100	Розчинний вище рН 3,1	Так	-27.5

* як визначено методом ¹³C-ЯМР;

** вважається придатною до стерилізації, якщо втрата в'язкості до/після стерилізації в автоклаві становить 40 % або менше;

*** значення, оцінене з поліноміальної регресії кривої дзета-потенціалу при рН 7,5 як функція DS (± 20 %).

Таблиця 5б

Оцінка балу первинного подразнення композиції карбоксиметил хітозану і Juvéderm® Voluma після внутрішньошкірної ін'єкції у кроликів

№ (концентрація)	Бал первинного подразнення через 72 год. Загальний бал (і середній бал)
CC-12 (3 %)	0,11 (0,002)
CC-13 (3 %)	0,22 (0,004)
CC-14 (2 %)	0 (0)
Juvéderm® Voluma	2,67 (0,049)

5 Потім період спостереження продовжували до 2 тижнів після ін'єкції, при цьому клінічні сигнали оцінювали на 5, 7, 9, 11 і 14 день. Для проведення можливого гістологічного аналізу 2 тварин забивали на 3, 7 і 14 день після ін'єкції. Загальні оцінки представлені в таблиці 5с.

10 Спостерігалось, що чотири композиції продемонстрували чудову локальну переносимість протягом періоду, що становить 2 тижні, після внутрішньошкірної ін'єкції, при цьому бали були нижчими в порівнянні з балами, які спостерігаються для продукту Juvéderm® Voluma за всіма спільними або макроскопічними ознаками, і без ознак виразки або набряку. Композиції CC-12 і CC-13 показали деякі ознаки еритеми з низьким балом (максимум 1), які зникли на день 11. Композиція CC-14 демонструвала деякі ознаки еритеми з максимальним балом 2, при цьому 33 % випадків виникнення спостерігалось на 9 день, які також зникли на 11 день і не мали шкідливого впливу на тканину.

15

Таблиця 5с

Оцінка локальної переносимості композиції карбоксиметил хітозану після внутрішньошкірної ін'єкції у кроликів (2 тижні) (виражена у вигляді частоти випадків виникнення в балах)

№ (концентрація)	Період часу (к-ть ділянок)*	3 день (18)	5 день (12)	7 день (12)	9 день (6)	11 день (6)	14 день (6)
		Бал еритеми					
CC-12 (3 %)	бал 0-1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
CC-13 (3 %)	бал 0-1	100 %	100 %	83 %	67 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	17 %	33 %	0 %	0 %
CC-14 (3 %)	бал 0-1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
CC-15 (2 %)	бал 0-1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Juvéderm® Voluma	бал 0-1	6 %	17 %	17 %	17 %	33 %	33 %
	бал 2-4	94 %	83 %	83 %	83 %	67 %	67 %
Бали виразки і набряку							
CC-12 (3 %)	бал 0-1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
CC-13 (3 %)	бал 0-1	100 %	100 %	83 %	67 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	17 %	33 %	0 %	0 %
CC-14 (3 %)	бал 0-1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
CC-15 (2 %)	бал 0-1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Juvéderm® Voluma	бал 0-1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	бал 2-4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

* Кількість ділянок, оцінених макроскопічно в кожен період часу після ін'єкції.

Крім того, чотири композиції (CC-12, CC-13, CC-14 і CC-15) можуть бути легко введені крізь тонку голку 27 калібру, яка підходить для внутрішньошкірного введення.

5 Приклад 6. Схильність ферментативної деградації *in vitro*.

У цьому Прикладі проводили порівняння швидкості, з якою композиція розкладається в присутності суміші двох ферментів лізоциму і гіалуронідази, присутніх в біологічних рідинах (наприклад, синовіальній рідині, сльозах або інтерстиціальній рідині сполучних тканин). Фермент лізоцим в цілому відомий своєю здатністю гідролізувати біоматеріали на основі хітозану.

10 Грибний карбоксиметил хітозан CC-16 отримували таким же способом, як CC-8, вказаний в Прикладі 3, шляхом модулювання параметрів синтезу для регулювання DA і DS. 2 % композиції CC-16, CC-8 (Приклад 3) і CC-10 (Приклад 3) готували в фосфатному буфері з 3,5 % сорбіту. Також, проводили оцінку 2 % композиції CC-3 тваринного походження (Приклад 2) і двох комерційно доступних продуктів віскозаплектації на основі незшитого гіалуронової кислоти (HA-1 і HA-2).

15 Композицію розбавляли в 25 разів в фосфатному буфері. Потім розчин перемішували протягом 12 годин і в розбавлений розчин додавали суміш ферментів лізоциму і гіалуронідази в дозах 184 одиниць/мл і 2,6 одиниць/мл, відповідно. Вимірювання в'язкості проводили через регулярні інтервали за допомогою автоматичного капілярного віскозиметра I-Visc (Lauda), оснащеного капіляром типу Ubbelohde (модель 0a). Потім розраховували період напіввиведення кожної композиції, тобто час, необхідний для того, щоб характеристична в'язкість полімеру досягла половини свого початкового значення (таблиця 6).

Таблиця 6

Період напіврозпаду композиції в присутності суміші ферментів лізоциму/гіалуронідази при 37 °С

	CC-8 (2 %)	CC-10 (2 %)	CC-16 (2 %)	CC-3 (2 %)	HA-1	HA-2
DA/DS (мол. %)*	50/80	46/167	67/115	71/149	/	/
період напіввиведення (хв.)	1200 хв.	958 хв.	612 хв.	88 хв.	73 хв.	11 хв.

* Визначено за допомогою твердофазної спектроскопії ядерного магнітного резонансу (ЯМР) на ядрах ¹³C

Виходячи з отриманих результатів стає зрозуміло, що композиції карбоксиметил хітозану гідролізуються сумішшю лізоциму/гіалуронідази, і що кінетика гідролізу може бути модульована за допомогою молекулярної структури карбоксиметил хітозану. Це дозволяє регулювати тривалість перебування товару відповідно до цільового терапевтичного застосування. Звідси також випливає, що карбоксиметил хітозани грибною походження розкладаються менш швидко, ніж карбоксиметил хітозан тваринного походження (CC-3), а також два комерційно доступних продукти на основі гіалуронової кислоти.

Приклад 7. Вплив тепла

У цьому прикладі шприци, які містять композиції, поміщали в піч за температури, яку підтримували на рівні 60 °С, на період 11 днів, що дозволяє оцінити їх теплостійкість за температури, вищої ніж звичайна температура зберігання. В кожному часовому інтервалі шприц витягували, і характеристичну в'язкість полімеру вимірювали відповідно до способу, описаного в Прикладі 6. Представлено співвідношення між в'язкістю в заданому часовому інтервалі і початковою в'язкістю (в % від початкової в'язкості).

Два карбоксиметил хітозани грибною походження, CC-17 і CC-18, отримували таким же способом, як CC-8 в Прикладі 3, шляхом модулювання параметрів синтезу таким чином, щоб регулювати DA і DS, і характеризували за допомогою ЯМР на ядрах ¹³C (таблиця 7). Їх складала при концентрації 2 % в присутності відновлюючого цукру, сорбіту або маніту, відповідно. Також, проводили оцінку 2 % композиції CC-3 тваринного походження, зазначеної в Прикладі 2 (з 3,5 % сорбіту), а також комерційно доступного продукту віскозуплементатії на основі незшитого гіалуронової кислоти, зазначеної в Прикладі 6 (HA-2).

Таблиця 7

Зміна характеристичної в'язкості композицій, що зберігаються при 60 °С (у % від початкової в'язкості)

№ (концентрація, відновлюючого цукру)	DA/DS (мол. %)*	день 3	день 7	день 11
CC-17 (2 %, 3,5 % сорбіту)	71/49	96 %	95 %	91 %
CC-18 (2 %, 3,5 % маніту)	71/49	100 %	92 %	91 %
CC-3 (2 %, 3,5 % сорбіту)	71/149	84 %	80 %	70 %
HA-2	/	94 %	92 %	81 %

*Як визначено твердофазною спектроскопією ядерного магнітного резонансу (ЯМР) на ядрах ¹³C

Можна зробити висновок про те, що композиції карбоксиметил хітозану грибною походження є теплостійкими і менш чутливими, ніж композиція тваринного походження (CC-3) і комерційно доступний продукт на основі гіалуронової кислоти.

Приклад 8. Способи зниження мікробіологічної навантаження карбоксиметил хітозану

Карбоксиметил хітозан грибною походження, CC-19 отриманий відповідно до способу, який використовували для отримання CC-8 в Прикладі 3, із хітозану з "надвисокою" молекулярною масою. Він має наступні характеристики: DA 67 % і DS 115 % (за даними ЯМР на ядрах ¹³C), розчинний при будь-якому рН, прозорий, опалесціє. Дзета-потенціал композиції при рН 7,5 згідно з оцінками становить -27 мВ (з поліноміальної регресії кривої залежності дзета-потенціалу від DS). Готували 2 % композиції CC-19 в фосфатному буфері з 3,5 % сорбіту, як описано в Прикладі 3. Він має наступні характеристики: рН 7,3 і осмоляльність 279 мОсм/кг. Для

тестування можливості їх застосування і впливу на кінцеві характеристики композиції, ефективно застосовували два відомих способи з метою зменшення мікробіологічного навантаження водних композицій, і характеристичну в'язкість композиції (розведеної в 25 разів) порівнювали з використанням капілярного віскозиметра I-Visc (Lauda, капіляр 0a), і його показник заломлення вимірювали за допомогою рефрактометра HI8871 3 (Hanna) до і після процесу (Таблиця 8). Ці два способи були наступними:

- автоклав: композицією наповнювали скляний шприц і потім шприц автоклавували відповідно до стандартного процесу (15 хвилин при 121 °С);

- фільтрація: об'єм 300 мл композиції фільтрували, використовуючи пористий фільтр 0,2 мкм (капсульний фільтр Preflow, Pall).

Процес фільтрації на 0,2 мкм фільтрі відбувався відповідним чином при постійному тиску, рівному 2 бар, і постійної швидкості потоку, яка становила приблизно 6 літрів на годину.

Таблиця 8

Вплив способів фільтрації і автоклавування на композицію 2 % СС-19

Показник	Спосіб фільтрації (0,2 мкм)	Спосіб автоклавування (15 хв. 121 °С)
Різниця в в'язкості (%)	14 % зниження початкової в'язкості	20 % зниження початкової в'язкості
Різниця в показнику заломлення	немає різниці	немає різниці

Можна зробити висновок, що обидва способи слабо впливають на відновлення матеріалу (показник заломлення) і деградацію полімеру (характеристична в'язкість). Тому вони можуть бути застосованими в промисловості для отримання медичних пристроїв і фармацевтичних продуктів на основі композиції карбоксиметил хітозану.

Приклад 9. Змащувальна здатність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження, *in vitro*.

Метою даного прикладу є ілюстрація змащувальної здатності композиції двох карбоксиметил хітозанів грибного походження, СС-8, зазначеного в Прикладі 3 (2 % і 1 %), і СС-19, зазначеного в Прикладі 8 (2 %), щодо їх можливого застосування як внутрішньосуглобного віскосуплементу або як офтальмологічних крапель для поверхні ока. Змащувальну здатність оцінювали з використанням моделі *in vitro*, яка дозволяє оцінити зменшення тертя між двома поверхнями. Також, характеризували композицію СС-3 (2 %) тваринного походження, зазначену в Прикладі 2, і комерційно доступні продукти на основі гіалуронової кислоти:

- внутрішньосуглобові віскосуплементи: Synvisc® (Sanofi) і два віскосуплементи на основі незшитої гіалуронової кислоти, HA-2, зазначеної в Прикладах 6 і 7, і HA-3;

- очні краплі: два продукти на основі незшитої гіалуронової кислоти (HA-4 і HA-5).

Крім того, зразок синовіальної рідини брали з коліна пацієнта, що страждає на остеоартроз, перед хірургічною процедурою по установці колінного протезу. Рідину зберігали при -20 °С, потім нагрівали до 25 °С до аналізу коефіцієнта тертя.

Коефіцієнт тертя вимірювали за такою методикою. Два диска, виготовлені з біоматеріалу поліакрилатного типу, який використовується для виготовлення гідрофобних інтраокулярних лінз (як описано в патенті EP 1830898), що мають діаметр 16,15 мм, попередньо гідратованих шляхом занурення в воду за температури 60 °С на період приблизно 2 години, потім фіксували до верхньої і нижньої геометрії реометра Discovery Hybrid Rheometer-2 (DHR-2) (TA Instruments). Досліджувану рідину в об'ємі приблизно 100 мкл поміщали на нижній диск, потім верхню геометрію опускали до досягнення контакту між двома дисками, до докладання нормальної сили 5 ньютонів. Вимірювання коефіцієнта тертя проводили при 25 °С протягом 150 секунд, за постійної нормальної сили (5 Н), частоти коливань 1,256 рад/с і з кутом деформації приблизно 0,05 радіан, відповідно до протоколу, адаптованого з протоколу, описаного Waller et al. (B: J Rheumatol 39, 7, 1473, 2012). Опція "відповідність нульовій точці початку коливального руху" активована. У кожній точці вимірювання записували значення крутного моменту і потім розраховували коефіцієнт тертя (COF) за формулою:

$$COF = \text{крутний момент} / (1/3 \times \text{діаметр диска} \times \text{нормальна сила})$$

Для кожної композиції вимірювання повторювали 5 разів. Значення коефіцієнта тертя отримували шляхом екстраполяції точки перетину на початку кожної кривої COF залежно від часу (COF0, Таблиця 7).

Змащувальна здатність композиції карбоксиметил хітозану грибного походження

№ (концентрація)	Коефіцієнт тертя (COF ₀)		
	Вимірювання 1	Вимірювання 2	Вимірювання 3
Синовіальна рідина від пацієнта з артритом	20	40	12
CC-8 (2 %)	1,2	1,7	1,3
CC-8 (1 %)	2,4	3,7	3,9
CC-19 (2 %)	4,0	3,2	3,0
CC-3 (2 %)	6,2	6,1	6,0
Synvisc®	3,2	3,1	3,8
HA-2	6,7	6,3	6,6
HA-3	5,3	5,6	4,5
HA-4	6,8	6,7	6,0
HA-5	29,4	13,3	26,1

У присутності композиції 2 % і 1 % карбоксиметил хітозану коефіцієнт тертя є низьким, того ж порядку або навіть нижчий в порівнянні з комерційно доступними продуктами для внутрішньосуглобового і офтальмологічного застосування, і значно слабкіший в порівнянні з ураженою артритом синовіальною рідиною, за умов вимірювання. З цього випливає, що композиції на основі карбоксиметил хітозану мають здатність діяти як мастило шляхом зменшення тертя між двома поверхнями, наприклад, поверхнями хряща суглоба після внутрішньосуглобової ін'єкції або поверхнями очей після закапування в формі крапель. Композиції CC грибного походження є більш ефективними для зменшення тертя в порівнянні з композиціями CC-3 тваринного походження.

Приклад 10. Застосування тонких голок для введення композиції карбоксиметил хітозану грибного походження внутрішньошкірним способом

Мета даного прикладу полягає в тому, щоб показати, що композиція 2 % карбоксиметил хітозану грибного походження може бути легко введеною в дерму, зокрема, з використанням дуже тонких голок, призначених для ін'єкції в поверхневі шари дерми. Тест полягає у вимірюванні сили, необхідної для витиснення продукту зі шприца, оснащеного голкою, при заданій швидкості введення на стенді для випробування на стиснення. В емпіричному сенсі вважають, що введення продукту є легким і зручним для лікаря і пацієнта, коли сила виштовхування, виміряна за допомогою цього тесту, становить менше 50 ньютонів, і введення відбувається рівномірним і плавним чином. Корисно вводити продукт за допомогою голок, які мають діаметр менше 0,3 мм (30 G), щоб звести до мінімуму біль і кровотечу при ін'єкції, а також подальший ризик утворення гематом і почервоніння шкіри.

Еталонний карбоксиметил хітозан грибного походження CC-20 складаєотримували відповідно до загального способу CC-8, зазначеного в Прикладі 3 із хітозану "надвисокого" типу, з наступними модифікаціями: для 10 г хітозану використовували 228 мл ізопропанолу, 57 мл 40 % гідроксиду натрію і 47 г МСА. Реакцію проводили при 35 °C протягом 23 годин. Для 15 г проміжного карбоксиметил хітозану використовували 7,5 мл оцтового ангідриду при кожному додаванні, і перед висушуванням і витяганням кінцевого карбоксиметил хітозану застосовували 3 додаткових цикли очищення. CC-20 має наступні характеристики: DA 53 % і DS 85 % (визначені методом ЯМР на ядрах ¹³C), розчинний у воді при будь-якому рН (відповідно до способу, описаного в цьому документі вище), утворює прозорий і опалесцюючий розчин, з дзета-потенціалом при рН 7,5, який дорівнює -24 мВ (з поліноміальною регресією кривої дзета-потенціалу залежно від DS).

Композицію 2 % (маса/маса) CC-20 отримували, як описано в Прикладі 3. Композицією наповнювали скляний шприц об'ємом 1 мл (BD-Medical), на якому встановлена голка. На стенді для випробувань на стискання MultiTest 2.5-i (Mechmesin), оснащеному датчиком сили, що працює на стискання, навантаження 100 Н, силу, необхідну для виштовхування продукту, вимірювали шляхом застосування постійної швидкості виштовхування 80 мм/хв. Максимальна сила, допустима обладнанням, становить приблизно 70 ньютонів. Тестували наступні голки: 30G, 32G, 33G і Invisible Needle™ (TSK Laboratory), розміри яких (зовнішній діаметр × довжина) наведені в таблиці 10.

Для порівняння комерційно доступні продукти на основі незшитої гіалуронової кислоти (продукти порівняння HA-6, HA-7) і зшитої гіалуронової кислоти (HA-8), призначені для омолодження шкіри за допомогою внутрішньошкірного введення, оцінювали таким же способом в оригінальному шприці. Результати представлені в таблиці 10.

5

Таблиця 10

Сила виштовхування (в ньютонках) для виштовхування композиції карбоксиметил хітозану грибного походження і комерційно доступних продуктів для омолодження шкіри крізь голки для внутрішньошкірної ін'єкції (швидкість 80 мм/хв.)

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

З цього Прикладу можна зробити висновок про те, що аналогічно до продуктів для омолодження на основі незшитої гіалуронової кислоти, композиція CC-20 легко ін'єктується шляхом використання тонких голок діаметром менше 0,3 мм. Відзначається, що виміряна сила виштовхування систематично навіть нижче, ніж у продуктів для омолодження на основі незшитої гіалуронової кислоти. Продукт для омолодження на основі зшитої гіалуронової кислоти вимагає систематично вищого зусилля, яке перевищує допустиму межу для голки найменшого діаметра (0,2 мм, Invisible Needle™). Крім того, ці результати були підтверджені вузькими спеціалістами за допомогою якісного тесту, що полягає у введенні композиції CC-20 і продуктів для омолодження в шкіру ноги свині.

10

15

Приклад 11. Композиції з низькою концентрацією карбоксиметил хітозану грибного походження при застосуванні їх як очних крапель

Мета даного Прикладу полягає в тому, щоб показати, що розчин карбоксиметил хітозану грибного походження з низькою концентрацією можна застосовувати для виготовлення очних крапель, призначених для застосування для зменшення симптомів порушень очної поверхні або для її захисту. На додачу до фізіологічних характеристик, тобто бажаного значення рН близько 7,2 і осмоляльності близько 200 мОсм/кг, офтальмологічні краплі бажано повинні мати такі фізико-хімічні властивості: низький показник заломлення (близький до 1,33) і здатність зводити до мінімуму тертя між поверхнею очі і кон'юнктивою і повіками (змащувальною здатністю). Нарешті, його реологічний профіль такий, що продукт є не надто рідким, щоб його можна було нанести на око, а скоріше поширюється рівномірно і не є липким. Його реологічний профіль також повинен бути таким, щоб трітіння або моргання повік було легким, без зусилля, тобто низька в'язкість при високій швидкості зсуву. Зокрема, Orobia et al. вважають, що в'язкість при русі очей (виключаючи тремтіння повік) бажано перевищує 10 мПа·с, наприклад, становить близько 20 мПа·с (в: Clinical Ophthalmology 12, 453, 2018). Тут слід зазначити, що значення в'язкості може змінюватися залежно від способу вимірювання і, зокрема, обладнання, режиму вимірювання та параметрів, температури і швидкості зсуву, які застосовуються до досліджуваного продукту.

20

25

30

Порівняльний карбоксиметил хітозан CC-21 грибного походження отримували тим же способом, що і CC-20, описаний в Прикладі 10. Проводили порівняння молекулярних структур CC-20 і CC-21 в кислотній формі за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії з використанням спектрометра Nicolet iS5, оснащеного ID7-ATR (Thermo Scientific), відповідно до способу, описаного Chen et al. Chen et al. (Carbohydrate Polymers 53, 355, 2003). Встановлено, що їх молекулярні структури є ідентичними на 99 % в області довжин хвиль 1200-1800 см⁻¹ і, як наслідок, є подібними до DA і DS.

35

40

Готували дві композиції карбоксиметил хітозану CC-21 з концентрацією 0,7 % і 0,4 % (маса/маса) в фосфатному буфері з гліцерином. Значення рН доводили до 7,2±0,2 і осмоляльність до 200±20 мОсм/кг, і потім композиції фільтрували, після чого їх змащувальну здатність і профіль в'язкості характеризували відповідно до способами, описаними нижче. Офтальмологічні краплі змінної композиції на основі гіалуронової кислоти (HA) характеризували відповідно до тих же способів (від HA-5 до HA-9). Результати представлені в таблиці 11b.

45

Спосіб вимірювання коефіцієнта тертя (підходить для очних крапель)

Здатність змащувати, тобто зменшувати тертя між двома контактуючими поверхнями, оцінювали шляхом вимірювання коефіцієнта тертя між двома дисками, виготовленими з поліакрилатного біоматеріалу, який ідентичний до матеріалів, зазначених в Прикладі 9. Два диска фіксували до верхньої і нижньої геометрії реометра DHR-2 (TA Instruments), досліджуваний продукт в об'ємі приблизно 100 мкл поміщали на нижній диск, потім верхню геометрію опускали до приведення в контакт двох дисків, до прикладання нормальної сили 5 ньютонів. Вимірювання коефіцієнта тертя проводили при 25 °С протягом 60 секунд при постійній нормальній силі (5 Н), частоті коливань 6 рад/с і з кутом деформації приблизно 1,71 радіан відповідно до протоколу, адаптованого з Waller et al. (J Rheumatol 39, 7, 1473, 2012), і параметрами, що імітують кінематичні умови моргання повік, описаних Kwon et al. (J Royal Society Interface 10, 2, 2013). Опція "відповідність нульовій точці початку коливального руху" активована. У кожній точці вимірювання записували значення крутного моменту і потім розраховували коефіцієнт тертя (COF) за формулою:

$$COF = \text{крутний момент} / (1/3 \times \text{діаметр диска} \times \text{нормальна сила}).$$

Було визначено, що середнє значення COF знаходиться в діапазоні між 0 і 60 с. Таким чином розраховували середній коефіцієнт тертя, а також стандартне відхилення 5 послідовних вимірювань. Мінімальне значення COF дорівнює 52 у випадку, коли дві поверхні не стикаються. Верхня межа COF відповідає випадку, коли два диска більше не знаходяться в русі один відносно іншого.

З огляду на те, що значення COF коливається від однієї серії до іншої, необхідно охарактеризувати продукти, що підлягають порівнянню, в одних і тих же серіях, використовуючи одні й ті ж диски і в довільному порядку. Шкалу порівняльних балів потім використовували для класифікації продуктів, протестованих в одній і тій же серії, від найбільш ефективних (бал 1) до найменш ефективних (бал 3) відповідно до критеріїв, представлених в таблиці 11а. Межі "COF_A" і "COF_B" визначаються COF двох комерційно доступних очних крапель, узятих для порівняння у кожній серії: краплі А (які складаються з 0,15 % НА і 0,25 % карбомеру) і краплі В (0,15 % НА). Відповідно за цієї шкалою бажано, щоб бал зменшення тертя дорівнював 1 або 2, чи краще, 1 для застосування як змащувальних крапель для змазування очної поверхні. Для продуктів з балом 3 змащувальна здатність не є задовільною, і відхилення при вимірюванні є значними

Таблиця 11а

Шкала оцінки змазування (зниження тертя)

Бал	Межі COF
1	$\leq 1,1 \times COF_A$
2	$> 1,1 \times COF_A$ і $\leq 1,1 \times COF_B$
3	$> 1,1 \times COF_B$

Методи вимірювання в'язкості як функції зсуву

Simmons et al. визначили, що швидкість зсуву при рухах відкритого ока становить близько 10 с⁻¹, а швидкість зсуву при тремтінні повік становить близько 10000 с⁻¹ (в: Clinical Ophthalmology 11, 1637 2017). Метод реометричних вимірювань вибирали залежно від діапазону швидкостей зсуву, що підлягають вивченню, і з урахуванням того, що продукти є рідкими розчинами з низькою в'язкістю:

- діапазон зсуву, який відповідає руху очей. В'язкість вимірювали в оберտальному режимі шляхом випробування плинності "flow sweep test" за допомогою реометра DHR-2 з регульованою напругою (TA Instruments), оснащеного пластиною Пельтьє і геометрією типу "конус" діаметром 60 мм і кутом усічення 2°. Продукт врівноважували протягом 1 хвилини до 37 °С, температуру контролювали за допомогою елемента Пельтьє. Для того, щоб уникнути випаровування система була оснащена пасткою для розчинника і металевою кришкою. Потім запускали випробування "flow sweep test" і в'язкість вимірювали як функцію швидкості зсуву, від 0,001 с⁻¹ до 100 с⁻¹. Показано значення в'язкості при 10 с⁻¹.

- діапазон зсуву, який відповідає тремтінню повік. В'язкість вимірювали в оберտальному режимі за допомогою випробування "flow sweep test" за допомогою реометра DHR-2 з регульованою напругою (TA Instruments), оснащеного геометрією типу "подвійний зазор Куетта (циліндричний)" і концентричним циліндром Пельтьє, і оснащеного пасткою для розчинника і металевою кришкою. Продукт врівноважують протягом 1 хвилини до 37 °С, а потім

застосовували змінну швидкість зсуву, яка змінюється від 0,001 с⁻¹ до 10000 с⁻¹. Значення в'язкості при 10000 с⁻¹ таким чином, потім порівнювали зі значенням при 10 с⁻¹.

Таблиця 11b

Характеристики композиції з низькою концентрацією карбоксиметил хітозану грибного походження і очних крапель на основі гіалуронової кислоти

продукт порівняння	Показник заломлення	В'язкість		Бал зниження тертя
		при 10 с ⁻¹ (МПа.с)	при 10000 с ⁻¹ (МПа.с)	
Фосфатний буфер з гліцерином	1,3348	немає даних	немає даних	не піддається вимірюванню
СС-21 0,7 %	1,3358	27	Нижче, ніж в'язкість при 10 с ⁻¹	1
СС-21 0,4 %	1,3353	10		1
НА-5	1,3343	6		2
НА-10	1,3386	3	Нижче, ніж в'язкість при 10 с ⁻¹	2
НА-11	1,3350	6		2
НА-12	1,3346	50		2

5 Результати підтверджують, що дві композиції грибного карбоксиметил хітозану СС-21 відповідають технічним характеристикам офтальмологічних крапель: вони мають низький показник заломлення, задовільний коефіцієнт тертя (бал 1, тобто такі ж ефективні, як і більшість змащувальних комерційно доступних крапель), в'язкість 10-30 мПа·с за умов руху очей і нижчу в'язкість за умов тремтіння повік. Без карбоксиметил хітозану фосфатний буфер, доповнений гліцерином, не відповідав технічним характеристикам офтальмологічних крапель. Нарешті, слід зазначити, що в'язкість може бути зменшена шляхом зниження концентрації карбоксиметил хітозану (наприклад, від 0,7 % до 0,4 %) без несприятливої зміни здатності зменшувати тертя (бал 1).

15 **ФОРМУЛА ВИНАХОДУ**

1. Карбоксіалкілхітозан грибного походження, який має глюкозамінові ланки, N-ацетилглюкозамінові ланки і глюкозамінові ланки, заміщені карбоксіалкільною групою, причому вказаний карбоксіалкілхітозан має ступінь заміщення карбоксіалкільною групою, який становить понад 50 %, що виражається у вигляді кількості молів замісника відносно кількості молів всіх ланок, причому карбоксіалкілхітозан має ступінь ацетилювання в діапазоні від 30 до 80 %, виражений в кількості молів N-ацетилглюкозамінових ланок відносно кількості молів усіх ланок.
2. Карбоксіалкілхітозан за п. 1, який **відрізняється** тим, що ступінь заміщення карбоксіалкільною групою становить понад 70 %, що виражається у вигляді кількості молів замісника відносно кількості молів всіх ланок.
3. Карбоксіалкілхітозан за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що ступінь заміщення карбоксіалкільною групою становить менше 200 %, що виражається у вигляді кількості молів замісника відносно кількості молів всіх ланок.
4. Карбоксіалкілхітозан за одним з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що хітозан отриманий з міцелію грибів, відділу *Ascomycetes* і, зокрема з *Aspergillus niger* та/або *Basidiomycetes*, зокрема, *Lentinula edodes* (шіїтаке) та/або *Agaricus bisporus* (шампінйони), причому переважно хітозан отриманий з *Agaricus bisporus*.
5. Карбоксіалкілхітозан за одним з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що карбоксіалкілхітозан має ступінь ацетилювання в діапазоні від 40 до 80 %, що виражається як кількість молів N-ацетилглюкозамінових ланок відносно кількості молів всіх ланок.
6. Карбоксіалкілхітозан за одним з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що є реацетилуваним.
7. Карбоксіалкілхітозан за одним з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що є стерилізованим.
8. Карбоксіалкілхітозанова композиція, яка містить щонайменше один карбоксіалкілхітозан за одним з пп. 1-7.
9. Карбоксіалкілхітозанова композиція для ін'єкцій, яка містить щонайменше один карбоксіалкілхітозан за одним з пп. 1-7.
10. Карбоксіалкілхітозанова фармацевтична композиція, яка містить щонайменше один карбоксіалкілхітозан за одним з пп. 1-7.

11. Композиція за п. 9 або 10, яка застосовується як фармацевтична композиція, яка є ін'єктованою, імплантованою або придатною для інстиляції, або яка знаходиться в медичному пристрої, який є ін'єктованим, імплантованим або придатним для інстиляції.
- 5 12. Композиція за п. 11, яка **відрізняється** тим, що її застосовують в способі терапевтичного лікування, який передбачає інстиляцію або ін'єкцію зазначеної композиції підшкірним, внутрішньошкірним, очним, внутрішньоочним або внутрішньосуглобовим шляхом, наприклад, для відновлення або заповнення щонайменше однієї тканини тіла, що вимагає відновлення або заповнення.
- 10 13. Композиція за п. 12, яка **відрізняється** тим, що цей спосіб призначений для лікування або заповнення щонайменше однієї тканини тіла, де тканина тіла вибрана з тканин, які належать до голосових зв'язок, м'язів, зв'язок, сухожилів, хрящів, статевих органів, кісток, суглобів, очей, шкіри, епідермісу, мовно-артикуляційних суглобів або будь-якої з їх комбінацій, більш переважно належать до артикуляційних суглобів.
- 15 14. Композиція за п. 12 або 13, яка **відрізняється** тим, що її застосовують в способі лікування остеоартриту або відновлення дефекту хряща, наприклад, шляхом ін'єкції в синовіальну рідину або після змішування з кров'ю і імплантації в хрящ.
- 15 15. Медичний пристрій, що містить карбоксіалкілхітозан, наприклад медичний імплантат, який **відрізняється** тим, що містить композицію за одним з пп. 8-14.
- 20 16. Спосіб отримання композиції, яка містить карбоксіалкілхітозан, визначений за одним з пп. 8-14, причому зазначений спосіб включає:
- розчинення карбоксіалкілхітозану, за будь-яким з пп. 1-9, у водному розчині;
 - доведення рН до бажаного рН;
 - додавання інших допоміжних речовин;
 - регулювання кінцевої осмоляльності композиції.
- 25