

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 787**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2018** **PCT/EP2018/080767**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2019** **WO19105719**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2018** **E 18799773 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020** **EP 3510051**

54 Título: **Carboxialquil quitosano**

30 Prioridad:

28.11.2017 FR 1761323

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.09.2020

73 Titular/es:

**KIOMED PHARMA (100.0%)
Rue Haute Claire 4
4040 Herstal, BE**

72 Inventor/es:

**CHAUSSON, MICKAEL;
DOUETTE, PIERRE;
GAUTIER, SANDRINE, EMILIA;
VAESEN, PHILIPPE;
CHOUMANE, HOUTAI y
ROCASALBAS, GUILLERMO**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 781 787 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Carboxialquil quitosano

- 5 La presente invención se refiere a un carboxialquil quitosano, a las composiciones que lo comprenden, a su procedimiento de fabricación, y a sus diferentes aplicaciones, en particular, en el campo terapéutico, reumatológico, oftalmológico, de la medicina estética, cirugía plástica, cirugía interna, dermatológico, o cosmético.

Estado de la técnica

- 10 Se conocen derivados de quitosano, en especial, en las solicitudes de Kiomed Pharma publicadas bajo los números WO 2016/016463 y WO 2016/016464, y las patentes correspondientes. Esas solicitudes se concentran en las propiedades físicas, químicas, o fisicoquímicas de los derivados de quitosano. Esas composiciones también requieren ser mejoradas, en particular, en el marco de un tratamiento terapéutico, de manera de brindar a los pacientes que
15 pueden ser llevados a utilizar dichas composiciones un beneficio terapéutico optimizado, y en particular, a aumentar la relación riesgo/beneficio.

- Se puede obtener un quitosano soluble por aumento del grado de acetilación (GA) por reacetilación del quitosano fúngico. En efecto, se pueden obtener formulaciones solubles de pH fisiológico por reacetilación del quitosano fúngico, pero se constata:

- una degradación muy rápida in vivo o condiciones similares,
- aparece una reacción inmunitaria del sujeto en el cual se inyecta o se implanta dicho quitosano, por ejemplo, por inyección o implantación intraarticular,
25 - el quitosano no es adecuado para las aplicaciones citadas,

y por lo tanto, no permite una utilización terapéutica suficientemente satisfactoria del quitosano, en particular, por inyección o implantación intraarticular

- 30 Existen diferentes publicaciones que se refieren a la carboxialquilación del quitosano, y en particular, la carboximetilación del quitosano, esencialmente, con el objeto de solubilizar el quitosano. En teoría, un quitosano presenta una fórmula sin unidad N-acetil-glucosamina, pero en la práctica, el quitosano resulta de la quitina, que comprende unidades N-acetil-glucosamina, y el quitosano presenta un cierto grado de acetilación (GA), que es la proporción de unidades N-acetil-glucosamina del quitosano. El GA del quitosano es, por lo general, bajo. Por encima
35 de él, sobre todo por encima del 30%, se trata por lo general de quitosano reacetilado.

Por otra parte, la solicitud de patente china CN1431229A se refiere a derivados de quitosano carboximetilado por su capacidad hidratante, pero se limita a esta característica.

- 40 El arte anterior también ha previsto la carboximetilación de la quitina de origen animal, en particular, de crustáceo. Pero la quitina de origen crustáceo es difícil de sustituir, en especial, hay que congelarla y alcalinizarla para poder sustituirla (véase, por ejemplo, la solicitud de patente china CN106474569). El procedimiento es difícil de implementar, y en particular, de industrializar. Por otra parte, dicho procedimiento de sustitución a partir de quitina de origen crustáceo es costoso en lo que hace a la energía, poco producible, y con riesgo de degradar el polímero y de hidrolizar
45 los grupos acetilo de las unidades N-acetil-glucosamina de manera significativa y difícilmente controlable.

Objetos de la invención

- La invención tiene por objeto resolver el problema técnico que consiste en brindar un derivado de quitosano adecuado para ser utilizado en un ser humano o animal, en particular, en el campo terapéutico, reumatológico, oftalmológico, de la medicina estética, cirugía plástica, cirugía interna, dermatológico, o cosmético.

- Más particularmente, la invención tiene por objeto resolver el problema técnico que consiste en brindar un derivado de quitosano adecuado para ser utilizado en un ser humano o animal en el campo terapéutico, en particular, utilizable a título de suplemento viscoso, y en particular, poder ser inyectado en, o mezclado con un fluido sinovial.

- La invención tiene, principalmente, por objeto resolver el problema técnico que consiste en brindar un fluido sinovial reconstruido, es decir, una composición que restaura las propiedades de una articulación como, por ejemplo, aportándole una capacidad de lubricar las superficies de cartílago.

- La invención también tiene por objeto resolver el problema técnico que consiste en brindar un derivado de quitosano, o una composición que lo comprende, y presenta buenas propiedades y compatibilidad mezclado con un fluido sinovial, y en particular, un fluido sinovial de un ser humano o animal, por ejemplo, para tratar una patología articular o generación del fluido sinovial del caso.

- La invención también tiene por objeto resolver el problema técnico que consiste en brindar un derivado de quitosano,

o una composición que lo comprende, y limita la reacción inmunitaria de un sujeto, y en particular, de un ser humano o animal, que recibe una administración, por ejemplo por inyección, de un derivado de quitosano o una composición que lo comprende.

- 5 La invención también tiene por objeto resolver el problema técnico que consiste en brindar un derivado de quitosano, o una composición que lo comprende, y presenta características poco variables de acuerdo con el pH..

La invención también tiene por objeto resolver el problema técnico que consiste en brindar un derivado de quitosano, o una composición que lo comprende, y presenta una osmolalidad y un pH adaptado a su utilización en contacto con un tejido de un ser humano o animal, y aceptable en términos de duración de vida in situ, reacción inmunológica y/o reacción a un cuerpo extraño y propiedades biomecánicas, de acuerdo con la indicación terapéutica prevista, en particular, en el contexto de la medicina regenerativa.

Descripción de la invención

15 Se ha descubierto, de manera sorprendente, que un derivado de quitosano de acuerdo con la presente invención, permite resolver al menos uno, y de preferencia todos los problemas técnicos descriptos anteriormente.

20 En particular, se ha descubierto un derivado de quitosano de origen fúngico, permitía resolver al menos uno, y de preferencia todos los problemas técnicos descriptos anteriormente. En especial, un derivado de quitosano de origen fúngico permite limitar la respuesta inmunitaria de un sujeto al que se le ha administrado, típicamente, por inyección o implantación, el derivado de quitosano o una composición que lo comprende.

25 La presente invención se refiere, de acuerdo con un primer aspecto, a un carboxialquil quitosano de origen fúngico que presenta unidades glucosamina, unidades N-acetil-glucosamina, y unidades glucosamina sustituidas por un grupo carboxialquilo, y dicho carboxialquil quitosano presenta, de preferencia, un grado de sustitución por un grupo carboxialquilo superior al 20%, expresado en número de mol del sustituyente, con respecto al número de mol de unidades totales.

30 También se habla de derivado de quitosano o de quitosano sustituido.

En particular, también se ha descubierto que un derivado de quitosano que presenta una carga electrostática (caracterizada por su potencial zeta) en un rango de Ph que oscila alrededor del pH del medio en el que se ha administrado, y en especial de pH igual a 7,5, inferior a un cierto valor que permitía resolver al menos uno, y de preferencia todos los problemas técnicos descriptos o sugeridos. En especial, dicho derivado de quitosano permite limitar la respuesta inmunitaria de un sujeto al que se le ha administrado, típicamente, por inyección o implantación, el derivado de quitosano o una composición que lo comprende.

40 La presente invención se refiere a un segundo aspecto a un derivado de quitosano que presenta unidades glucosamina, unidades N-acetil-glucosamina, y unidades glucosamina sustituidas por un grupo carboxialquilo, y dicho carboxialquil quitosano que presenta un potencial zeta, medido pH 7,5, inferior o igual a -10 mV, y de preferencia, inferior o igual a -15 mV.

45 Se da como referencia al quitosano, por ejemplo, el número CAS 9012-76-4.

Ventajosamente, el quitosano utilizado para la invención es de origen fúngico, y preferentemente, resultante del micelio de un hongo de tipo Ascomiceto, y, en particular, de *Aspergillus niger*, y/o de un hongo Basidiomiceto, y en particular, *Lentinula edodes* (shiitake) y/o *Agaricus bisporus* (champiñón de París). De preferencia, el quitosano resulta de *Agaricus bisporus*. El quitosano es, de preferencia, muy puro, es decir, que contiene pocas impurezas resultantes de su origen fúngico o del procedimiento de fabricación, y de una calidad microbiológica compatible con su utilización como implantación o composición farmacéutica. Un método de preparación del quitosano es el descrito en las patentes WO 03/068824 (EP 1483299; US 7.556.946).

55 Por lo general, la quitina se pone en suspensión acuosa en presencia de hidróxido de sodio, luego, el medio se lleva a alta temperatura durante un lapso variable de acuerdo con la masa molecular deseada. El quitosano luego se purifica por solubilización en medio ácido y se precipita en medio alcalino, se lo lava y seca.

De preferencia, el quitosano es de grado suficientemente puro para una utilización farmacéutica.

60 Ventajosamente, el quitosano se purifica, y luego, de preferencia, se seca. Después de la purificación, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa de secado del carboxialquil quitosano, luego eventualmente, de trituración de éste para obtener un polvo. Se puede secar el carboxialquil quitosano, por ejemplo, por evaporación del agua, por ejemplo, por un procedimiento de aerosol-secado (atomización) de lecho fluidizado, o por secado por calor al vacío o a presión atmosférica, o también por liofilización.

65

El carboxialquil quitosano puede solubilizarse en una solución acuosa, y por ejemplo, en agua de calidad farmacéutica aceptable para una inyección o implantación en un cuerpo, y en particular, un cuerpo humano.

El quitosano preparado puede prepararse a partir de diferentes masas moleculares, y por lo general, que van de 10.000 a 500.000.

De acuerdo con una variante, la masa molecular promedio está comprendida entre 20.000 y 60.000.

De acuerdo con una variante, la masa molecular promedio está comprendida entre 60.000 y 100.000.

De acuerdo con una variante, la masa molecular promedio está comprendida entre 100.000 y 120.000.

De acuerdo con una variante, la masa molecular promedio está comprendida entre 120.000 y 150.000.

De acuerdo con una variante, la masa molecular promedio está comprendida entre 150.000 y 220.000.

De acuerdo con una variante, la masa molecular promedio está comprendida entre 220.000 y 300.000.

De acuerdo con una variante, la masa molecular promedio está comprendida entre 300.000 y 500.000.

Cuando el quitosano es reticulado, la masa molecular del polímero reticulado puede ser mucho más elevado.

Es posible hidrolizar el quitosano con el fin de disminuir su masa molecular.

De preferencia, aquí la masa molecular promedio es la masa molecular promedio en viscosidad (Mv) calculada a partir de la viscosidad intrínseca de acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink. La viscosidad intrínseca se mide por viscosimetría capilar, con un viscosímetro capilar de tipo Ubbelohde, de acuerdo con el método de la monografía 2.2.9 de la Pharmacopée Européenne (Farmacopea Europea). Se mide el tiempo de deslizamiento de la solución a través de un tubo capilar adaptado (Lauda, por ejemplo, el tubo capilar Ubbelohde 510 01 de diámetro 0,53 mm) con la ayuda de un viscosímetro automático I-Visc (Lauda), primero con la concentración inicial de quitosano, luego por medio de varias diluciones, por ejemplo, de acuerdo con las recomendaciones de la monografía 2.2.9. Se deduce de ello la viscosidad intrínseca reducida para cada una de las concentraciones. Se lleva la viscosidad reducida en función de la temperatura, y se extrapola el valor a la concentración 0, para reducirle la viscosidad intrínseca. Por ejemplo, se debe llevar la viscosidad reducida (η_{red} en mL/g) de las diluciones i en función de la concentración C de las diluciones i (g/mL) de acuerdo con la fórmula 5.

Fórmula 2 $[\eta_{red}] = (t_1 - t_0) - (1 - C)$

Para calcular la masa viscosimétrica promedio, se aplica la ecuación de Mark-Houwink con las constantes k y α recomendadas por Rinaudo et al. (en: Int J Biol Macromol, 15, 281, 1993), de acuerdo con el grado de acetilación (GA) del quitosano, de acuerdo con una de las tres fórmulas siguientes.

Fórmula 3 $Mv = ([\eta]/0,082)^{(1/0,76)}$, para un GA del 2%;

Fórmula 4 $Mv = ([\eta]/0,076)^{(1/0,76)}$, para un GA del 10% (por ejemplo, del 11,5%);

Fórmula 5 $Mv = ([\eta]/0,074)^{(1/0,76)}$, para un GA del 20% (por ejemplo, del 21%).

Para los valores de GA DA intermedios, se realiza una interpolación lineal para calcular la masa viscosimétrica promedio (Mv).

De preferencia, el quitosano utilizado es de una masa molecular promedio comprendida entre 120.000 y 150.000 o también comprendida entre 150.000 y 220.000 o también comprendida entre 220.000 y 300.000, o también por encima de 300.000, y por lo general, hasta 500.000.

También se puede medir la masa molecular final del carboxialquil quitosano: se puede medir, por ejemplo, su viscosidad intrínseca por viscosidad capilar, deducir de ello su masa molecular promedio (Mw) (determinando previamente los parámetros K y α del carboxialquil quitosano), o por un método por cromatografía, por ejemplo, por permeación de gel.

Típicamente, en el carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención las unidades glucosamina son unidades D-glucosamina (unidades D-glucosamina, unidades N-acetil-D-glucosamina, y al menos, una de las unidades D-glucosamina y unidades N-acetil-D-glucosamina está sustituida).

De acuerdo con una variante, un quitosano sustituido presenta una sustitución de las unidades D-glucosamina únicamente.

De acuerdo con otra variante, un quitosano sustituido presenta una sustitución de las unidades D-glucosamina, y N-acetil-D-glucosamina simultáneamente, y en el cual el grupo carboxialquilo está enlazado de manera covalente, de acuerdo con una variante de los grupos amina del quitosano únicamente, o de acuerdo con otra variante de los grupos amina, e hidroxilo del quitosano, simultáneamente.

Por lo general, la sustitución es solamente parcial, y todas las unidades no están necesariamente sustituidas.

De acuerdo con un modo de realización, el grado de sustitución de las unidades D-glucosamina expresado en número de moles de unidades D-glucosamina, con respecto al número de moles de unidades totales (unidades D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, sustituidas o no) del quitosano sustituido, va del 30% al 250%.

De acuerdo con un modo de realización, el grado de sustitución por un grupo carboxialquilo superior al 50% expresado en número de mol del sustituyente, con respecto al número de mol de unidades totales.

De acuerdo con un modo de realización, el grado de sustitución de las unidades D-glucosamina expresado en número de moles de unidades D-glucosamina, con respecto al número de moles de unidades totales (unidades D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, sustituidas o no) del quitosano sustituido, va del 50% al 200%, e incluso, preferentemente superior al 70%.

De acuerdo con un modo de realización, el grado de sustitución por un grupo carboxialquilo inferior al 80% expresado en número de mol del sustituyente, con respecto al número de mol de unidades totales.

Típicamente, la sustitución se realiza por enlace covalente.

De acuerdo con una variante, el carboxialquil quitosano es un N,O-carboxialquil quitosano. La proporción de unidades sustituidas por un grupo carboxialquilo en posición O (ya sea O3, ya sea O6 de las unidades glucosamina y/o N-acetil-glucosamina) y/o en posición N (de las unidades glucosaminas) varía. El grado de sustitución puede, por lo tanto, ser superior al 100%.

Ventajosamente, el grado de sustitución (GS) y el grado de acetilación (GA) del carboxialquil quitosano se miden por RMN del carbono 13 en fase sólida, con la ayuda de un espectrómetro Bruker (Avance III HD 400MHz), equipado con una sonda PH MAS VTN 400SB BL4 N-P/H. Por ejemplo, el espectro se registra a temperatura ambiente, con un tiempo de relajación comprendido entre 1 y 8 segundos, un número de escaneos comprendido entre 64 y 512. Las áreas de las señales de los carbonos de determinan después de la deconvolución. Los carbonos considerados son los siguientes: «CH3 acetilo» (carbono del metilo del grupo acetilo de las unidades N-acetil-glucosamina, sustituidas o no), «C1» (carbono en posición 1 de las unidades glucosamina y N-acetil-glucosamina) y «C=O» (carbono del carbonilo del sustituyente carboximetilo y carbono del carbonilo C=O del grupo acetilo de las unidades N-acetil-glucosamina, sustituidas o no). Para determinar el GS de un carboxialquil quitosano dado, es necesario también registrar el espectro RMN del carbono 13 del quitosano precursor de dicho carboxialquil quitosano. A partir del espectro del quitosano precursor, se calcula que la «relación CSU», es decir, la relación entre el área de la señal del grupo «CH3 acetilo» (carbono del metilo del grupo acetilo de las unidades N-acetil-glucosamina) y el área de la señal del «C=O» (carbono carbonilo del grupo acetilo de las unidades N-acetil-D-glucosamina). El GA del carboxialquil quitosano se calcula de acuerdo con la Fórmula 1, y del GS de acuerdo con la Fórmula 2, donde I representa el área de la señal del carbono considerado.

Fórmula 1:

$$DA = \frac{I_{CH3\text{ acetilo}}}{I_{C_1}}$$

Fórmula 2:

$$DS = \frac{I_{C=O} - I_{CH3} / \text{Relación CSU}}{I_{C_1}}$$

Se puede determinar el GA y el GS con la ayuda de otros métodos conocidos para los carboxialquilos de quitosanos, por ejemplo, por RMN del protón en medio acoso, con la ayuda de un espectrómetro de resonancia magnética, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito por Liu et al. (en: Carb Polym 137, 600, 2016), por ejemplo, con una hidrólisis previa del carboxialquil quitosano, agregándole una solución concentrada de ácido clorhídrico deuterada antes del análisis.

Si otro método RMN es más ventajoso para estimar el grado de sustitución de forma leve, es conveniente utilizar dicho método. Los métodos anteriores deben ser adaptados por el hombre de oficio en lo concerniente a la preparación de la muestra, y las señales por integrar, en especial, en función de la resolución, de la robustez y de la posición de los protones de las señales por utilizar para el cálculo del grado de sustitución.

El grado de carboxialquilación del quitosano puede variar, ventajosamente, del 20 al 250%, de preferencia, del 50 al

200%, y por ejemplo, del 70 al 170%, expresado en número de moles de carboxialquilo con respecto al número de moles de unidades totales.

5 De acuerdo con una variante, el grado de carboxialquilación del quitosano puede variar, ventajosamente, del 40 al 130%, y por ejemplo, del 70 al 130%, expresado en número de moles de carboxialquilo con respecto al número de moles de unidades totales.

10 El grado de sustitución del quitosano está relacionado, típicamente, con la relación de masa de los reactivos, con respecto al quitosano al inicio de la reacción. Como agentes carboxialquilantes, se pueden citar los cloruros de ácido (o sus sales, por ejemplo, monocloraacetato de sodio), como por ejemplo, aquellos que llevan uno o varios grupos carboximetilo, carboxietilo, carboxipropilo, carboxibutilo, etc.

15 De acuerdo con una variante, la presente invención se refiere a un carboxialquil quitosano donde la parte alquilo del carboxialquilo están en C1-C5, lineal o ramificada

De acuerdo con una variante, la presente invención se refiere a un carboximetilo de quitosano.
De acuerdo con esta variante, el quitosano sustituido es un quitosano N-carboxialquilado.
De acuerdo con esta variante, el quitosano sustituido es un quitosano O-carboxialquilado.
De acuerdo con esta variante, el quitosano sustituido es un quitosano N-carboxialquilado y O-carboxialquilado.

20 Ventajosamente, el potencial zeta, medido a pH 7,5 es inferior o igual a -18 mV.

Ventajosamente, el carboxialquil quitosano presenta un potencial zeta, medido a pH 7,5, inferior o igual a -22 mV, y de preferencia, inferior o igual a -24 mV.

25 De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta, preferentemente, una masa molecular promedio de 150.000 a 220.000, y un grado de sustitución que va del 50 al 200%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

30 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular promedio de 120.000 a 150.000, y un grado de sustitución que va del 70 al 200%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

35 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta, preferentemente, una masa molecular promedio de 220.000 a 300.000, y un grado de sustitución que va del 70 al 200%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

40 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular promedio de 300.000 a 500.000, y un grado de sustitución que va del 50 al 200%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

45 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular promedio de 300.000 a 500.000, y un grado de sustitución que va del 50 al 200%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular promedio de 300.000 a 500.000, y un grado de sustitución que va del 70 al 200%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

50 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular promedio de 120.000 a 150.000 y un grado de sustitución que va del 20 al 50%, y la masa molecular se expresa, preferentemente, antes de la sustitución.

55 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular promedio de 300.000 a 500.000, y un grado de sustitución que va del 20 al 50%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

60 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta una masa molecular promedio de 300.000 a 500.000, y un grado de sustitución que va del 20 al 50%, la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta un grado de sustitución que va del 20 al 80%, y de preferencia, del 40 al 60%, y un grado de acetilación del 20 al 80%, y de preferencia del 30 al 75%.

65 De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta un grado de sustitución que va del 50 al

200%, y de preferencia, del 70 al 200%, y un grado de acetilación del 20 al 80%, y de preferencia del 30 al 75%.

De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta un grado de sustitución que va del 50 al 200%, y de preferencia, del 70 al 200%, y un grado de acetilación del 20 al 50%, y de preferencia del 20 al 40%.

5 De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta un grado de sustitución que va del 50 al 200%, y de preferencia, del 70 al 200%, y un grado de acetilación del 50 al 75%.

10 De acuerdo con otra variante específica, el quitosano sustituido presenta un grado de sustitución que va del 90 al 200%, y de preferencia del 90 al 150%, y un grado de acetilación del 20 al 80%, y la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta un grado de sustitución que va del 90 al 200%, y de preferencia, del 90 al 150%, y un grado de acetilación del 20 al 50%, y de preferencia del 20 al 40%.

15 De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta un grado de sustitución que va del 90 al 200%, y de preferencia, del 90 al 150%, y un grado de acetilación del 50 al 75%.

20 De acuerdo con una variante específica, el quitosano sustituido presenta, de preferencia, una masa molecular promedio de 220.000 a 300.000, un grado de sustitución que va del 90 al 200%, y de preferencia del 90 al 150%, y un grado de acetilación del 50 al 75%, y la masa molecular está preferentemente expresada antes de la sustitución.

25 De acuerdo con una variante, el carboxialquil quitosano es reticulado De esta forma, varias cadenas de quitosano pueden ser reticuladas, por ejemplo, por reacción con un agente reticulante, como por ejemplo los agentes reticulantes utilizados para la reticulación de los polisacáridos como, por ejemplo: genipina, butil biglicidil éter, glutaraldehído, epiclorhidrina, 1-bromo-3,4-epoxibutano, 1-bromo-4,5-epoxipentano, 1-cloro-2,3-epitio- propano, 1-bromo-2,3-epitiopropano, 1-bromo-3,4-epitio-butano, 1-bromo-4,5-epitiopentano, 2,3-dibromopropanol, 2,4-dibromobutanol, 2,5-dibromopentanol, 2,3-dibromopro- panetioli, 2,4-dibromobutanetioli, y 2,5-dibromopentano-tioli epiclorohidrina, 2,3-dibromopropanol, 1-cloro-2,3-epitiopropano, dimetilaminopropilcarbodiimida, dextran oxidado, ácido gálico, galato de epigallocatequina, curcumina, ácido tánico, o también compuestos diisocianato, tal como el diisocianato de hexametileno o el diisocianato de tolueno.

Con un carboxialquil quitosano reticulado la masa molecular puede ser muy elevada.

35 Al sustituir el quitosano, ha sido posible preparar una solución de un carboxialquil quitosano soluble en una solución acuosa cuyo pH varía en un gran rango, mientras que el quitosano no sustituido sólo es soluble a un pH por debajo de 5,5 a 6,5. El carboxialquil quitosano presenta también una capacidad de ser solubilizado a diferentes pH, gracias a la presencia de grupos carboxialquilo que modifican su perfil de solubilidad, y en particular, al pH fisiológico o al pH de los fluidos fisiológicos modificados por una patología, por ejemplo, una patología inflamatoria. Es sabido que el pH de los fluidos fisiológicos, tal como el líquido sinovial de una articulación, el humor acuoso, el humor vítreo, las lágrimas, pueden variar de manera significativa entre individuos, en virtud, de diferentes factores como la edad, la patología, etc. Por lo tanto, es ventajoso que el carboxialquil quitosano pueda permanecer soluble en un gran rango de pH, por ejemplo, de 6,0 a 8,5, o incluso de 5,0 a 8,5, o también de 4,5 a 8,5.

45 De acuerdo con un modo de realización, la formulación de quitosano sustituido presenta una osmolalidad de 100 a 700 mosm/kg, de preferencia, de 200 a 500 mosm/kg.

Ventajosamente, la osmolalidad de la formulación de quitosano sustituido está comprendida entre 250 y 400 mosm/kg, y de preferencia, de 275 a 325 mosm/kg.

50 De acuerdo con una variante, la formulación de quitosano sustituido presenta una osmolalidad compatible con una articulación.

De acuerdo con una variante, la formulación de quitosano sustituido presenta una osmolalidad compatible con una superficie ocular o intraocular.

55 Es preferible que la osmolalidad de la formulación de quitosano sustituido esté comprendida entre 250 y 400 mosm/kg, y más específicamente, entre 275 a 380 mosm/kg.

60 Se entiende por «soluble en agua» que el carboxialquil quitosano no presenta turbiedad visible al ojo desnudo cuando está en solución acuosa. Más específicamente, se puede confirmar la solubilidad, es decir, la ausencia de turbiedad, de una solución de carboxialquil quitosano en una concentración, por ejemplo, del 1% (m/m) en agua o un tampón, por ejemplo, un tampón fosfato por una densidad óptica inferior a 0,5, y de preferencia, inferior a 0,2 medida por espectrometría UV-visible a la longitud de onda de 500 nm con referencia a una cuba de referencia que sólo comprende el solvente acuoso utilizado para la muestra medida, pero en ausencia de quitosano sustituido. Otro método consiste en una inspección visual de acuerdo con la monografía 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne.

Cuando el quitosano no está suficientemente sustituido, la composición no es soluble en un rango de pH satisfactorio, por ejemplo, que va de pH 6,0 a pH 8,5, a temperatura ambiente.

El grado de acetilación (GA) del quitosano está determinado como, por ejemplo, se describe en las solicitudes de patente WO 2017009335 y WO 2017009346 por titulado potenciométrico. Alternativamente, el GA puede medirse por otros métodos conocidos para quitosano, como RMN del protón, RMN del carbono 13 en fase sólida, espectrometría infrarroja.

Ventajosamente, el carboxialquil quitosano presenta un grado de acetilación comprendido entre el 5 y el 80% expresado en número de mol de unidades N-acetil-glucosamina, con respecto al número de mol de unidades totales. El grado de acetilación se expresa en número de unidades de N-acetil-D-glucosamina, con respecto al número de unidades totales de N-acetil-Dglucosamina y D-glucosamina presentes.

Ventajosamente, el carboxialquil quitosano presenta un grado de acetilación comprendido entre el 40 y el 80% expresado en número de mol de unidades N-acetil-glucosamina, con respecto al número de mol de unidades totales.

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 5 al 20%.

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 15 al 25%

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 20 al 45%.

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 20 al 30%.

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 25 al 40%..

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 40 al 50%.

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 50 al 60%.

De acuerdo con una variante, el grado de acetilación va del 60 al 75%.

El grado de acetilación está determinado por RMN del carbono 13 o por RMN del protón, de acuerdo con el mismo método que para la determinación del GS. El carboxialquil quitosano presenta, ventajosamente, un grado de acetilación controlado. Se entiende por los términos «quitosano que tiene un grado de acetilación controlado» un producto cuyo grado de acetilación, es decir, la proporción de las unidades N-acetil-glucosamina, puede ajustarse de manera controlada, en especial, por una reacción de acetilación.

De acuerdo con una variante, una composición de acuerdo con la invención puede presentarse en forma de una solución, y puede no estar gelificada por variación de la temperatura (no termogelificable).

De acuerdo con una variante, las características reológicas de una solución de acuerdo con la invención pueden evolucionar con la temperatura, pero sin pasar por una transición sol-gel. Las características reológicas de una solución de acuerdo con la invención pueden constatare, principalmente, por el módulo de elasticidad (G') y/o el módulo de pérdida (G''), o también, el módulo complejo G^* .

De acuerdo con una variante, las características reológicas de una solución de acuerdo con la invención son sensiblemente constantes, cualquiera sea la temperatura.

De acuerdo con una variante, una composición de acuerdo con la invención puede presentarse en forma de una solución, y ser termogelificable.

De acuerdo con una variante, una composición de acuerdo con la invención puede presentarse en forma de un gel, y no ser termogelificable.

Por lo tanto, la invención permite de acuerdo con una variante, preparar una composición termogelificable fluida a una temperatura inferior a la de utilización, típicamente, a una temperatura inferior a la temperatura fisiológica, por ejemplo, de 37 °C, pro que esté en forma de gel a la temperatura de utilización, típicamente, a la temperatura fisiológica, por ejemplo, de 37 °C, a pH neutro (pH 7) o a pH fisiológico, y por ejemplo, de 7 a 8,5 con una osmolalidad conveniente para la utilización prevista. Por ejemplo, se trata de una osmolalidad fisiológica.

De acuerdo con una variante, la composición termogelificable presenta una transición sol-gel termorreversible.

Ventajosamente, la presente invención permite brindar una composición de baja concentración de quitosano sustituido.

Ventajosamente, la concentración de carboxialquil quitosano es inferior al 10%, por ejemplo, inferior o igual al 5% de masa, con respecto a la masa total de la composición (m/m).

5 De acuerdo con una variante, la concentración de carboxialquil quitosano es inferior al 4%, por ejemplo, inferior o igual al 3% o incluso, por ejemplo, inferior o igual al 2% de masa, con respecto a la masa total de la composición (m/m).

10 Ventajosamente, la composición de la invención puede comprender también otro biopolímero distinto del quitosano sustituido. De acuerdo con una variante ventajosa, el biopolímero es un polisacárido, oxidado o no, reticulado por enlaces covalentes o no, por ejemplo, ácido hialurónico o hialuronato de sodio.

10 El ácido hialurónico puede presentar una masa molecular de hasta 5 millones Da. La masa molecular del ácido hialurónico puede reflejarse por su viscosidad intrínseca, o también por su viscosidad. El ácido hialurónico puede presentar una densidad que va de 1 a 4 m³/kg, y por ejemplo, caracterizarse como bajo (por ejemplo aproximadamente 1 a 2 m³/kg) o alto (por ejemplo, aproximadamente 2 a 4 m³/kg) de masa molecular.

15 Ventajosamente, la concentración de ácido hialurónico es inferior al 4%, por ejemplo, inferior o igual al 3% o incluso, por ejemplo, inferior o igual al 2% de masa, con respecto a la masa total de la composición (m/m).

20 De acuerdo con una variante específica, la concentración de ácido hialurónico es inferior al 1,9% (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final. Ventajosamente, la concentración de ácido hialurónico está comprendida entre el 0,5 y el 1,5% (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final. De acuerdo con una variante particular, la concentración de ácido hialurónico es de aproximadamente el 0,9%, el 1,0%, el 1,1%, el 1,2%, el 1,3%, el 1,5% (m/m), expresada en masa con respecto a la masa de la composición final.

25 La relación entre el quitosano y el ácido hialurónico puede variar, por ejemplo, del 5 al 95%, por ejemplo, del 10 al 90%, e incluso, por ejemplo, del 30 al 70% de quitosano sustituido, y del 5 al 95%, por ejemplo, del 10 al 90%, e incluso, por ejemplo, del 30 al 70% respectivamente, de ácido hialurónico; los porcentajes se expresan con respecto: a la masa seca de quitosano sustituido / masa seca de ácido hialurónico. De acuerdo con una variante, esa relación entre el quitosano y el ácido hialurónico es de 1/1 (o sea 50% de quitosano y 50% de ácido hialurónico). De acuerdo con otra variante, esa relación entre el quitosano y el ácido hialurónico es de 1,5/0,5 (o sea 75% de quitosano y 25% de ácido hialurónico).

30 De acuerdo con una variante, el ácido hialurónico puede estar reticulado entre diferentes cadenas de ácido hialurónico.

35 La presente invención se refiere también a un procedimiento de preparación de carboxialquil quitosano.

De acuerdo con una variante, el procedimiento de preparación del carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención comprende la preparación de un quitosano de origen fúngico, la reacetilación del quitosano, y la carboxialquilación del quitosano reacetilado. De esta forma, la invención se refiere a un quitosano reacetilado o a un carboxialquil quitosano reacetilado.

40 De acuerdo con un modo de realización, se puede así disolver quitosano en un medio acuoso, de preferencia, ligeramente acidificado (pH 6, por ejemplo). Se puede agregar anhídrido acético a la solución de quitosano en una o varias veces. Se agrega luego un agente básico como, por ejemplo, soda y/o urea. Se agrega luego un agente alquilante como, por ejemplo, monocloroacetato de sodio (es decir, sal de sodio de ácido cloroacético) o ácido cloroacético. Luego, el quitosano sustituido se purifica, se recupera, y se seca.

50 De acuerdo con una variante, el procedimiento de preparación del carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención comprende la preparación de un quitosano, la carboxialquilación del quitosano, luego la reacetilación del quitosano carboxialquilado. Ventajosamente, dicho método permite un control preciso del grado de acetilación del carboxialquil quitosano final, y en particular, obtener un grado de acetilación elevado, por ejemplo, por encima del 40%. De esta forma, la invención se refiere a un quitosano reacetilado, luego carboxialquilado, o a un carboxialquil quitosano reacetilado.

55 De acuerdo con una variante, el procedimiento de preparación del carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención, comprende la preparación de una quitina de origen fúngico, la carboxialquilación de la quitina, y eventualmente, la reacetilación de la quitina carboxialquilada para obtener el carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención.

60 De acuerdo con una variante, el procedimiento de preparación del quitosano carboxialquilado de acuerdo con la invención, comprende la preparación de una quitina de origen fúngico, una desacetilación de la quitina, la carboxialquilación de la quitina, y eventualmente, la reacetilación de la quitina carboxialquilada para obtener el carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención.

65 De acuerdo con un modo de realización, la tapa de carboxialquilación comprende una etapa de alcalinización de los grupos hidroxilo del quitosano, para favorecer un grado de sustitución elevado, y por ejemplo, a la vez en posición N- de las unidades de glucosamina y O- de las unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina.

De acuerdo con un modo de realización, el procedimiento de la invención comprende una etapa de alcalinización que comprende la dispersión de quitosano en una solución de alcohol como, por ejemplo, isopropanol en presencia de un agente básico como, por ejemplo, soda, y la agitación durante un lapso de al menos una hora a una temperatura mínima de -32°C y de preferencia, máxima de 15°C. A esta suspensión se agrega luego un agente alquilante como, por ejemplo, ácido monocloroacético. Luego, el quitosano sustituido se purifica, se recupera, y luego se seca.

De acuerdo con una variante, el procedimiento de preparación del quitosano carboxialquilado de acuerdo con la invención comprende la preparación de un quitosano, la carboxialquilación del quitosano, luego la reacetilación del quitosano carboxialquilado.

De acuerdo con un modo de realización, la etapa de carboxialquilación no comprende etapa de alcalinización.

La etapa de reacetilación de un carboxialquil quitosano puede comprender, por ejemplo, uno o varias adiciones de anhídrido acético a la solución de carboxialquil quitosano.

Las etapas finales de purificación, filtración y secado para recoger el carboxialquil quitosano purificado se realizan de acuerdo con métodos conocidos con miras a obtener un carboxialquil quitosano de acuerdo con el grado de pureza deseado, que depende en general de la aplicación prevista como, por ejemplo, por ciclos de precipitación y solubilización o por diálisis.

De acuerdo con una variante, la relación anhídrido acético/quitosano (volumen/masa) varía entre 0,1 y 10, y de preferencia, de 0,1 a 2 durante la etapa de reacetilación.

De acuerdo con una variante, la relación de masa agente de carboxialquilante/quitosano (volumen/masa) varía entre 0,1 y 10, y de preferencia, de 2,5 y 25 durante la etapa de carboxialquilación.

De acuerdo con una variante, se utiliza una relación de masa de los reactivos que aportan al quitosano el grupo carboxialquilo (es decir, el agente alquilante) con respecto al agente básico necesario y suficiente para obtener el grado de sustitución deseado. Por ejemplo, la relación de masa del agente alquilante, con respecto al agente básico se superior a 1 e inferior a 10, y de preferencia, va de 1,4 a 3,3.

La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de una composición de acuerdo con la invención. De acuerdo con una variante, el procedimiento comprende típicamente:

- la disolución de un quitosano sustituido en una solución acuosa, de preferencia en una solución tamponada a pH de preferencia, comprendida entre 6,2 y 8,5, y de preferencia entre 6,5 y 7,5;

- el ajuste eventual del pH a un pH deseado, en general al pH fisiológico para la aplicación prevista, por ejemplo, por adición de un agente tamponante, de un ácido o de una base;

- la adición eventual de otros excipientes como, por ejemplo, un azúcar reductor, por ejemplo, sorbitol o manitol;

- el ajuste eventual de la osmolalidad final de la composición.

Ventajosamente, el procedimiento comprende también una etapa ulterior de llenado de un dispositivo de inyección o de implantación como, por ejemplo, una jeringa, con el carboxialquil quitosano o la composición que lo comprende. Ventajosamente, el dispositivo de inyección como, por ejemplo, una jeringa puede luego someterse a una esterilización al vapor. Ese dispositivo, por ejemplo una jeringa, puede luego envasarse, de preferencia de manera estéril. También puede ser una bolsa, una ampolla o un frasco que permite la instilación de la solución de carboxialquil quitosano.

Es ventajoso utilizar un quitosano que presente un grado de pureza suficiente para la aplicación prevista.

Ventajosamente, el procedimiento comprende también una etapa ulterior de llenado de un dispositivo de inyección, de implantación o de instilación como, por ejemplo, una jeringa, con la composición de acuerdo con la invención. Ventajosamente, el dispositivo de inyección como, por ejemplo, una jeringa puede luego someterse a una esterilización al vapor. Ese dispositivo, por ejemplo una jeringa, puede luego envasarse, de preferencia de manera estéril.

De acuerdo con una variante, el carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención está esterilizado por filtración y/o por esterilización al vapor, antes del llenado de un dispositivo de inyección, de implantación o de instilación como, por ejemplo, una jeringa o un frasco.

Es ventajoso utilizar un quitosano que presente un grado de pureza suficiente para la aplicación prevista.

La presente invención se refiere más particularmente a una composición inyectable que comprende el carboxialquil

quitosano de acuerdo con la invención

La invención se refiere también una composición farmacéutica que comprende, al menos, un carboxialquil quitosano definido de acuerdo con la invención.

5 De acuerdo con una variante, el carboxialquil quitosano o la composición se utiliza como composición farmacéutica inyectable, para implantación o apta para la instilación, o dispositivo médico inyectable o para implantación o apto para la instilación.

10 La invención cubre también un carboxialquil quitosano o una composición que lo comprende, en forma seca, en especial en una forma liofilizada. En especial, se puede (re)dispersar, y de preferencia, solubilizar el producto liofilizado antes del uso.

15 La presente invención se refiere, más particularmente, a una composición de acuerdo con la invención para una utilización para un tratamiento terapéutico que comprende, por ejemplo, la inyección por vía subcutánea, intradérmica, ocular, intraocular, o intraarticular, de dicha composición, por ejemplo, para la reparación, la regeneración o el relleno de, al menos, un tejido corporal que requiera una reparación o un relleno.

20 Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta una inmunocontabilidad de las formulaciones de carboxialquil quitosano de origen fúngico con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección expresada en número de glóbulos blancos inferior a 10×10^6 células/mL, y de preferencia inferior a 8×10^6 células/mL.

25 Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta una inmunocontabilidad de las formulaciones de carboxialquil quitosano de origen fúngico con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección expresada en concentración de IL1-beta inferior a 10×10^{-9} g/ mL, y de preferencia inferior a 5×10^{-9} g/ mL.

30 Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta una inmunocontabilidad de las formulaciones de carboxialquil quitosano de origen fúngico con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección expresada en concentración de KC/CXCL1 inferior a 50×10^{-9} g/ mL, y de preferencia inferior a 30×10^{-9} g/ mL.

35 Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta una inmunocontabilidad de las formulaciones de carboxialquil quitosano de origen fúngico con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección expresada en TNF-alfa inferior a 150×10^{-9} g/ mL, y de preferencia inferior a 125×10^{-9} g/ mL.

40 Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta una inmunocontabilidad de las formulaciones de carboxialquil quitosano de origen fúngico con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección expresada en concentración de KC/CXCL 1 inferior a 50×10^{-9} g/ mL, y de preferencia inferior a 30×10^{-9} g/ mL.

45 Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta una inmunocontabilidad de las formulaciones de carboxialquil quitosano de origen fúngico con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección que satisface simultáneamente los límites máximos expresados anteriormente en número de glóbulos blancos y de las concentraciones en IL1-beta, KC/CXCL1 y TNF-alfa.

50 Las mediciones del número de glóbulos blancos y de las concentraciones en IL1-beta, KC/CXCL1 y TNF-alfa, se realizan de acuerdo con los protocolos de los ejemplos.

55 Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta un tiempo de semivida en presencia de una mezcla de enzimas lisozima y hialuronidasa a 37°C superior a 500 minutos, de acuerdo con el protocolo de medición del ejemplo 6.

Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización, en particular en aplicación intraarticular, un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención presenta un coeficiente de fricción (COF0) inferior a 5, y de preferencia, inferior o igual a 4 (de acuerdo con el protocolo del ejemplo 9).

60 La presente invención se refiere, en especial, a una composición de acuerdo con la invención para una utilización para un tratamiento de reumatología, oftalmológico, de medicina estética, de cirugía plástica, de cirugía interna, por ejemplo, para la prevención de las adherencias tisulares posquirúrgicas, dermatológico o cosmético.

65 De acuerdo con una variante, el tejido corporal se elige entre los tejidos que pertenecen a las cuerdas vocales, músculos, ligamentos, tendones, cartílagos, órganos sexuales, huesos, articulaciones, ojos, dermis, epidermis, una o

varias capas de la piel, mesodermis, o una cualquiera de sus combinaciones, y más particularmente, a los ojos, a la dermis y a las juntas articulares.

5 La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para una utilización para un tratamiento terapéutico de un síndrome de ojo seco, de una lesión de córnea, o de una inflamación articular. La presente invención se refiere además a la aplicación de una composición de acuerdo con la invención para instilación sobre la superficie ocular para prevenir o para luchar contra una lesión de córnea, o síndrome de ojo seco, en particular, con el objeto de lubricar o regenerar la superficie ocular.

10 Así, la invención se refiere también a una composición de gotas oftálmicas que comprende un carboxialquil quitosano definido de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con una variante, el sujeto está afectado por una patología inflamatoria (por ejemplo, osteoartritis).

15 La presente invención se refiere más particularmente a una composición de acuerdo con la invención para el tratamiento de una artrosis, de una artritis, o la reparación de un defecto de cartílago, por ejemplo, por inyección en la cavidad sinovial o por implantación al nivel del defecto de cartílago.

20 La presente invención se refiere, más particularmente, a un dispositivo médico, por ejemplo, implantación en medicina, caracterizado porque comprende o consiste en una composición de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una variante preferida, la invención se refiere por lo tanto a un dispositivo médico que comprende una cámara que contiene un carboxialquil quitosano en una forma seca, en especial, en una forma liofilizada, y eventualmente, una o varias otras cámaras que contienen uno o varios productos activos, aditivos o excipientes.

25 La composición de acuerdo con la presente invención también puede comprender uno o varios aditivos o excipientes que permiten modular sus propiedades.

30 La presente invención también se refiere a una composición de acuerdo con la invención para una utilización en un método de tratamiento terapéutico que comprende, por ejemplo, la instilación o la inyección por vía subcutánea, intradérmica, ocular, intraocular, o intraarticular, de dicha composición, por ejemplo, para la reparación o el relleno de, al menos, un tejido corporal que requiera una reparación o un relleno.

35 La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para su utilización en un método de tratamiento de una artrosis, o la reparación de un defecto de cartílago, por ejemplo, por inyección en el fluido sinovial o después de mezclar con la sangre, e implantación en el cartílago.

40 La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para una utilización en un método de tratamiento o de cuidado estético por relleno de la dermis («*dermal filling*»). En especial, se trata por ejemplo de inyectar una composición de acuerdo con la invención en forma subcutánea o intradérmica.

45 La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para una utilización en un método de tratamiento superficial de la piel por inyección múltiple por vía intradérmica. Dichas composiciones pueden ser utilizadas, típicamente, en dermatología, tales como tratamiento con fines estéticos. Dicho método tiene como objeto, por ejemplo, rellenar la piel para hacer que pierda un aspecto ajado (tratamiento de las arrugas y/o patas de gallo). Dicho tratamiento puede dirigirse a un sujeto que desea dar un aspecto más joven a su piel.

50 La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para una utilización en un método de tratamiento en el cual la composición es un agente de viscosuplementación. Se trata aquí, por ejemplo, de inyectar al nivel intraarticular la composición de la invención, en especial, para limitar los roces de las superficies de cartílago de la articulación.

55 La presente invención también se refiere a una composición de acuerdo con la invención para una utilización como vector celular, de uno o varios tipos celulares, y/o uno o varios agentes activos. Se puede tratar de agentes activos desde un punto de vista farmacéutico o biológico. La composición de la invención puede en efecto ser compatible con la presencia de células, de preferencia, de células vivas. Entre las células vivas de interés, se pueden citar, por ejemplo: condrocitos (cartilago articular), bñbrocondrocitos (menisco), fibroblastos de ligamento (ligamento), fibroblastos de piel (piel), tenocitos (tendones), miofibroblastos (músculo), las células cepas mesenquimales, los glóbulos rojos (sangre) y los queratinocitos (piel). La composición de la invención también puede dirigirse como vector terapéutico para la administración dirigida y/o la liberación controlada de, al menos, un agente terapéutico.

60 De acuerdo con una variante, se agrega sangre, o plasma, o un lisado plaquetario, o plasma rico en plaquetas, o cualquier fluido biológico con la composición de la invención, y permite, por ejemplo, aumentar los beneficios del producto.

65

De acuerdo con una variante, la composición de acuerdo con la invención se forma en forma sólida (por ejemplo, una película o una espuma porosa) que se solubiliza una vez implantada.

De acuerdo con una variante, la composición se formula en forma de una composición nebulizable (aerosol).

La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para una utilización en un método de tratamiento o de tratamiento estético de uno o varios tejidos u órganos afectados por una temperatura excesiva, como en el caso de una quemadura.

La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para una utilización en un método de tratamiento de reparación del cartílago (por ejemplo, por implantación en un defecto de cartílago con miras a promover su regeneración).

La presente invención se refiere también a una composición de acuerdo con la invención para una utilización en un método de tratamiento de prevención de las adherencias tisulares posteriores a una cirugía: el producto se aplica sobre los tejidos al final de la cirugía, por ejemplo, ginecológica, abdominal, etc.

La presente invención se refiere también a una composición a título de fluido sinovial artificial que comprende un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención.

La composición de acuerdo con la presente invención permite imitar un fluido sinovial sano o mejorar un fluido sinovial sano o defectuoso, buscando por ejemplo mejorar su capacidad lubricante para reducir las fricciones en la articulación, y/o sus propiedades de absorción de los golpes (identificable por el módulo de elasticidad G'), y que es al mismo tiempo fácilmente inyectable para llenar una jeringa, por ejemplo, o ser inyectada en el cuerpo humano o animal. Como indicación, el módulo elástico G' del líquido sinovial sano está comprendido entre 40 y 100 Pa, y su módulo de pérdida G'' está comprendido entre 1 y 10 Pa.

De acuerdo con una variante, el carboxialquil quitosano, o la composición que lo comprende, se inyecta en forma de solución. Ventajosamente, de acuerdo con esta variante, el carboxialquil quitosano o la composición que lo comprende es fácilmente inyectable a través de una aguja fina, por ejemplo, una aguja de diámetro 21 Gauge, a temperatura ambiente. Se entiende por inyección «fácil», de preferencia, que la fuerza que se debe ejercer sobre dicha jeringa es inferior a 50 Newton para hacer fluir una composición de acuerdo con la invención a través de una aguja de 21 Gauge, de preferencia, una fuerza inferior a 20 Newton.

La presente invención se refiere también a una composición a título de lágrimas artificiales que comprende un carboxialquil quitosano de acuerdo con la invención.

Por lo general, los rangos de valores de osmolalidad y de pH buscados en las aplicaciones biomédicas están cercanas a los siguientes rangos:

- Osmolalidad:

-Isoosmolar al plasma: 285 a 295 mosm/kg;

-Isoosmolar al líquido sinovial: 404 ± 57 mosm/kg, de acuerdo con «Clin. Orthop Relat Res, 235, 289-95, 1988» y «Biochem Biophys Res Comm, 422, 455-461, 2012»;

-De 285 a 350 mosm/kg.

- pH:

Por lo general, un pH fisiológico está por encima de 6,8, en particular, por encima de 7,0, y en particular, de 7,4 (como para el plasma o un líquido sinovial).

El pH del plasma es, por lo general, de 7,4. El pH del líquido sinovial es, por lo general de $7,768 \pm 0,044$ de acuerdo con «J Bone Joint Surg Br, 41-B(2), 388-400, 1959»; o de 7,3 de acuerdo con «Acta Orthop Scand 634-641, 1969», o también de acuerdo con «Clin Rheumatol 25, 886-888, 2006».

Se considera que el pH sinovial en los casos de osteoartritis o de artritis es más bajo que el del fluido sinovial sano.

Así, la presente invención se refiere a una mezcla de un fluido sinovial con una composición de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de acuerdo con una relación volúmica entre (i) el carboxialquil quitosano, o la composición que lo comprende, y (ii) el fluido sinovial que va de 20/80 a 80/20 (v/v), y por ejemplo, de 50/50 (v/v).

Ventajosamente, la composición de acuerdo con la presente invención es estéril. Muy ventajosamente, la composición de acuerdo con la presente invención se esteriliza por aumento de temperatura, de preferencia, por autoclave.

De acuerdo con una variante, las composiciones de la invención son transparentes o translúcidas.

Se entiende por «translúcida» que se puede distinguir un objeto cuando se coloca su composición entre el ojo del observador y el objeto. Se entiende por «transparente» que se pueden distinguir caracteres alfanuméricos cuando se coloca su composición entre el ojo del observador y los caracteres observados. Por lo general, se realiza esta evaluación con un espesor de composición de aproximadamente 1 cm. También se puede seguir el método de la monografía 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne para la inspección visual. También se puede medir la densidad óptica de la composición, por ejemplo, por espectrometría UV-visible a 500 nm y asegurar así que la densidad óptica es inferior a 0,5, de preferencia 0,2, con respecto a un solvente de referencia.

De acuerdo con una variante, las composiciones de la invención no lo son, o son poco opalescentes.

Se entiende por «opalescente» que la solución acarrea una difracción de la luz visible al ojo desnudo, por ejemplo, por inspección visual de acuerdo con un método tal como la monografía 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne, y por comparación con soluciones de referencia de niveles de opalescencia diferentes de la Pharmacopée Européenne. De acuerdo con una variante, la composición de la invención es incolora, es decir en particular, que un observador a ojo desnudo no atribuye un color específico a la composición. De acuerdo con una variante, la opalescencia es inferior al máximo tolerado para la aplicación prevista.

La invención se refiere, en particular, a artículos o a envases, de preferencia estériles, que comprenden uno o varios dispositivos de instilación o de inyección prellenados de una composición de acuerdo con la invención. Se trata típicamente de dispositivos que permiten instilar el producto en forma de gotas o de jeringas prellenadas.

La composición de la invención puede, ventajosamente, ser esterilizada. De esta forma, la invención se refiere a un carboxialquil quitosano esterilizado. Por lo tanto, el carboxialquil quitosano es así estéril, en especial, para aplicaciones que así lo requieren.

De acuerdo con una variante, la composición de la invención se esteriliza al vapor, por ejemplo, por una elevación de la temperatura a una temperatura superior a 100°C, y de preferencia superior a 120°C, por ejemplo, entre 121 y 138°C, en autoclave, durante un lapso suficiente para la esterilización, por ejemplo, en general de 15 a 20 minutos. De acuerdo con otra variante, la composición puede esterilizarse por filtración con la ayuda de filtros previstos a dicho efecto, por ejemplo, filtros de porosidad inferior o igual a 0,2 µm.

Ventajosamente, de acuerdo con un modo de realización preferido, la pérdida de viscosidad intrínseca del carboxialquil quitosano durante una esterilización al vapor es inferior al 40%.

La invención cubre también una composición de la invención en forma seca, en especial en una forma liofilizada.

También se puede (re) dispersar esta composición liofilizada antes de usar.

La presente invención cubre también un método de tratamiento terapéutico que comprende la inyección de una composición de acuerdo con la invención.

La presente invención cubre también la utilización de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de una composición farmacéutica, en particular, para un tratamiento terapéutico, por ejemplo, tal como se ha definido más específicamente por medio de la invención.

La presente invención cubre también un método de tratamiento estético, en otros términos, n terapéutico, que comprende la inyección de una composición de acuerdo con la invención. Se trata, por ejemplo, del relleno de arrugas o del relleno de una o varias zonas de tejido visibles dañadas, por ejemplo, luego de un accidente o de una intervención quirúrgica, con fines estéticos.

Un tejido es un conjunto de células semejantes y de mismo origen, reagrupadas en un conjunto funcional, es decir, que concurren en una misma función. Entre los tejidos se pueden citar: el tejido epitelial, el tejido conjuntivo, el tejido muscular, y el tejido nervioso.

Por «composición de acuerdo con la invención» o términos equivalentes, se entiende una composición definida tal como en la presente invención, y que incluye de acuerdo con una cualquiera de las variantes, modos de realización particulares o específicos, independientemente o de acuerdo con una cualquiera de sus combinaciones que incluye, de acuerdo con las características preferidas.

Otros objetos, características y ventajas de la invención surgirán claramente ante el hombre del arte, luego de la lectura

de la descripción explicativa que se refiere a los ejemplos que se dan posteriormente a título de ilustración, y que no pretenden en lo más mínimo limitar el alcance de la invención.

Los ejemplos forman parte integrante de la presente invención y cualquier nueva característica que aparezca con respecto a cualquier estado de la técnica anterior a partir de la descripción tomada en su conjunto, que incluye los ejemplos, forma parte integrante de la invención en su función y en su generalidad.

Por lo tanto, cada ejemplo tiene un alcance general.

Por otra parte, en los ejemplos, todos los porcentajes se dan en masa, salvo indicación en contrario, y la temperatura está expresada en grados Celsius, salvo indicación en contrario, y la presión es la presión atmosférica, salvo indicación en contrario.

Ejemplos

Los quitosanos precursores de los quitosanos sustituidos de acuerdo con la invención presentan una masa molecular promedio en viscosidad (determinada por viscosimetría capilar) y un grado de acetilación (GA, proporción de unidad N-acetil-D-glucosamina, determinada por titulado potenciométrico) incluido en los rangos de la Tabla 1. La masa molecular de un quitosano también puede definirse por la viscosidad dinámica de una solución de concentración 1% (m/m) en quitosano en el ácido acético de concentración 1% (v/v), medida por viscosimetría de móvil giratorio, por ejemplo, un viscosímetro Brookfield, tal como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los quitosanos precursores

Rango	Rango de masa molecular promedio (viscosimetría capilar)	Rango de viscosidad al 1% (mPa.s)	Rango de GA (mol%)
« Ultra low »	Aprox. 20 000 – 60 000	5 - 20	5 – 20%
« Low »	Aprox. 60 000 – 120 000	20 - 50	15 – 25%
« Medium »	Aprox. 120 000 – 150 000	50 - 80	20 – 30%
« High »	Aprox. 150 000 – 220 000	80 - 120	25 – 40%
« Ultra-high »	Aprox. 220 000 a 300 000	120 - 200	25 – 40%
« 400k »	Aprox. 300,000 – 500 000	200 - 600	35 – 50%

Los siguientes métodos se utilizan en la presente invención, salvo mención en contrario:

Método de medición del potencial zeta

La formulación por analizar se diluye en un tampón fosfato para obtener una concentración final de polímero del 0,05%, luego, ligeramente agitada hasta la homogeneización. La solución se separa luego en diferentes fracciones, y el pH de cada una de las fracciones se ajusta al valor deseado, entre pH 4 y 8, ya sea por adición de hidróxido de sodio al 0,1N, ya sea por adición de ácido clorhídrico al 0,1N. El potencial zeta de cada fracción se mide con la ayuda de un aparato «Nano-Z» (gama Zeta-Sizer, Malvern Instruments).

Método de medición del rango de solubilidad de los polímeros de quitosano

El rango de solubilidad se establece preparando una solución del polímero por testear en una concentración del 1%, y un pH de 9, fraccionándolo en varias fracciones cuyo pH se ajusta a diferentes pH en un rango de 9 a 1. Se verifica para cada fracción que el polímero es soluble, es decir, que no forma turbiedad, de acuerdo con el método de inspección visual de la monografía 2.9.20 de la Pharmacopée Européenne. Se registra el rango de pH sobre el cual el polímero es soluble o insoluble.

Modelo de bolsa de aire subcutánea en el ratón

Se ha utilizado un modelo de bolsa de aire en el ratón para evaluar la reacción de cuerpo extraño, y la inmunocompatibilidad de diferentes polímeros derivados de quitosano de origen fúngico. En ese modelo, se produce una cavidad de bolsa de aire por inyecciones subcutáneas repetidas de aire estéril en el lomo de un ratón. La bolsa generada por el inflado del aire imita la cavidad sinovial, brindando un medio localizado en el cual es posible estudiar la estimulación de una respuesta inflamatoria en el líquido extraído de la bola de aire, y los tejidos circundantes, tal como ha sido descrito por Segwick et al. (en: J Pathol 141, 483, 1983) et Sin et al. (en: Ann Rheum Dis 45, 873,

1986). La cavidad de la bolsa de aire permite inyectar hasta 1 mL de producto en un animal de aproximadamente 30 g. De acuerdo con el protocolo descrito por Dawson et al. (en: Int J Tiss Reac 8, 171, 1991), la bolsa de aire se establece en ratones CD-1 Swiss albinos machos no consanguíneos (ejemplos de patógenos, peso corporal al llegar 25 a 35 g) en los plazos Día 0 y Día 4 por inyección repetida de 5 mL, luego 3 mL de aire estéril. El día 7 se efectúa una inyección subcutánea única de 1 mL de producto directamente en la cavidad de la bolsa de aire. Las inyecciones de 1 mL de salina y de una solución al 1% de carragenano sirven respectivamente de control negativo y positivo. Los animales son seguidos regularmente en las horas siguientes a la inyección para detectar eventuales signos clínicos de toxicidad sistémica o local, y se realiza un control de peso corporal y de temperatura al momento de la invención, y del sacrificio. Los animales se sacrifican después de un período de contacto con el producto de 24 horas (3 animales por producto). Las evaluaciones inmunológicas del fluido de lavado recuperado de la bolsa incluyen el análisis citológico (conteo y distribución en glóbulos blancos y rojos) y la cuantificación de los principales mediadores inflamatorios (IL-1-beta, TNF-alfa y KC/CXCL1) por medio de kits 'ELISA' (AbCam), realizados de acuerdo con las instrucciones. Se realiza el análisis macroscópico e histopatológico por coloración hematoxilina/eosina de los tejidos cutáneos circundantes. Se presta una atención particular a la localización del producto en los tejidos circundantes, así como a su resorción en el fluido.

Modelo de evaluación de la tolerancia local intraarticular en un modelo ovino

De acuerdo con la literatura y las recomendaciones de la OARSI, la oveja se reconoce como un modelo bien caracterizado para evaluar los efectos de la inyección intraarticular de tratamiento innovadores (Little et al. en: Osteoarthritis Cartilage 18, S80, 2010; Edouard et al. en: Phys Ther Sport 14, 116, 2013 ; McCoy et al. en: Vet Pathol 52, 803, 2015). El modelo oveja permite inyectar por vía intraarticular un volumen de formulación que simula la utilización clínica de la viscosuplementación en el hombre (Fraser et al. en: Semin Arthritis Rheum 22, 9, 1993). Las mediciones de tolerabilidad local comprenden los signos clínicos de inflamación sinovial (efusión, cojera, bienestar) por medio de escalas clínicas semicuantitativas validadas, descritas por Shafford et al. (en: Vet Anaesth Analg 31, 20, 2004) y Kaler et al. (en: Vet J 180, 189, 2009), así como la evaluación citológica del fluido sinovial. En ciertos casos, esos análisis pueden completarse por medio de la evaluación anatómica e histológica del miembro inyectado. Se inyecta un volumen de 2 mL de formulación en la articulación (babilla) de corderos sanos (edad de 2 a 6 años; peso 60 a 80 kg). Después de la inyección, se consignan diariamente los signos clínicos durante un período de 15 días, de acuerdo con una escala semicuantitativa de 0 a 4 para la efusión (por palpación de la babilla) y la cojera. Se informa el número de signos encontrados para cada uno de las puntuaciones en toda la duración de la observación. Con el objeto de evaluar los efectos de una inyección repetida de una misma formulación, se realiza una segunda inyección después de 1 mes en la articulación de los mismos animales, y se siguen los animales de acuerdo con el mismo protocolo que para la primera inyección. Además, se realiza una punción del líquido sinovial al día 15, y los parámetros macroscópicos (color, viscosidad), citológicos (conteo y distribución de glóbulos blancos y rojos), así como la cantidad de proteínas séricas totales se determinan de acuerdo con los métodos clásicos. El líquido sinovial se considera normal si su aspecto es claro, viscoso y ligeramente amarillento, y si el análisis citológico indica que el número de glóbulos blancos es inferior a 1×10^5 células/mL, y la concentración de proteínas totales es de aproximadamente 25 mg/mL.

Ejemplo 1 - N-succinil-quitosanos

Se han preparado y caracterizado N-succinil quitosanos de diferente masa molecular y estructura molecular (grado de acetilación (GA), y grado de sustitución por el grupo succinil (GS)) de acuerdo con el procedimiento general descrito en la solicitud WO 2016/016463 o WO 2016/016464 (patente EP 3016663). Se ha realizado una primera etapa de acetilación por adición de anhídrido acético con el objeto de aumentar el grado de acetilación, salvo para el polímero CSS-1 (Tabla 1a).

Se han preparado las formulaciones con esos N-succinil quitosanos (CSS) en una concentración del 2% a pH y osmolaridad fisiológicas, y se han colocado en una jeringa de vidrio. Las jeringas se han esterilizado por autoclave con un ciclo estándar (15 minutos a 121°C). Se verifica que las formulaciones no presentan insolubles o turbiedad en un amplio rango de pH alrededor del pH fisiológico (pH 6,5 a 7,5), por inspección visual de acuerdo con el método EP.2.9.20. Se controla que el nivel de endotoxinas bacterianas de las formulaciones sea inferior a 20 EU/mL de acuerdo con el método de la monografía 2.6.14(D) de la Pharmacopée Européenne y que la carga microbiológica sea inferior a 100 cfu/g de acuerdo con el método de 2.6.12 de la Pharmacopée Européenne, antes de realizar una evaluación de su inmunocompatibilidad *in vivo*.

Tabla 1a – Características de los N-succinil quitosanos			
No	Rango de masa molecular*	GA** (mol %)	GS** (mol %)
CSS-1	Medium	12	62

CSS-6	Low	50	34
CSS-8	Low	49	32
CSS-10	High	61	37

*masa molecular del quitosano precursor, de acuerdo con la Tabla 1; **GA y GS medidos por RMN del protón de acuerdo con el método descrito en la patente EP 3016663.

- 5 La inmunocompatibilidad de las formulaciones de CSS se evalúa con la ayuda del modelo de la bolsa de aire subcutánea en el ratón (Tabla 1b). La reacción observada se compara con la observada después de la inyección de una solución salina (control negativo), de un control positivo muy reactivo (solución al 1% de carragenano) y de un producto comercial a base de Hylan GF-20, un ácido hialurónico parcialmente reticulado (Synvisc®, Sanofi).

Tabla 1b – Inmunocompatibilidad de las formulaciones de N-succinil quitosano con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección*

No	Nro. de glóbulos blancos (10 ⁶ cél/mL)	Conc. en IL1-beta (10 ⁻⁹ g/mL)**	Conc. en KC/CXCL1 (10 ⁻⁹ g/mL)	Conc. en TNF-alfa (10 ⁻⁹ g/mL)**
CSS-1	1,5	/	/	/
CSS-6	0,7	< 3	137	< 125
CSS-8	3,7	/	/	/
CSS-10	2,1	< 3	>700	< 125
Controles				
Control negativo (salino)	0,2	17	23	272
Control positivo (1% carragenano)	33,2	28	700	767
Synvisc® (Hylan GF-20)	0,7	4	46	< 125

*Valor promedio en 3 animales; **límite de detección: 3,10⁻⁹ g/mL para IL1-beta y 125,10⁻⁹ g/mL para TNF-alfa.

- 10 En general, surge que esas formulaciones a base de CSS acarrearán una reacción inmunológica de tipo reacción de cuerpo extraño, puesto en evidencia por un número de glóbulos blancos en el infiltrado celular más elevado que para el control negativo, sin embargo, menos elevado que para el control positivo (1% carragenano). La reacción inducida por las formulaciones se caracteriza por una activación de los neutrófilos, puesta en evidencia por una concentración de marcador KC/CXCL1 más elevada que las del control negativo y del producto Synvisc®. Los niveles de marcadores IL1-beta y TNF-alfa, por su parte, son bajos.

- 15 El hecho de modificar el GA y/o el GS de los CSS o bien de modificar su masa molecular no acarrearán diferencia de reacción inmunológica. Si bien las formulaciones de CSS no causan efecto deletéreo en los tejidos a nivel local, es necesario poder obtener un nivel de inmunocompatibilidad más elevado en el caso de aplicaciones terapéuticas que tienen como fin tejidos fragilizados por la patología del caso, como por ejemplo, el síndrome de ojo seco, las lesiones de córnea o las inflamaciones de las patologías articulares.

25 Ejemplo 2 - Carboximetilo de quitosanos de origen animal

Dos carboximetilos de quitosano de origen animal, de uso farmacéutico o médico e implantables o inyectables se han podido obtener (CC-1 y CC-2 de la Tabla 2a).

Se han testeado otros dos carboximetilos de quitosanos:

- Un CC obtenido por carboximetilación de quitina de origen animal (CC-3),
- Un CC obtenido por carboximetilación de quitosano de origen animal, y el quitosano se ha preparado por desacetilación de una quitina de origen animal (CC-4).

35 Los carboximetilos de quitosanos (CC) han sido caracterizados por RMN del carbono 13 para confirmar su identidad y determinar los valores de GA (grado de acetilación) y GS (grado de sustitución por el grupo carboximetilo), con un margen de error estimado de aproximadamente $\pm 10\%$ (Tabla 2a). Se caracteriza la carga electrostática del polímero

mediendo su potencial zeta en una concentración del 0,05% (m/m) sobre un rango de pH que va de pH 8 a pH 4, y se informa el valor del potencial zeta a pH 7,5 (Tabla 2a). Se observa que el valor del potencial a pH 7,5 guarda relativamente buena correlación con el valor del GS determinados por RMN del carbono 13. Por ejemplo, el polímero CC-3 está más sustituido que el polímero CC-4 por el grupo aniónico carboximetilo (en forma carboxilato a pH 7,5) y presenta un GA similar, por consiguiente, su carga global negativa es más importante (-28mV vs. -11mV a pH 7,5).

Se observa que los polímeros CC-1 y CC-2 no son muy solubles en el rango de pH fisiológico (pH 6,5 a 7,5). No se puede evaluar su inmunocompatibilidad con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón. Los polímeros CC-3 y CC-4 son muy solubles en todo el rango de pH amplio, 1 a 9.

Tabla 2a – Características de los carboximetilos de quitosanos de origen animal y sus formulaciones

No (concentración)	GA* (mol %)	GS* (mol %)	Rango de solubilidad del polímero	Esterilizabilidad de la formulación por autoclave	Potencial zeta a pH 7,5 (mV)
CC-1 (2%)	8	124	Insoluble entre pH 3,6 y 8,1	/	/
CC-2 (2%)	/	/	Insoluble a pH inferior a 6,6	/	/
CC-3 (2%)	71	149	Soluble a cualquier pH	No	-28
CC-4 (1,5%)	69	24	Soluble a cualquier pH	Sí	-11

*los valores de GA y GS de los polímeros carboximetilo de quitosano se determinan por RMN del carbono 13 en fase sólida.

Las formulaciones de CC-3 (2%) y CC-4 (1,5%) se han preparado entonces de acuerdo con el mismo método que el del Ejemplo 1, colocados en jeringa de vidrio, luego esterilizados por autoclave de acuerdo con un ciclo estándar de 15 minutos a 121°C (Tabla 2a). Se constata que la formulación al 2% del polímero CC-3 no resiste la esterilización final por autoclave, como se evidencia por una pérdida de su viscosidad intrínseca de aproximadamente el 60% lo que traduce la hidrólisis del polímero, así como por una pérdida del 98% de su módulo de conservación G'. Como alternativa a la esterilización final por autoclave, la formulación de CC-3 es filtra entonces antes de su colocada en jeringa con el fin de producir una formulación que puede ser evaluada con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón.

Las formulaciones de CC-3 (2%, filtrada) y CC-4 (1,5%, esterilizada por autoclave) se controlan para verificar que el nivel de endotoxinas y la carga microbiológicas son inferiores a 20 EU/mL y 100 cfu/g, luego, se evalúa su inmunocompatibilidad con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón (Tabla 2b).

Tabla 2b – Inmunocompatibilidad de las formulaciones de carboximetilos de quitosano de origen animal con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección*

No	Nro. de glóbulos blancos (x10 ⁶ céls/mL)	Conc. en IL1-beta (x10 ⁻⁹ g/mL)**	Conc. en KC/CXCL1 (x10 ⁻⁹ g/mL)	Conc. en TNF-alfa (x10 ⁻⁹ g/mL)**
CC-3	0,7	< 3	49	< 125
CC-4	1,0	5	115	184
Controles				
Control negativo (salino)	0,2	17	23	272
Control positivo (1% carragenano)	33,2	28	> 700	767
Synvisc® (Hylan GF20)	0,7	4	46	< 125

*Valor promedio en 3 sujetos; **límite de detección: 3,10⁻⁹ g/mL para IL1-beta y 125,10⁻⁹ g/mL para TNF-alfa.

La formulación CC-4 acarrea una reacción no despreciable, caracterizada por una concentración elevada de los dos marcadores KC/CXCL1 (activación de los neutrófilos) y TNF-alfa en el infiltrado, simultáneamente. El marcador TNF-alfa no ha sido detectado después de la inyección de las formulaciones de CSS del Ejemplo 2 ni de Synvisc® (Hylan GF-20). Así, no se desea inducir una reacción caracterizada por el marcador TNF-alfa. Como se desea disponer de

una buena inmunocompatibilidad en el caso de las aplicaciones terapéuticas para las cuales la formulación estaría en contacto con tejidos fragilizados por la patología como, por ejemplo, el síndrome de ojo seco, las lesiones de córnea o las inflamaciones articulares, y evitar la activación de los neutrófilos y de TNF-alfa, el carboximetilo de quitosano de origen animal CC-4 no es apropiado.

La formulación de CC-3 induce una reacción más leve, caracterizada por un número de glóbulos blancos y una concentración de marcador KC/CXCL1 moderada, similares a los niveles del producto comparativo Synvisc®, pero más elevada que la del control negativo (salino). La formulación de CC-3 parece, por lo tanto, menos inmunorreactiva que las formulaciones de CSS y que la formulación de CC-4. Sin embargo, la formulación de CC-3 presenta la desventaja de una concentración de marcador KC/CXCL1 que podría mostrarse no apta para un método de tratamiento terapéutico donde el sujeto requiere una muy buena inmunocompatibilidad y sufrir una fuerte hidrólisis de las cadenas macromoleculares bajo efecto del calor, lo que hace imposible su esterilización por autoclave durante una etapa final al final del procedimiento de producción, es decir, después del llenado de la jeringa con la formulación.

Ejemplo 3 - Carboximetilo de quitosanos de origen fúngico

Con el objeto de obtener los carboximetilos de quitosanos de las Tablas 3a y 3b partiendo de quitina o de quitosano de origen fúngico, se emplean las siguientes reacciones:

- Reacetilación, luego, carboximetilación de quitosano fúngico de masa molecular «ultra-high» (CC-5 de la Tabla 3a);
- Carboximetilación, luego, reacetilación de quitosano fúngico de masa molecular «ultra-high» (CC-5 a CC-9);
- Carboximetilación de quitosano fúngico de masa molecular «ultra-high» (CC-11);
- Carboximetilación de quitina fúngica (CC-10).

A título de ejemplo, la preparación del CC-8 se desarrolla de la manera siguiente:

10 g de quitosano «ultra-high» se dispersan en 220 mL de isopropanol y 68 mL de hidróxido de sodio al 40% (m/v). Se disuelven 45 g del agente alquilante ácido monocloroacético (MCA) en 45 mL de isopropanol, y se agregan a la suspensión de quitosano. Se continúa la reacción durante 16 horas a 25°C. El polímero se recupera por precipitación en etanol, luego, se purifica por ciclos de solubilización/precipitación en etanol. El precipitado se seca en una estufa ventilada. Una masa de 15 g del precipitado se dispersa en agua, y 3,75 mL de anhídrido acético se le agregan. Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, el pH del medio se ajusta en 6, y se agregan 3,75 mL de anhídrido ácido (AC). Después de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente, el medio se neutraliza y se precipita en etanol. El precipitado así obtenido se vuelve a poner en solución, luego nuevamente se lo precipita. El precipitado final de carboximetilo de quitosano (CC-8) se seca en una estufa ventilada.

Los parámetros de síntesis aplicados para preparar los otros CC se describen en las Tablas 3a y 3b.

Tabla 3a – Parámetros de síntesis de carboxialquilos de quitosanos partiendo de quitosano fúngico						
Parámetros	CC-5	CC-6	CC-7	CC-8	CC-9	CC-11
Etapas de carboximetilación						
Agente alquilante (MCA o SCA)*	SCA	MCA	MCA	MCA	MCA	MCA
NaOH/quitosano (m/m)	11	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Urea	Sí	No	No	No	No	No
Agente alquilante/quitosano (m/m)	11,2	9	9	4,5	4,5	6,8
Isopropanol/agente alquilante (% m/m)	0%	80%	80%	80%	80%	80%
Temperatura (°C)	15°C	15°C	25°C	25°C	35°C	60°C
Duración (horas)	22 h	16 h	16 h	16 h	4 h	1 h
Etapas de reacetilación						
Antes o después carboximetilación	Antes	Después	Después	Después	Después	/
DC/quitosano (v/m)						/
-Primera adición	0,3	0,25	0,25	0,25	0,25	
-Segunda adición	0,3	0,25	0,25	0,25	0,25	
Duración y temperatura de reacción	0,5 hora a 25°C	0,5 hora a 25°C	0,5 hora a 25°C	0,5 hora a 25°C	0,5 hora a 25°C	/

*MCA: ácido monocloroacético; SCA: sal de sodio del ácido monocloroacético

Tabla 3b – Parámetros de síntesis de carboxialquil quitosano partiendo de quitina fúngica	
Parámetros	CC-10
Quitina/soda/agua (m/m)	1/11,4/28,5
Duración y temperatura de contacto con la soda	16 horas a 4°C
Agente alquilante (MCA o SCA)	MCA
Quitina/isopropanol/agente alquilante (m/m/m)	1/28,5/4,5
Duración y temperatura de reacción	16 horas a 25°C

- 5 Los carboximetilos de quitosanos (CC) de origen fúngico obtenidos se caracterizan por RMN del carbono 13 para confirmar su estructura y determinar el valor del GA y del GS (Tabla 3c). Teniendo en cuenta la desviación estándar inherente al método de espectrometría RMN del carbono 13 (aproximadamente $\pm 10\%$), se observa que el valor del potencial zeta a pH 7,5 guarda correlación con la estructura molecular, en particular al GS.

Tabla 3c – Características de los carboximetilos de quitosanos de origen fúngico, y de sus formulaciones					
No (concentración)	GA* %	GS* %	Solubilidad del polímero	Esterilizable por autoclave**	Potencial zeta a pH y 7,5 (mV)
CC-5 (1,5%)	67	18	Soluble a cualquier pH	Sí	-12,5
CC-6 (2%)	71	42	Soluble a cualquier pH	Sí	-15
CC-7 (2%)	57	70	Soluble a cualquier pH	Sí	-18
CC-8 (2%)	50	80	Soluble a cualquier pH	Sí	-26
CC-9 (2%)	41	101	Soluble a pH > 3,1	Sí	-22
CC-10 (2%)	46	167	Soluble a cualquier pH	Sí	-24,5
CC-11 (2%)	23	130	Soluble a pH > 3,5	Sí	-26

- 10 *GA y GS determinados por ^{13}C -RMN; **considerado como esterilizable si la pérdida de viscosidad intrínseca antes/después de la esterilización es inferior al 40%.

Los CC obtenidos son todos solubles en un amplio rango de pH, en particular, en el rango de pH de 4,0 a 8,5, sin opalescencia.

- 15 Las formulaciones se preparan en una concentración de CC del 1,5 o del 2% colocados en una jeringa de vidrio, luego esterilizadas por autoclave de acuerdo con un ciclo estándar de 15 minutos a 121°C. Con el objeto de evaluar si las formulaciones son esterilizables por autoclave, se mide la viscosidad intrínseca de los polímeros antes y después del autoclave por viscosimetría capilar, después de la dilución de un factor de 25 por un tampón fosfato. La pérdida de viscosidad intrínseca de los CC es inferior al 40%, lo que traduce una resistencia aceptable, contrariamente a la formulación CC-3 del Ejemplo 2 (que ha sufrido una pérdida de aproximadamente el 60% de su viscosidad intrínseca).

- 20 La inspección visual de las formulaciones esterilizadas de la Tabla 3c indica que son transparentes y no opalescentes. Se controlan entonces para verificar que el nivel de endotoxinas y la carga microbiológicas son inferiores a 20 EU/mL y 100 cfu/g, luego, se evalúa su inmunocompatibilidad con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón.

Tabla 3d – Inmunocompatibilidad de las formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico con la ayuda del modelo de bolsa de aire en el ratón, 24 horas después de la inyección*				
No	Nro. de glóbulos blancos ($\times 10^6$ células/ mL)	Conc. en IL1-beta ($\times 10^{-9}$g/mL)	Conc. en KC/CXCL1 ($\times 10^{-9}$g/mL)**	Conc. en TNF-alfa ($\times 10^{-9}$g/mL)**

CC-5	1,9	6	28	391
CC-6	17	12	20	< 125
CC-7	9,0	12	20	< 125
CC-8	2,6	< 3	20	< 125
CC-9	6,5	7	20	< 125
CC-10	2,4	< 3	16	< 125
Controles				
Control negativo (salino)	0,2	17	23	272
Control positivo (1% carragenano)	33,2	28	> 700	767
Synvisc® (Hylan GF20)	0,7	4	46	< 125

*Valor promedio en 3 sujetos; **límite de detección: $3,10^{-9}$ g/mL para IL1-beta y $125,10^{-9}$ g/mL para TNF-alfa.

En general, se constata una buena inmunocompatibilidad de las formulaciones de CC de origen fúngico, con una atenuación incluso una supresión de la reacción inmune con respecto a las formulaciones de N-succinil quitosano del Ejemplo 1, y a las formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen animal del Ejemplo 2.

Se constata que una baja concentración de marcador KC/CXCL1 es inducida por las formulaciones de CC de origen fúngico, al mismo nivel que la del control negativo (salino) y más bajo que para el producto Synvisc®. Esto traduce una activación de los neutrófilos despreciables incluso ausente, contrariamente a lo que se ha reportado después de la inyección de las formulaciones de CSS (Ejemplo 1) y de CC de origen animal (Ejemplo 2).

Por otra parte, se constata que para algunas de las formulaciones de CC de origen fúngico (es decir CC-8 y CC-10), los cuatro parámetros de la reacción inmune están atenuadas o suprimidas simultáneamente, es decir a la vez el número total de glóbulos blancos, el marcador IL1-beta, el marcador KC-CXCL1 y el marcador TNF-alfa. Esto no se produce con las formulaciones de CSS ni con las formulaciones de CC de origen animal.

Surge que para los CC de origen fúngico, las formulaciones que presentan esta atenuación simultánea de los cuatro parámetros son aquellas cuya carga negativa es la más elevada (por ejemplo, -26mV para CC-8 y -24,5mV para CC-10 a pH 7,5).

Se observa que las formulaciones de CC-4 de origen animal del Ejemplo 2 y de CC-5 de origen fúngico levemente sustituidos por el grupo carboxialquilo acarrearán una cierta activación del marcador TNF-alfa, y que, por el contrario, solamente la formulación de CC-4 de origen animal acarrea una secreción no despreciable del marcador KC/CXCL1. También se observa que la formulación de CC-10 (de origen fúngico) no ha acarreado activación de los neutrófilos, contrariamente a la formulación de CC-3 de origen animal del Ejemplo 2.

Ejemplo 4 – Evaluación de la tolerancia local intraarticular de formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico con la ayuda de un modelo ovino

Se preparan formulaciones al 2% de dos carboximetilos de quitosano de origen fúngico (CC-8 y CC-10) del Ejemplo 3 para evaluar su potencial para una utilización por inyección intraarticular, con la ayuda de un modelo ovino. Se administra un volumen de 2 mL de las dos formulaciones a cordero, y la reacción local inducida por su inyección intraarticular se evalúa durante un período de 2 semanas. También se han evaluado los efectos de una segunda inyección de la formulación CC-8 en la misma articulación, 1 mes después de la fecha de la primera inyección. El producto Synvisc® es administrado de la misma manera, con un volumen de 1 mL o de 2 mL.

Los signos clínicos se siguen diariamente por palpación de la articulación y observación de la cojera durante un lapso de 15 días y juzgados de acuerdo con un puntaje semicuantitativo de 0 (sin señal) a un puntaje máximo de 3 para la efusión y 5 para la cojera. El resultado clínico global en el período de 15 días se reporta en términos de incidencia por puntaje (Tabla 4), así como la caracterización del fluido sinovial realizado al día 15.

Tabla 4 – Evaluación de la tolerancia local de formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico, y de Synvisc® con la ayuda de un modelo ovino por inyección intraarticular			
No formulación Volumen (N: nro. de animales)	Incidencia de la efusión en 15 días (puntuación 0 a 3)	Incidencia de la cojera en 15 días (puntuación 0 a 5)	Caracterización del fluido sinovial punzado el día 15

CC-8 Primera inyección de 2mL (N = 4)	Puntuación 0: 100% Puntuaciones 1 a 3: 0%	Puntuación 0: 100% Puntuaciones 1 a 5 : 0%	Normal
CC-8 Segunda inyección de 2mL (N = 2)	Puntuación 0: 100% Puntuaciones 1 a 3: 0%	Puntuación 0: 100% Puntuaciones 1 a 5 : 0%	Normal
CC-10 Una inyección de 2mL (N = 4)	Puntuación 0: 100% Puntuaciones 1 a 3: 0%	Puntuación 0: 100% Puntuaciones 1 a 5 : 0%	Normal
Synvisc® (Hylan GF-20) N = 8, dont : -une injection de 1mL (N = 4), -une injection de 2mL (N = 4)	Puntuación 0: 62,5% Puntuación1 : 37,5% Puntuaciones 2 à 3 : 0%	Puntuación 0 : 62,5% Puntuación1 : 37,5% Puntuaciones 2 à 5 : 0%	Normal

Ejemplo 5 – Evaluación de la tolerancia local de formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico, después de la inyección intradérmica en el conejo

- 5 Se preparan las formulaciones de pH y la osmolalidad fisiológicas de tres carboximetilo de quitosanos de origen fúngico con el fin de evaluar su potencial para la administración intradérmica, con la ayuda de un modelo de conejo (Tabla 5a). Los CC-12, CC-13, CC-14 y CC-15 de origen fúngico se preparan por carboximetilación, luego la reacetilación de acuerdo con el método general descrito en el Ejemplo 3 para el CC-8 modulando los parámetros de síntesis para hacer variar el GA y el GS (Tabla 5a). CC-13 y CC-14, presentan un GS bajo del 41% y 51% respectivamente, y un
- 10 GA elevado del 74% y 69%, respectivamente.

Las formulaciones se colocan en una jeringa de vidrio de 1 mL, luego se esterilizan por autoclave de acuerdo con un ciclo estándar (15 minutos a 121°C). Las tres formulaciones resisten a la esterilización por autoclave, y la pérdida de viscosidad intrínseca es inferior al 40%. Por último, las formulaciones se controlan para verificar que el nivel de

15 endotoxinas bacterianas es inferior a 40 EU/mL y la carga microbiológica inferior a 100 cfu/mL.

Se administra un volumen de 200 µL de formulación por inyección intradérmica en el conejo a través de una aguja de diámetro 27 Gauge (aguja de diámetro muy pequeño), de acuerdo con un protocolo conforme a la norma ISO10993 (parte 10) para la evaluación de la irritación primaria inducida por un implante intradérmico. Una cantidad de 6 conejos reciben, cada uno, tres inyecciones de cada formulación. También se inyecta un producto de relleno cutáneo comercial a base de ácido hialurónico reticulado, Juvéderm® Voluma (Allergan), por medio de una aguja de diámetro 27 Gauge.

20 Las señales macroscópicas de irritación cutánea se informan para todos los animales y los sitios inyectados a 12, 24, 48 horas con miras a determinar el puntaje de irritación primaria, evaluando la aparición eventual de eritema, escara, edema e induración en una escala semicuantitativa, de acuerdo con una puntuación de 0 (sin señal) a 4 (señal máxima). El puntaje de irritación primaria de cada producto se determina de la manera siguiente: se agrega el promedio de las puntuaciones de eritema de los 18 sitios inyectados a las 24 h, 48 h y 72 h. De la misma forma, se calcula la suma de los promedios del puntaje de edema. Se agregan las 2 sumas (eritema y edema), luego se divide por 54 para obtener el puntaje promedio de irritación primaria. Se procede de la misma forma con el producto comparativo. las puntuaciones de irritación se informan en la Tabla 5b. Se observa que las formulaciones de CC no han acarreado ningún signo de edema y pocos signos de eritema, de puntaje inferior a los inducidos por Juvéderm® Voluma en todos

25 los casos. Se concluye que las formulaciones son no irritantes y menos irritantes que Juvéderm® Voluma.

30

Tabla 5a – Características de los carboximetilos de quitosanos de origen fúngico, y de sus formulaciones

No (concentración)	GA* (mol %)	GS* (mol %)	Solubilidad del polímero	Esterilizable por autoclave**	Potencial zeta a pH 7,5 (mV)
CC-12 (3%)	41	50	Insoluble entre pH 3,1 y 6,6	Sí	-17
CC-13 (3%)	74	45	Soluble a cualquier pH	Sí	-20
CC-14 (3%)	69	51	Soluble por encima de pH 3,6	Sí	-17***
CC-15 (2%)	55	100	Soluble por encima de pH 3,1	sí	-27,5

*determinados por ¹³C-RMN; **considerado como esterilizable si la pérdida de viscosidad intrínseca antes/después de la esterilización por autoclave es inferior o igual al 40%; ***valor estimado a partir de la regresión polinomial de la curva potencial zeta a pH 7,5 en función del GS (± 20%).

35

Tabla 5b – Evaluación de la puntuación de irritación primaria de formulaciones de carboximetilo de quitosano y de Juvéderm® Voluma después de inyección intradérmica en el conejo	
No (concentración)	Puntuación de irritación primaria a 72 horas Puntuación total y puntuación promedio)
CC-12 (3%)	0,11 (0,002)
CC-13 (3%)	0,22 (0,004)
CC-13 (3%)	0,17 (0,003)
CC-14 (2%)	0 (0)
Juvéderm® Voluma	2,67 (0,049)

El período de observación luego se prolonga hasta 2 semanas después de la inyección, con una evaluación de las señales clínicas en los días 5, 7, 9, 11 y 14. Con el objeto de realizar un análisis histológico eventual, se sacrifican 2 animales al día 3, día 7, y día 14 después de la inyección.

5 Las puntuaciones macroscópicas se informan en la Tabla 5c. Se observa que las cuatro formulaciones presentan una excelente tolerancia local en un período de 2 semanas después de la inyección intradérmica, con las puntuaciones inferiores a las observadas con el producto Juvéderm® Voluma (Allergan), para todos los signos macroscópicos, y ningún signo de escara ni de edema. Las formulaciones de CC-12 y de CC-13 presentan algunos signos de eritema de puntaje bajo (1 máximo) que han desaparecido el día 11. La formulación de CC-13 presenta algunos signos de eritema de punta máximo 2 con una incidencia del 33% al día 9, que también han desaparecido el día 11, y que no acarean efecto deletéreo sobre el tejido.

Tabla 5c – Evaluación de la tolerancia local de formulaciones de carboximetilo de quitosano después de inyección intradérmica en el conejo (2 semanas) (expresada en términos de incidencia de las puntuaciones)							
No (concentración)	Plazo (nro. sitios)*	Día 3 (18)	Día 5 (12)	Día 7 (12)	Día 9 (6)	Día 11 (6)	Día 14 (6)
Puntuación de eritema							
CC-12 (3%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%
CC-13 (3%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	83% 17%	67% 33%	100% 0%	100% 0%
CC-14 (3%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%
CC-15 (2%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%
Juvéderm® Voluma	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	6% 94%	17% 83%	17% 83%	17% 83%	33% 67%	33% 67%
Puntuaciones de escaras y de edemas							
CC-12 (3%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%
CC-13 (3%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	83% 17%	67% 33%	100% 0%	100% 0%
CC-14 (3%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%
CC-15 (2%)	Puntuación 0-1 Puntuación 2-	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%

	4						
Juvéderm® Voluma	Puntuación 0-1 Puntuación 2-4	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%

*Número de sitios evaluados macroscópicamente en cada plazo después de la inyección.

Por otra parte, las cuatro composiciones (CC-12, CC-13, CC-14 y CC-15) pueden ser fácilmente inyectadas a través de una aguja fina de 27 Gauge, adecuada para la administración intradérmica.

Ejemplo 6 – Susceptibilidad a la degradación enzimática in vitro

En este ejemplo, se compara la velocidad a la cual se degrada una formulación en presencia de una mezcla de las dos enzimas lisozima e hialuronidasa presentes en los fluidos biológicos (por ejemplo, el fluido sinovial, las lágrimas, o el fluido intersticial de los tejidos conjuntivos). La enzima lisozima se la reconoce por lo general por su capacidad de hidrolizar los biomateriales a base de quitosano.

Se prepara un carboximetilo de quitosano fúngico CC-16 de la misma manera que el CC-8 del Ejemplo 3, modulando los parámetros de síntesis para ajustar el GA y el GS. Se preparan formulaciones al 2% de CC-16, de CC-8 (Ejemplo 3) y de CC-10 (Ejemplo 3) en un tampón fosfato con 3,5% de sorbitol. También se evalúa una formulación al 2% del CC-3 de origen animal (Ejemplo 2), y dos productos de viscosuplementación comerciales a base de ácido hialurónico no reticulado (HA-1 y HA-2).

La formulación se diluye con un factor 25 en un tampón fosfato. La solución se agita luego durante 12 horas, y se agrega a la solución diluida una mezcla de enzimas lisozima e hialuronidasa, en dosis de 184 unidades/mL y 2,6 unidades/mL, respectivamente. La medición de viscosidad intrínseca se lleva a cabo a intervalo regular, con la ayuda de un viscosímetro capilar automático I-Visc (Lauda) provisto de un capilar de tipo Ubbelohde (modelo 0a). Entonces se calcula el tiempo de semivida de cada formulación, es decir el tiempo necesario para que la viscosidad intrínseca del polímero alcance la mitad de su valor inicial (Tabla 6).

Tabla 6 – Tiempo de semivida de las formulaciones en presencia de una mezcla de enzimas lisozima/hialuronidasa a 37°C						
	CC-8 (2%)	CC-10 (2%)	CC-16 (2%)	CC-3 (2%)	HA-1	HA-2
GA /GS (mol %)*	50 / 80	46 / 167	67 / 115	71 / 149	/	/
Tiempo de semivida (minutos)	1200 min	958 min	612 min	88 min	73 min	11 min

*determinados por RMN del carbono 13 en fase sólida.

Se comprenden de los resultados que las formulaciones de carboximetilo de quitosano se hidrolizan por la mezcla lisozima/hialuronidasa, y que se puede modular la cinética de hidrólisis a través de la estructura molecular del carboximetilo de quitosano. Esto permite ajustar la duración de residencia del producto en función de la aplicación terapéutica prevista. También se deduce que los carboximetilos de quitosano de origen fúngico son menos rápidamente degradados que el carboximetilo de quitosano de origen animal (CC-3) y que los dos productos comerciales a base de ácido hialurónico.

Ejemplo 7 - impacto del calor

En este ejemplo, se colocan las jeringas que contienen las formulaciones en una estufa a temperatura controlada a 60°C durante un lapso de 11 días, lo que permite evaluar su resistencia al calor a una temperatura más elevada que una temperatura de almacenamiento habitual. En cada plazo, se extrae una jeringa y se mide la viscosidad intrínseca del polímero de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6. Se reporta la relación entre la viscosidad en el plazo y la viscosidad inicial (en % de la viscosidad inicial).

Se preparan dos carboximetilos de quitosano de origen fúngico CC-17 y CC-18 de la misma manera que el CC-8 del Ejemplo 3, modulando los parámetros de síntesis para ajustar el GA y el GS, y caracterizados por RMN del carbono 13 (Tabla 7). Se formulan en una concentración del 2% en presencia de un azúcar reductor, sorbitol o manitol, respectivamente. También se evalúa una formulación al 2% del CC-3 de origen animal del Ejemplo 2 (con el 3,5% de sorbitol), y así como el producto de viscosuplementación comercial a base de ácido hialurónico no reticulado del Ejemplo 6 (HA-2).

Tabla 7 – Evolución de la viscosidad intrínseca de las formulaciones conservadas a 60°C (en % de la viscosidad intrínseca inicial)

No (concentración, azúcar reductor)	GA / GS (mol %)*	Día 3	Día 7	Día 11
CC-17 (2%, 3,5% sorbitol)	71 / 49	96%	95%	91%
CC-18 (2%, 3,5% manitol)	71 / 49	100%	92%	91%
CC-3 (2%, 3,5% sorbitol)	71 / 149	84%	80%	70%
HA-2	/	94%	92%	81%

*determinados por RMN del carbono 13 en fase sólida

Se concluye que las formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico son resistentes al calor, y menos sensibles que la formulación de origen animal (CC-3), y que un producto comercial a base de ácido hialurónico.

5 Ejemplo 8 - Procedimientos de reducción de la carga microbiológica de carboximetilo de quitosano

Se produce un carboximetilo de quitosano de origen fúngico, CC-19, de acuerdo con el método utilizado para preparar el CC-8 del Ejemplo 3, partiendo de un quitosano «ultra-high». Sus características son las siguientes: GA 67% y GS 115% (medidos por RMN del carbono 13), soluble en cualquier pH, transparente, no opalescente. El potencial zeta a pH 7,5 de la formulación se estima en -27mV (a partir de la regresión polinomial de la curva del potencial zeta en función del GS). Se prepara una formulación de CC_19 al 2% en un tampón fosfato con el 3,5% de sorbitol, tal como se describe en el Ejemplo 3. Sus características son las siguientes: pH 7,3 y osmolalidad 279 mOsm/kg. Con el objeto de testear su factibilidad y el impacto sobre las características finales de la formulación, se emplean dos procedimientos conocidos para poder reducir la carga microbiológica de formulaciones acuosas, y se compara la viscosidad intrínseca de la formulación (diluida con un factor de 25), con la ayuda de un viscosímetro capilar I-Visc (Lauda, capilar 0a), y su índice de refracción medido con la ayuda de un refractómetro HI88713 (Hanna) antes y después del procedimiento (Tabla 8). Los dos procedimientos son los siguientes:

- Autoclave: la formulación se coloca en jeringa de vidrio, luego, la jeringa se pone en autoclave de acuerdo con un procedimiento estándar (15 minutos a 121°C);

- Filtración: un volumen de 300 mL de formulación se filtra con la ayuda de un filtro de porosidad 0,2 µm (Prewflow capsule filter, Pall).

El procedimiento de filtración sobre filtro de 0,2 µm se lleva a cabo de manera adecuada, con una presión constante de 2 bar y un caudal constante de aproximadamente 6 litros por hora.

Tabla 8 - Impacto de los procedimientos de filtración y del autoclave en la formulación de CC-19 al 2%		
Indicador	Procedimiento de filtración (0,2 µm)	Procedimiento por autoclave (15 min 121°C)
Diferencia de viscosidad intrínseca (%)	14% de reducción de la viscosidad inicial	20% de reducción de viscosidad intrínseca
Diferencia de índice de refracción	Sin diferencia	Sin diferencia

Se concluye que los dos procedimientos tienen un impacto en términos de reducción de materia (índice de refracción) y de degradación del polímero (viscosidad intrínseca). Por lo tanto, son aplicables industrialmente para obtener dispositivos médicos y productos farmacéuticos a base de formulaciones de carboximetilo de quitosano.

35 Ejemplo 9 – Capacidad lubricante de las formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico, *in vitro*

Este ejemplo tiene por objeto ilustrar la capacidad lubricante de formulaciones de dos carboximetilos de quitosano de origen fúngico, CC-8 del Ejemplo 3 (2% y 1%) y CC-19 del Ejemplo 8 (2%), con el fin de un uso eventual como viscosuplemento intraarticular o como gota oftálmica para la superficie ocular. La capacidad lubricante se evalúa con la ayuda de un modelo *in vitro* que permite evaluar la reducción de las fricciones entre dos superficies. La formulación de CC-3 (2%) de origen animal del Ejemplo 2 y de los productos comerciales a base de ácido hialurónico también se caracterizan:

- Viscosuplementos intraarticulares: Synvisc® (Sanofi) y dos viscosuplementos a base de ácido hialurónico no reticulado, HA-2 de los Ejemplos 6 y 7) y HA-3.

- Gotas oftálmicas: dos productos a base de ácido hialurónico no reticulado, (HA-4 y HA-5).

Por otra parte, se extrae el fluido sinovial de la rodilla de un paciente que padece osteoartritis, antes de una intervención quirúrgica para la colocación de una prótesis de rodilla. El fluido se conserva a -20°C, luego se pone a 25°C antes del análisis del coeficiente de fricción.

La medición del coeficiente de fricción se realiza de acuerdo con el siguiente método. Dos discos a base de un biomaterial de tipo poliacrilato utilizado para la fabricación de lentes intraoculares hidrófobas (tal como se describe en la patente EP 1830898 de diámetro 16,15 mm son previamente hidratados por inmersión en agua a 60°C durante aproximadamente 2 horas, luego se fijan en las geometrías superior e inferior de un reómetro DHR-2 (TA Instruments). Se coloca un volumen de aproximadamente 100 µL del fluido por testear sobre el disco inferior, luego, la geometría superior se desciende hasta el contacto entre los dos discos, hasta una fuerza normal impuesta de 5 Newton. Las mediciones del coeficiente de fricción se realizan a 25°C durante un lapso de 150 segundos, a fuerza normal constante (5N), frecuencia de oscilación de 1,256 rad/s y ángulo de deformación de aproximadamente 0,05 radian, de acuerdo con un protocolo adaptado del protocolo descrito por Waller et al. (en: J Rheumatol 39, 7, 1473, 2012). Se activa la opción «respecto del punto cero de partida del movimiento oscilatorio». En cada punto de medición, se registra el valor del torque, luego se calcula el coeficiente de fricción (COF) de acuerdo con la fórmula: $COF = \text{torque} / (1/3 \times \text{diámetro del disco} \times \text{fuerza normal})$. Para cada formulación, la medición se replica 5 veces. Se reporta el valor del coeficiente de fricción por extrapolación de la ordenada al origen partiendo de cada curva COF en función del tiempo COF0, Tabla 7).

Tableau 9 – Capacité lubrifiante des formulations de carboxyméthyl chitosan d'origine fongique			
No (concentración)	Coeficiente de fricción (COF₀)		
	Medición 1	Medición 2	Medición 3
Fluido sinovial de un paciente artrósico	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

En presencia de las formulaciones de carboximetilo de quitosano al 2% y al 1%, el coeficiente de fricción es bajo, del mismo orden de magnitud, incluso más bajo que los productos comerciales de uso intraarticular y oftálmico, y significativamente más bajo que el de un fluido sinovial artrósico, en las condiciones de medición. Se deduce de ello que las formulaciones de carboximetilo de quitosano presentan el potencial de actuar como lubricante, reduciendo las fricciones entre dos superficies, por ejemplo, las superficies de cartílago de una articulación después de una inyección intraarticular o la superficie ocular después de la instilación en forma de gotas. Las formulaciones de los CC de origen fúngico son más eficaces para reducir una reducción de las fricciones que la formulación de CC-3 de origen animal.

Ejemplo 10 - Utilización de agujas finas para la administración de una formulación de carboximetilo de quitosano de origen fúngico por vía intradérmica

Este ejemplo tiene por objeto mostrar que una formulación del 2% de carboximetilo de quitosano de origen fúngico puede ser fácilmente inyectada en la dermis, en particular con la ayuda de agujas muy finas diseñadas para la inyección en las capas superficiales de la dermis. La prueba consiste en medir la fuerza necesaria para eyectar el producto fuera de la jeringa equipada con una aguja, a una velocidad de eyección dada, con la ayuda de un banco de ensayo de compresión. Se considera de manera empírica que la inyección del producto es fácil y cómoda para el médico y el paciente cuando la fuerza de eyección medida por esa prueba es inferior a 50 Newton, y que la eyección se realiza de manera regular y sin sacudidas. Es ventajoso poder administrar el producto con la ayuda de agujas de diámetro inferior a 0,3 mm (30 G) con el objeto de minimizar el dolor y el sangrado con la inyección, así como el riesgo posterior de hematomas y de rojez cutánea.

Se produce un carboximetilo de quitosano de origen fúngico de referencia CC-20 de acuerdo con el método general del CC-8 del Ejemplo 3, partiendo de un quitosano de tipo «ultra-high», con las siguientes modificaciones: para 10 g de quitosano, se utilizan 228 ml de isopropanol, 57 ml de hidróxido de sodio al 40% y 47 g de MCA. La reacción se lleva a cabo a 35°C durante 23 horas. Para 15 g de carboximetilo de quitosano intermedio, se utilizan 7,5 ml de anhídrido acético en cada adición, y se aplican 3 ciclos suplementarios de purificación antes del secado y recuperación del carboximetilo de quitosano final. Las características de CC-20 son las siguientes: GA 53% y GS 85% (determinados

por RMN del carbono ¹³), soluble en agua a cualquier pH (de acuerdo con el método precedentemente descrito), formando una solución transparente y no opalescente, de potencial zeta a pH 7,5 estimado en -24mV (a partir de la regresión polinomial de la curva del potencial zeta en función del GS).

- 5 Se prepara una formulación de CC-20 al 2% (m/m), tal como se describe en el Ejemplo 3. La formulación se coloca en una jeringa de vidrio de 1 mL (BD-Medical) sobre la que se adapta la aguja. Con la ayuda de un banco de ensayo de compresión MultiTest 2.5-i (Mecmesin) equipado con una célula de compresión de 100 N, se mide la fuerza necesaria para la eyección del producto aplicando una velocidad de eyección constante de 80 mm/min. La fuerza máxima tolerada por el equipo es de aproximadamente 70 Newton. Se testean las aguas siguientes: 30G, 32G, 33G e Invisible Needle™ (TSK Laboratory), cuyas dimensiones (diámetro exterior x longitud) son presentadas en la Tabla 10.

- 15 A título comparativo, los productos comerciales a base de ácido hialurónico no reticulado (referencias Ha-6, HA-7) y reticulado (HA-8) indicados para el rejuvenecimiento cutáneo por vía intradérmica, se evalúan de acuerdo con el mismo método, en su jeringa de origen. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10 – Fuerza de eyección (en Newton) de una formulación de carboximetilo de quitosano de origen fúngico y de productos comerciales de rejuvenecimiento cutáneo a través de agujas intradérmicas (velocidad 80 mm/min)				
Referencia de la aguja	TSK PRC-30013I	TSK PRE-32009	TSK PRE-3304	TSK LDS-02009
Dimensiones	30G 0,3 x 13mm	32G 0,26 x 9mm	33G 0,24 x 4mm	Invisible 0,2 x 9mm
CC-20 (2%)	12 N	26 N	27 N	39 N
HA-6	/	30 N	30 N	44 N
HA-7	23 N	29 N	32 N	40 N
HA-8	22 N	45 N	46 N	67 N

- 20 Se concluye de este ejemplo que, como los productos de rejuvenecimiento a base de ácido hialurónico no reticulado, la formulación de CC-20 es fácilmente inyectable con la ayuda de agujas finas de diámetro inferior a 0,3 mm. Se notará que la fuerza de eyección medida es incluso sistemáticamente inferior a la de los productos de rejuvenecimiento a base de ácido hialurónico no reticulado. El producto de rejuvenecimiento a base de ácido hialurónico reticulado requiere una fuerza sistemáticamente más elevada, y supera el límite aceptable con la aguja del diámetro más pequeño (0,2 mm, Invisible Needle™). Por otra parte, esos resultados han sido confirmados por médicos especializados, a través de una prueba cualitativa que consiste en inyectar la formulación de CC-20 y los productos de rejuvenecimiento en la piel de una pata de cerdo.

Ejemplo 11 - Formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico de baja concentración con el fin de una indicación como gotas oftálmicas

- 30 Este ejemplo tiene por objeto mostrar que una solución de carboximetilo de quitosano de origen fúngico de baja concentración puede aplicarse para la preparación de gotas oftálmicas con miras a reducir los síntomas de los trastornos de la superficie ocular o de protegerla. Además de las características fisiológicas, es decir, preferentemente un pH alrededor de 7,2 y una osmolalidad alrededor de 200 mOsm/kg, las gotas oftálmicas deben presentar, de preferencia, las propiedades fisicoquímicas siguientes: índice de refracción bajo (cercano a 1,33) y capacidad de minimizar las fricciones entre la superficie ocular y la conjuntiva y los párpados (capacidad lubricante). Por último, su perfil reológico es tal que el producto no es demasiado fluido para poder depositarse sobre el ojo, pero que se instale de manera homogénea y que no sea pegajoso. Su perfil reológico debe también ser tal que el parpadeo sea fácil, sin acumulación, es decir una baja iscosidad de fuerte porcentaje de cizallamiento. En particular, Orobia et al. consideran que la viscosidad durante el movimiento ocular (además del parpadeo) es ventajosamente superior a 10 mPa.s, por ejemplo, alrededor de 20 mPa.s (en: Clinical Ophthalmology 12, 453, 2018). Cabe señalar aquí que el valor de la viscosidad es susceptible de variar de acuerdo con el método de medición, en particular el equipamiento, el modo de medición y los parámetros, la temperatura y el porcentaje de cizallamiento aplicado al producto testado.

- 45 Se produce un carboximetilo de quitosano de origen fúngico de referencia CC-21 de acuerdo con el mismo método que el CC-20 del Ejemplo 10. Se compara la estructura molecular de CC-20 y CC-21 en forma ácida, por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier con la ayuda de un espectrómetro Nicolet iS5 equipado con un ID7-ATR (Thermo Scientific), de acuerdo con el método descrito por Chen et al. (Carbohydrate Polymers 53, 355, 2003). Solamente se determina su estructura molecular indicada al 99% en la región de longitud de onda de 1200 a 1800 cm⁻¹, y por consiguiente, sus GA y GS son similares.

- 50 Se preparan dos formulaciones del carboximetilo de quitosano CC-21 de concentración 0,7% y 0,4% (m/m), en un tampón fosfato con glicerol. Se ajusta el pH a 7,2 ± 0,2 y la osmolalidad a 200 ± 20 mOsm/kg, luego, las formulaciones se filtran, luego se caracterizan su capacidad lubricante y su perfil de viscosidad de acuerdo con los métodos descritos

más adelante. Se caracterizan gotas oftálmicas a base de ácido hialurónico (HA) de composición variable, disponibles comercialmente, de acuerdo con los mismos métodos (HA-5 a HA-9). Los resultados se presentan en la Tabla 11b.

Método de medición del coeficiente de fricción (adaptado a las gotas oftálmicas).

La capacidad para lubricar, es decir, reducir las fricciones entre dos superficies en contacto, se evalúa por la medición del coeficiente de fricción entre dos discos de biomaterial poliacrilato idénticos a los del Ejemplo 9. Los dos discos se fijan en las geometrías superior e inferior de un reómetro DHR-2 (TA Instruments), se coloca un volumen de aproximadamente 100 μL del producto por testear sobre el disco inferior, luego la geometría superior se hace descender hasta estar en contacto entre los dos discos, hasta una fuerza normal impuesta de 5 Newton. La medición del coeficiente de fricción se realiza a 25°C durante un lapso de 60 segundos, a fuerza normal constante (5 N), frecuencia de oscilación de 6 rad/s y ángulo de deformación de aproximadamente 1.71 radian, de acuerdo con un protocolo adaptado de Waller et al. (J Rheumatol 39, 7, 1473, 2012) y de los parámetros que imitan las condiciones cinemáticas de parpadeo descritas por Kwon et al. (J Royal Society Interface 10, 2, 2013). Se activa la opción «respecto del punto cero de partida del movimiento oscilatorio». En cada punto de medición, se registra el valor del torque, luego se calcula el coeficiente de fricción (COF) de acuerdo con la fórmula: $\text{COF} = \text{torque} / (1/3 \times \text{diámetro del disco} \times \text{fuerza normal})$. Se determina el valor promedio del COF entre 0 y 60 s. Se calcula así el coeficiente de fricción promedio y la diferencia tipo de 5 mediciones consecutivas. El valor mínimo del COF es de 52 en el caso en que las dos superficies no están en contacto. El límite superior de COF corresponde al caso en que los dos discos ya no están en movimiento uno con respecto al otro.

Dado que el valor de COF varía de una serie a otra, es necesario caracterizar los productos por comparar en una misma serie, con la ayuda de los mismos discos, y en un orden aleatorio. Se utiliza entonces una escala de puntajes relativos para clasificar los productos testeados en una misma serie, del más eficaz (puntaje 1), al menos eficaz (puntaje 3), de acuerdo con los criterios de la Tabla 11a. Los límites «COFA» y «COFB» se definen por el COF de dos gotas oftálmicas comerciales tomadas como referencia en cada serie gotas A (compuestas por 0,15% HA y 0,25% carbómero) y gotas B (0,15% HA). De acuerdo con esta escala, es ventajoso que el puntaje de reducción de las fricciones sea de 1 ó 2, y de preferencia de 1, para un uso como gota lubricante de la superficie ocular. Para los productos de puntaje 3 la capacidad lubricante no es satisfactoria, y la variación en la medición es importante.

Tabla 11a – Escala de puntuaciones de lubricación (reducción de fricciones)	
Score	Límites de COF
1	$\leq 1,1 \times \text{COF}_A$
2	$> 1,1 \times \text{COF}_A$ et $\leq 1,1 \times \text{COF}_B$
3	$> 1,1 \times \text{COF}_B$

Métodos de medición de la viscosidad en función del cizallamiento

Simmons et al. han determinado que el porcentaje de cizallamiento de los movimientos del ojo abierto es de aproximadamente 10s⁻¹ y el porcentaje de cizallamiento durante el parpadeo es de aproximadamente 10000s⁻¹ (en: Clinical Ophthalmology 11, 1637, 2017). Se selecciona el método de medición reométrico en función del rango de porcentaje de cizallamiento por estudiar, y teniendo en cuenta que los productos son soluciones fluidas de baja viscosidad:

- Rango de cizallamiento correspondiente al movimiento ocular. Se mide la viscosidad en modo rotacional con una prueba de barrido de flujo con la ayuda de un reómetro DHR-2 de regulación de estrés (TA Instruments) equipado con un Peltier chato y una geometría de tipo «cono» de 60 mm de diámetro, y un ángulo de truncamiento de 2°. El producto se equilibra durante 1 minuto a 37°C la temperatura se controla mediante el Peltier. Para evitar la evaporación, el sistema está equipado con una trampa de solvente y una cobertura metálica. Luego, la prueba de barrido de flujo se inicia y la viscosidad se mide en función del porcentaje de cizallamiento, de 0,001s⁻¹ a 100s⁻¹. Se reporta el valor de viscosidad a 10 s⁻¹.

- Rango de cizallamiento correspondiente al parpadeo. Se mide la viscosidad en modo rotacional con una prueba de barrido de flujo con la ayuda de un reómetro DHR-3 de regulación de estrés (TA Instruments) equipado con una geometría de tipo «de doble GAP» y con un Peltier de cilindro concéntrico, y equipado con una trampa de solvente y una cobertura metálica. El producto se equilibra durante 1 minuto a 37°C, luego, se aplica un porcentaje de cizallamiento variable de 0,001s⁻¹ a 10000s⁻¹. El valor de viscosidad de 10000s⁻¹ se compara con respecto al valor de 10s⁻¹.

Tabla 11b – Características de formulaciones de carboximetilo de quitosano de origen fúngico de baja concentración, y de gotas oftálmicas a base de ácido hialurónico				
Referencia	Índice de refracción	Viscosidad		Puntuación de reducción de fricciones
		A 10s⁻¹ (mPa.s)	a 10000s⁻¹ (mPa.s)	
Tampón fosfato con	1,3348	N/A	N/A	No mensurable

glicerol				
CC-21 0,7%	1,3358	27	Inferior a la viscosidad a 10s ⁻¹	1
CC-21 0,4%	1,3353	10		1
HA-5	1,3343	6	Inferior a la viscosidad a 10s ⁻¹	2
HA-10	1,3386	3		2
HA-11	1,3350	6		2
HA-12	1,3346	50		2

5 Los resultados confirman que las dos formulaciones de carboximetilo de quitosano fúngico CC-21 responden a los requerimientos de las gotas oftálmicas: presentan un índice de refracción bajo, un coeficiente de fricción satisfactorio (puntaje 1, es decir, tan eficaz como las gotas comerciales más lubricantes), una viscosidad 10 a 30 mPa.s en condiciones de movimiento ocular, y una viscosidad más baja en condiciones de parpadeo. Sin el carboximetilo de quitosano, el tampón fosfato suplementado con glicerol no permite responder a los requerimientos de las gotas oftálmicas. Por último, se constata que la viscosidad puede disminuirse reduciendo la concentración de carboximetilo de quitosano (por ejemplo del 0,7 al 0,4%) sin alterar la capacidad para reducir las fricciones (puntaje 1).

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Carboxialquil quitosano de origen fúngico que tiene unidades glucosamina, unidades N-acetil-glucosamina y unidades glucosamina sustituidas por un grupo carboxialquilo, teniendo dicho carboxialquil quitosano preferiblemente un grado de sustitución por un grupo carboxialquilo superior al 20%, expresado en número de moles del sustituyente con respecto al número de moles de unidades totales.
- 10 2.- Carboxialquil quitosano de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el grado de sustitución por un grupo carboxialquilo es superior al 50%, expresado en número de moles del sustituyente con respecto al número de moles de unidades totales.
- 15 3.- Carboxialquil quitosano de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado por que** el grado de sustitución por un grupo carboxialquilo es inferior al 200% expresado en número de moles del sustituyente con respecto al número de moles de unidades totales.
- 20 4.- Carboxialquil quitosano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el quitosano se obtiene del micelio de un hongo de tipo *Ascomiceto*, y, en particular, de *Aspergillus niger*, y/o de un hongo *Basidiomiceto*, y en particular, *Lentinula edodes* (shiitake) y/o *Agaricus bisporus* (champiñón), preferiblemente, el quitosano se obtiene de *Agaricus bisporus*.
- 25 5.- Carboxialquil quitosano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4, **caracterizado por que** el carboxialquil quitosano presenta un grado de acetilación del 40% al 80% expresado en número de moles de unidades N-acetil-glucosamina con respecto al número de moles de unidades totales.
- 30 6.- Carboxialquil quitosano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** el carboxialquil quitosano está reacetilado.
- 35 7.- Carboxialquil quitosano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** está esterilizado.
- 40 8.- Composición **caracterizada por que** comprende, al menos, un carboxialquil quitosano tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 9.- Composición inyectable **caracterizada por que** comprende, al menos, un carboxialquil quitosano tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 50 10.- Composición farmacéutica **caracterizada por que** comprende, al menos, un carboxialquil quitosano tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 55 11.- Composición de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, **caracterizada por que** se utiliza como una composición farmacéutica inyectable o implantable o una composición farmacéutica apta para la instilación, o como un dispositivo médico inyectable o implantable o un dispositivo médico apto para la instilación.
- 60 12.- Composición de acuerdo con la reivindicación 11 para utilizar en un método de tratamiento terapéutico, por ejemplo, que comprende la instilación o la inyección por vía subcutánea, intradérmica, ocular, intraocular o intraarticular de dicha composición, por ejemplo, para la reparación o el relleno de, al menos, un tejido corporal que requiera una reparación o un relleno.
- 65 13.- Composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizada por que** el tejido corporal se elige entre los tejidos que pertenecen a las cuerdas vocales, músculos, ligamentos, tendones, cartílagos, órganos sexuales, huesos, articulaciones, ojos, dermis, o una cualquiera de sus combinaciones, y más particularmente, en las uniones articulares.
- 14.- Composición para utilizar de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13 **caracterizada por que** el tratamiento es un método de tratamiento de una artrosis, o la reparación de un defecto de cartílago, por ejemplo, por inyección en el fluido sinovial o después de mezclar con sangre e implantación en el cartílago.
- 15.- Dispositivo médico, por ejemplo, implante médico, **caracterizado por que** comprende o consiste en una composición tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14.
- 16.- Procedimiento de preparación de una composición que comprende un carboxialquil quitosano definido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, comprendiendo dicho procedimiento:
 - disolver un carboxialquil quitosano definido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en una solución acuosa, preferiblemente agua, opcionalmente tamponada, preferiblemente a un pH comprendido entre 6,2 y

8,5, y, preferiblemente, entre 6,5 y 7,5;

- opcionalmente, ajustar el pH a un pH deseado, en general al pH fisiológico para la aplicación prevista, por ejemplo, mediante adición de un agente tamponante, una base o un ácido;

- opcionalmente, añadir otros excipientes, tales como, por ejemplo, un azúcar reductor, por ejemplo, sorbitol o manitol;

5 - opcionalmente, ajustar la osmolalidad de la composición.