



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95660 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

A61L 27/00

A61K 8/73 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ІМПЛАНТАТ, ЩО ІН'ЄКТУЄТЬСЯ, ДЛЯ ЗАХИСТУ ДЕРМИ ВІД ВІЛЬНИХ РАДИКАЛІВ, НАБІР У ФОРМІ ШПРИЦА, ЩО МІСТИТЬ ТАКИЙ ІМПЛАНТАТ, ЗАСТОСУВАННЯ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ІМПЛАНТАТУ, СПОСІБ ОТРИМАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ ІМПЛАНТАТУ, КОСМЕТИЧНИЙ СПОСІБ ЗАПОВНЕННЯ ЗМОРЩОК ТА/АБО ДРІБНИХ ЗМОРЩОК

1

(21) a200906920
(22) 06.12.2007
(24) 25.08.2011
(86) PCT/EP2007/063384, 06.12.2007
(31) 06/10645
(32) 06.12.2006
(33) FR
(46) 25.08.2011, Бюл.№ 16, 2011 р.
(72) ПІРО ЕСТЕЛЬ, FR, БОГДАНОВІЧ ПАТРИК, FR
(73) ПЬЕР ФАБР ДЕРМО-КОСМЕТИК, FR
(56) WO 2004/092222 A, 28.10.2004
FR 2733427 A1, 31.10.1996
FR 2778336 A, 12.11.1999
WO 00/27887 A, 18.05.2000
WO 2006/021644 A, 02.03.2006
US 2005/281880 A1, 22.12.2005
WO 2006/097806, 21.09.2006
UA 20134 U; 15.01.2007
UA 73933 C2; 17.10.2005
UA 67880 C2; 15.07.2004
UA 74318 C2; 15.11.2005
UA 82583 C2; 25.04.2008
(57) 1. Імплантат, який є таким, що ін'єктується підшкірно або внутрішньошкірно у формі монофазного гідрогелю, який характеризується тим, що він містить від 0,5 до 5 % мас./мас., переважно від 0,5 до 4 % мас./мас., більш переважно 2 % мас./мас. гіалуринової кислоти, де:
від 50 до 95 % мас./мас., більш переважно від 60 до 90 % мас./мас., найбільш переважно 85 % мас./мас. гіалуринової кислоти знаходиться у формі зшитого гелю,
від 5 до 50 % мас./мас., переважно від 10 до 30 % мас./мас., найбільш переважно 15 % мас./мас. гіалуринової кислоти знаходиться у вільній формі або у формі однієї з її фізіологічно прийнятних солей молекулярної маси між 500 та 2800 кДа, переважно між 750 та 2600 кДа, більш переважно між 800 та 2500 кДа, найбільш переважно між 1000 та 1500 кДа,
у фізіологічно прийнятній рідині-носії.
2. Імплантат, що ін'єктується, за п. 1, який **відрізняється** тим, що гель, одержаний із зшитої гіалу-

2

ринової кислоти, має в'язкість між 200 та 2000 Па·с, переважно між 1000 та 1800 Па·с.

3. Імплантат, що ін'єктується, за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що гіалуринова кислота, яка складає зшитий гель, має молекулярну масу між 1000 та 6000 кДа, переважно між 1000 та 4000 кДа.

4. Імплантат, що ін'єктується, за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що додатково містить хондроїтинсульфат, який має молекулярну масу між 2 та 80 кДа, переважно між 20 та 50 кДа.

5. Імплантат, що ін'єктується, за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що вільна гіалуринова кислота або одна з її фізіологічно прийнятних солей однорідно розподілена всередині гелю зшитої гіалуринової кислоти.

6. Імплантат, що ін'єктується, за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що рідина-носіє являє собою апірогенний стерильний ізотонічний буфер.

7. Імплантат, що ін'єктується, за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що додатково містить щонайменше одну іншу активну речовину, яка застосовується в дермокосметиці.

8. Імплантат, що ін'єктується, за п. 7, який **відрізняється** тим, що дермокосметична активна речовина вибрана з вітамінів, антиоксидантів, неорганічних солей, антисептиків і хондроїтинсульфату.

9. Імплантат, що ін'єктується, за п. 8, який **відрізняється** тим, що антиоксидант являє собою маніт.

10. Набір, який представлений у формі шприца і містить імплантат, що ін'єктується, за будь-яким з пп. 1-9.

11. Застосування гіалуринової кислоти у вільній формі або у формі будь-якої з її фізіологічно прийнятних солей молекулярної маси між 500 та 2800 кДа, переважно між 750 та 2600 кДа, більш переважно між 800 та 2500 кДа, найбільш переважно між 1000 та 1500 кДа, у присутності антиоксиданту, такого як маніт, для виготовлення імплантату, призначеного для захисту дерми від вільних радикалів і/або для обмеження деполімеризації гіалуринової кислоти дерми.

(13) C2

(11) 95660

(19) UA

12. Застосування імплантату, що ін'єкується, за будь-яким з пп. 1-9 або набору за п. 10 для заповнення зморщок, тонких і дрібних зморщок, шкірних западин і/або рубців, яке включає підшкірну ін'єкцію такого імплантату.

13. Застосування гіалуронової кислоти у вільній формі або у формі будь-якої з її фізіологічно прийнятних солей молекулярної маси між 500 та 2800 кДа, переважно між 750 та 2600 кДа, більш переважно між 800 та 2500 кДа, найбільш переважно між 1000 та 1500 кДа, розподіленої в гелі зшитой гіалуронової кислоти, для виготовлення підшкірного імплантату, призначеного для заповнення зморщок і для стимуляції епідермальної клітинної активності і/або для підтримки механічних властивостей щільності та еластичності шкіри, і/або стимуляції епідермального і дермального метаболізму, і/або для стимуляції антиоксидантної активності дерми, і/або запобігання старінню шкіри.

14. Косметичний спосіб заповнення зморщок і/або дрібних зморщок, при якому ін'єктують щонайменше один імплантат, що ін'єкується, за будь-яким з пп. 1-9.

15. Спосіб одержання імплантату, що ін'єкується, за будь-яким з пп. 1-9, який характеризується тим, що включає наступні стадії:

1) приготування зшитого гелю відповідно до наступних стадій:

додавання гіалуронової кислоти до основної рідини,

набухання, гомогенізація при повільному перемішуванні і зшивання при нагріванні,

нейтралізація і набухання зшитого гелю в буферному розчині при рН приблизно 7 при додаванні агента, що надає ізоосмолярність,

видалення зшиваючого агента,

2) приготування гелю вільної гіалуронової кислоти шляхом:

додавання гіалуронової кислоти до буферного розчину з рН приблизно 7, ізоосмолярного;

набухання,

3) змішування зшитого гелю, одержаного на стадії 1), з гелем вільної гіалуронової кислоти, одержаним на стадії 2),

4) можлива дегазація і можлива упаковка в пляшечки або шприци, і подальша стерилізація.

Даний винахід стосується імплантатів на основі гіалуронової кислоти, які можуть бути ін'єктовані підшкірно або внутрішньошкірно.

Гіалуронова кислота (ГК) в її кислотній формі або у формі солі (гіалуронату) є основним компонентом позаклітинного матриксу. Вона, зокрема, представлена в сполучних тканинах, які називаються "м'якими", на противагу іншим глікозаміногліканам, таким як хондроїтинсіркова кислота, присутня в тканинах, які називаються «твердими», таких як хрящ. Таким чином, вона знаходиться в значних кількостях в шкірі.

ГК являє собою лінійний нессульфатований глікозаміноглікан, який складається з ланок D-глюкуронової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміну, які повторюються, (Tammi R., Agren U.M., Tuhkanen A.L., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. *Progress in Histochemistry & Cytochemistry*. 29(2): 1-81, 1994).

У нормальній шкірі ГК синтезується, в основному, дермальними фібробластами та епідермальними кератиноцитами (Tammi R., *цит. вище*). За рахунок негативно заряджених залишків ГК відіграє роль водного насоса, що дає можливість підтримки еластичності шкіри. ГК відіграє головну роль в регуляції дифузії нутрієнтів гормонів, вітамінів та неорганічних солей сполучної тканини і у виведенні відходів метаболізму, здатних до індукції запальних реакцій. З віком кількість ГК і ступінь її полімеризації зменшується, приводячи в результаті до зменшення кількості води, що утримується в сполучній тканині. Потім шкіра зазнає процесу старіння, який призводить до підвищення фіброзу і до падіння вмісту еластичних волокон. У нормальній шкірі людини ГК існує у формі високомолекулярного полімеру (600000-1000000 Да). Фізіологічний розпад ГК в шкірі відбувається за допомогою (i) інтерналізації кератиноцитами і (ii) внутрішньоклі-

тинної фрагментації гіалуронідазами на фрагменти проміжного розміру (600000-300000 Да). Фрагментована ГК вивільняється кератиноцитами, перетинає базальну мембрану і вивільняється безпосередньо в лімфатичні судини (Tammi R. et al., *цит. вище*).

Роль гіалуронової кислоти (ГК) у дерматології добре відома в різних сферах, включаючи загоєння ран і гідратацію. Гіалуронова кислота найчастіше діє за допомогою її взаємодій із зв'язуючими білками і, зокрема, з трансмембранним рецептором CD44 (Tool B.P. 2001, *Sem. Cell. Devel. Biol.* 12: 79-87, Liao Y-H., Stuart A.J., *Drug Delivery*, 12: 327-342, 2005). Активація цього рецептора виражається через його роль в морфогенезі, в розмноженні і проліферації клітин, в ангіогенезі і в міграції клітин (G. Weindl, M. Schaller, *Skin Pharm. Physiol.* 2004; 17: 207-213). Дані, наведені в літературі, дозволяють передбачити, що ці різні дії є функцією клітинного оточення, молекулярної маси гіалуронової кислоти та її концентрації. Наприклад, більш високі молекулярні маси інгібують ангіогенез, тоді як олігосахариди стимулюють його.

У Японській патентній заявці JP 11279042 продемонстрована відповідна дія сульфатованих фрагментів гіалуронової кислоти (ФГК) (молекулярної маси між 1 та 50 кДа), які могли б дати можливість підтримки еластичності шкіри та уникнути кератинізації.

У нещодавньому дослідженні, проведеному на фрагментах гіалуронової кислоти (молекулярної маси між 50 та 750 кДа) відповідно, продемонстроване посилення синтезу гіалуронової кислоти кератиноцитами (патентні заявки FR 2865651. WO 2005 082327). Ця проліферативна активність індукована ФГК точних молекулярних мас, тобто ця активність не виявляється при більш високих або більш низьких молекулярних масах.

В галузі косметології існують різні ін'єкційні препарати, основані на гіалуронової кислоти. У мезотерапії застосовують розчини вітамінів, антиоксидантів, неорганічних солей або гіалуронової кислоти. Вітаміни присутні для стимуляції і підтримки клітинного метаболізму, і, таким чином підсилюють продукування колагену, антиоксиданти борються проти старіння, а неорганічні солі незамінні для клітинних ферментативних активностей. Ролью гіалуронової кислоти є забезпечення можливості підтримки об'єму і гідратації шкіри і створення захисного екрану проти руйнівних дій вільних радикалів (H. Trommer, S. Wartewig, *Int. Journ. Of Pharm.* 254 (2003) 223-234). При достатніх концентраціях гіалуронова кислота створює оптимальне навколишнє середовище для клітинної проліферації і нового синтезу колагену.

Окиснювальний стрес, що генерує вільні радикали в дермі та епідермісі, відповідальний за старіння шкіри і появу зморшок, дрібних і тонких зморшок і провисання тканин.

Крім того, також продемонстровано, що вільні радикали також відповідальні за деполімеризацію гіалуронової кислоти *in situ*, яка вносить додатковий вклад у провисання тканин та їх передчасне старіння (Mendoza G., et al., *Carbohydrate Research* 342, 2007, 96-102).

Позаклітинний матрикс (ПКМ) представляє собою динамічну структуру, яка відіграє структурну і регуляторну роль для тканин. ПКМ складається з волокон колагену та еластину, а також з основного середовища (головним чином, води, мінеральних солей та однакогліканів). Цей матрикс надає шкірі її пружність та її механічні властивості щільності, еластичності та тону.

Макромолекулами колагену є фібрилярні білки, утворені з трьох поліпептидних ланцюгів, зшитих ковалентними і водневими зв'язками. Відомо дев'ятнадцять типів колагену, де половина з них знаходиться в шкірі. Більшість шкірних колагенів належать до фібрилярних колагенів I, III та V.

У молодих повнолітніх склад дерми на 80% складає колаген типу I та на 20% колаген типу III; однак, це співвідношення змінюється з віком як наслідок старіння.

Еластини являють собою білки, організовані у волокна всередині шкіри, і вони надають шкірі властивості еластичності і гнучкості. Ці еластини збагачені амінокислотами гідрофобного характеру.

Розпад ПКМ бере участь під час деяких фізіологічних процесів, таких як загоєння рани, ембріональний розвиток або ангиогенез, а також в патологічних ситуаціях, таких як артрит, атероз або атеросклероз, і, безумовно, під час фаз прогресування пухлини з утворенням метастазів (Fisher et al., 1997. *N England J. Med.*, 337, 1419-28; Shapiro, 1998. *Current Opinions in Cell Biology*, 10, 602-608).

Компоненти ПКМ, головним чином, розщеплюються ферментами ендопептидазами, які називаються матриксними металопротеїнами або MMP. Ці MMP вносять активний вклад у процес загоєння рани, а також вносять вклад у релаксацію шкіри і появу зморшок, які є першими ознаками старіння шкіри. Сімейство MMP складається приблизно з 22 ферментів, які розрізняють за специфі-

чністю по відношенню до субстрату, який вони розщеплюють.

MMP-1, або інтерстиціальна колагеназа, переважно розщеплює потрібну спіраль фібрилярних колагенів типу III, але також колагени I, II, VII, VIII та X.

MMP-3 розщеплює глікопротеїни, такі як фібронектин і ламінін, деякі однакоглікани, еластин, желатин і колаген IV та V. Ці два MMP експресуються як кератиноцитами, так і фібробластами.

Для заповнення зморшок гелі хімічно зшиті ГК ін'єктують внутрішньошкірно для заповнення западини, викликані зморшкою. Зшивання дає можливість підвищити стійкість препарату всередині дерми. Таким чином, якщо препарат правильно ін'єктований відповідно до генетичного профілю кожної людини, цей препарат дає можливість заповнення протягом 4-6 або навіть 8 місяців. Потім він зазнає повної резорбції в дермі.

Такі гелі на основі ГК або зшиті ГК, дають можливість зменшення зморшки за рахунок ефекту механічного заповнення в шкірній западині, яка є результатом цієї зморшки. Ці препарати наділені лише цим механічним ефектом і жодним чином не вносять вклад ні у профілактику, ні у лікування відносно старіння шкіри і руйнування ПКМ, суттєвого для підтримки механічних властивостей шкіри, таких як її еластичність та її щільність. Такі імплантати, якщо вони дають можливість видалення зморшок або тонких і дрібних зморшок, створюють ефект, який обмежений за часом і який лише частково маскує ефекти властивого шкірі старіння, що стосується підтримуючих структур, представлених ПКМ.

До цього часу декілька препаратів застосовують в даній галузі. Гелі або силіконові масла є простими для застосування, але вони мають недолік внаслідок міграції у тканини, розташовані безпосередньо внизу від точок ін'єкції. Таким чином, в результаті виникають хронічні запальні явища або алергічні реакції. Крім того, силікон не є таким, що біорозкладається, та опиняється в деяких органах, таких як печінка. Запропоновані також різні суспензії полімерних частинок, але більшість викликали реакції відторгнення, інфекції або запалення. Нарешті, протягом останніх декількох років застосовують колагенові суспензії. Однак, колаген зазнає резорбції відносно швидко (між 1 та 3 місяцями) і викликає деякі алергічні реакції завдяки своєму походженню, оскільки він, як правило, має бичаче або свиняче походження.

Зберігається необхідність в імплантатах, що ін'єктуються, здатних здійснювати функцію як заповнення зморшок, так і відновлення життєво важливих функцій дерми та епідермісу і вносити вклад у обмеження процесів клітинного старіння, що супроводжує старіння шкіри, в яких, відсутні вищезазначені недоліки, або вони набагато менше виражені, причому все це супроводжується простотою і підвищеною зручністю при застосуванні.

Даний винахід, таким чином, стосується підшкірно або внутрішньошкірно імплантату, що ін'єктуються, у формі монофазного гідрогелю, який характеризується тим, що він містить від 0,5% до 5%

мас/мас, переважно, від 0,5% до 4%, більш переважно, 2% гіалуронової кислоти, і в якому:

- від 50% до 95%, переважно, від 60% до 90%, навіть, більш переважно, 85% мас/мас гіалуронової кислоти знаходиться у формі зшитого гелю;

- від 5% до 50%, переважно, від 10% до 30%, навіть, більш переважно, 15% мас/мас гіалуронової кислоти знаходиться у вільній формі або у формі однієї з фізіологічно прийнятних солей ГК молекулярної маси між 500 та 2800 кДа, переважно, між 750 та 2600 кДа, більш переважно, між 800 та 2500 кДа, навіть, більш переважно, між 1000 та 1500 кДа,

у фізіологічно прийнятній рідині-носії, де відношення між масою гелю зшитої гіалуронової кислоти і масою вільної гіалуронової кислоти становить між 1:1 та 1:0,05.

У конкретному втіленні винаходу імплантат може містити приблизно 80% зшитої гіалуронової кислоти і приблизно 20% вільної гіалуронової кислоти, що принципово важливо в контексті застосування імплантату згідно з винаходом для лікування тонких і дрібних зморшок. У випадку лікування глибоких зморшок кількість зшитої гіалуронової кислоти повинна, переважно, становити приблизно 85%, а кількість вільної гіалуронової кислоти приблизно 15%.

У контексті даного винаходу гіалуронову кислоту або ГК визначають як несультатований лінійний глікозаміноглікан, що складається з ланок D-глюкуронової кислоти і N-ацетил- D-глюкозаміну, які повторюються.

Монофазний гідрогель означає гідрогель в одній однорідній фазі.

Фізіологічно прийнятна сіль гіалуронової кислоти означає, зокрема, натрієві і калієві солі, а також їх суміші. Переважно сіль являє собою натрієву сіль.

Переважно, гель, виготовлений із зшитої гіалуронової кислоти згідно з винаходом, має в'язкість між 200 та 2000 Па·с, більш конкретно між 500 та 1800 Па·с, навіть більш конкретно між 1000 та 1800 Па·с.

У випадку імплантату для лікування глибоких зморшок, тобто який містить 85% зшитої гіалуронової кислоти, в'язкість останнього встановлюють близько 1000-1500 Па·с, зокрема, близько 1200 Па·с. У випадку імплантату, в основному, для неглибоких зморшок, отже, з меншим вмістом зшитої гіалуронової кислоти, тобто приблизно 80% зшитої гіалуронової кислоти, в'язкість такого імплантату встановлюють близько 200-500 Па·с, більш конкретно близько 350 Па·с.

У даному описі вказана в'язкість відповідає значенням, виміряним для швидкості зсуву 0,01 с⁻¹.

Переважно, зшита гіалуроновна кислота, яка складає гель згідно з винаходом, має молекулярну масу між 1000 та 6000 кДа, більш переважно, між 1000 та 4000 кДа.

Згідно з переважним аспектом винаходу імплантат, що ін'єктується, також містить хондроїтинсульфат.

Переважна кількість хондроїтинсульфату становить між 0,05% та 5% мас/мас від сумарної маси.

Переважно, хондроїтинсульфат має молекулярну масу між 2 та 80 кДа, більш переважно, між 20 та 50 кДа.

Імплантат згідно з винаходом може містити різні загальноприйняті домішки. Для прикладу можна згадати барвники, барвні пігменти, рослинні олії, загусники, модифікатори pH і регулятори осмотичності.

Вільна гіалуроновна кислота або одна з її фізіологічно прийнятних солей, переважно, розподілена гомогенно всередині гелю зшитої гіалуронової кислоти.

Рідина-носіє, переважно, являє собою апірогенний стерильний ізотонічний буфер.

Імплантат, що ін'єктується, згідно з винаходом також, переважно, містить щонайменше одну іншу активну речовину, яка застосовується в дермокосметичці.

Переважно, дермокосметична активна речовина вибрана з вітамінів, антиоксидантів, неорганічних солей, антисептиків та хондроїтинсульфату.

У конкретному втіленні винаходу імплантат, що ін'єктується, містить маніт, який діє як антиоксидант на рівні дерми і вносить вклад у захисті ГК від деполімеризації, що індукується вільними радикалами, які генеруються всередині дерми в результаті окиснювального стресу. Дійсно, описано, що поєднання маніту з ГК покращує захист проти пошкодження, що індукується вільними радикалами (Belda et al., 2005, J. Cataract Refract. Surg., 31: 1213-1218). Таким чином, наступним аспектом даного винаходу є розробка імплантату, що ін'єктується, як визначено вище, і який містить маніт як антиоксидант.

Інший аспект даного винаходу полягає у застосуванні маніту в імплантаті, що ін'єктується, згідно з даним винаходом в цілях захисту дерми від вільних радикалів і/або обмеження деполімеризації гіалуронової кислоти, яка міститься в ньому.

Винахід, таким чином, також стосується застосування гіалуронової кислоти у вільній формі або у формі однієї з її фізіологічно прийнятних солей молекулярної маси між 500 та 2800 кДа, переважно, між 750 та 2600 кДа, більш переважно, між 800 та 2500 кДа навіть, більш переважно, між 1000 та 1500 кДа у присутності антиоксиданту, такого як маніт, для виготовлення імплантату, призначеного для захисту дерми від вільних радикалів і/або для обмеження деполімеризації гіалуронової кислоти дерми і/або для запобігання старінню шкіри.

Імплантат згідно з даним винаходом ін'єктують в поверхневу, середню або глибоку дерму.

Перевага його становить здатність викликати у момент ін'єкції активацію фібробластів шляхом стимуляції клітинної проліферації і нового синтезу колагену. Потім активація фібробластів створює модуляцію механізмів, залучених в ремоделювання позаклітинного матриксу, яке виражено у відновленні життєво важливих функцій дерми.

Подвійна перевага імплантату згідно з даним винаходом полягає в одержанні безпосереднього і

негайного ефекту зменшення зморшки в результаті механічного заповнення шкірної западини і непрямого ефекту протягом тривалого терміну клітинної регенерації за допомогою стимуляції синтезу колагену і регуляції MMP.

Зшита гіалуронова кислота вносить вклад безпосередньо у ефект механічного заповнення і дає можливість, за допомогою її зшитої природи, одержати такий ефект тривало протягом тривалих періодів, ніж не зшита ГК.

Крім того, вільна ГК, яка міститься в імплантаті згідно з винаходом, інгібує гіперекспресію MMP-1, а також гіперекспресію колагену III. Окрім цієї її регуляторної дії на MMP-1 вона вносить вклад в обмеження деструктуризації і руйнування ВМК, незамінної структури для підтримки механічних властивостей щільності та еластичності шкіри.

Крім того, продемонстровано, що співвідношення колаген III/колаген I підвищується під час старіння шкіри (Weber et al., 1984, J. Invest. Dermatol., 82, 156-60). Знаючи, що в контексті даного винаходу спостерігали, що фракція вільної ГК, яка використовується в імплантаті згідно з винаходом, інгібує експресію колагену типу III, не впливаючи на експресію колагену типу I, розумно вважати, що імплантат згідно з винаходом здатний до відновлення співвідношення колаген III/колаген I до співвідношення, виміряного в молодих тканинах.

Таким чином, метою даного винаходу є застосування імплантату згідно з даним винаходом для виготовлення лікарського засобу, призначеного для підтримки і/або відновлення співвідношення колаген III/колаген I до співвідношення, виміряного в молодих тканинах.

Наслідком поєднання вільної ГК молекулярної маси між 500 та 2800 кДа з гелем зшитої ГК є негайна гідратація і підтримка об'єму шкіри. Крім того, воно індукує активацію фібробластів дерми, в основному, завдяки присутності вільної ГК і ця активація фібробластів пролонгована за часом у міру прогресування *in vivo* розкладання гелю зшитої ГК.

Імплантат згідно з даним винаходом може бути представлений у вигляді тривимірної сітки, виготовленої із зшитої ГК, яка містить всередині неї молекули вільної ГК, здатні до індукції стимуляції фібробластів, інгібування розпаду ПКМ за допомогою інгібування MMP і регуляції синтезу колагену за допомогою орієнтації останнього у напрямку стану, який відповідає тому, що спостерігається в молодій тканині.

Ці молекули вільної ГК прогресивно вивільняються з цього тривимірного матриксу зшитої ГК у міру пасивної дифузії за допомогою розпаду з часом матриксу зшитої ГК протягом тижнів і місяців після ін'єкції. Це прогресуюче вивільнення дає можливість такої омолоджувальної дії стимуляції клітин *in situ* цими молекулами вільної ГК, які захищені від біологічного розкладання всередині вказаного матриксу протягом декількох тижнів, і можуть, отже, здійснювати свою дію протягом тривалішого періоду, ніж при ін'єкції їх одних.

Таким чином, даний винахід також стосується застосування гіалуронової кислоти в її вільній формі

або у формі однієї з її фізіологічно прийнятних солей, молекулярної маси між 500 та 2800 кДа, переважно, між 750 та 2600 кДа, більш переважно, між 800 та 2500 кДа, навіть, більш переважно, між 1000 та 1500 кДа, розподіленої всередині гелю зшитої гіалуронової кислоти, для виготовлення підшкірного імплантату для заповнення зморшок і стимуляції епідермальних клітин і/або підтримки механічних властивостей щільності та еластичності шкіри.

Таким чином, імплантат згідно з винаходом об'єднує механічний ефект зшитого гелю, який набухає і відновлює форму зморшки, з біологічною дією вільної ГК.

Винахід також стосується набору у формі шприца, який містить імплантат, що ін'єктується, такий як описано вище.

Винахід також стосується імплантату, як описано вище, як ліків.

Винахід також стосується застосування імплантату, що ін'єктується, як описано вище, для заповнення зморшок, тонких і дрібних зморшок, шкірних западин і/або рубців, що включає підшкірну ін'єкцію такого імплантату.

Імплантат, що ін'єктується, згідно з винаходом можна застосовувати для виготовлення ліків, призначених для стимуляції епідермального і дермального метаболізму і/або для стимуляції епідермальної клітинної активності.

Імплантат, що ін'єктується, згідно з винаходом можна застосовувати для виготовлення ліків, призначених для стимуляції антиоксидантної активності дерми і/або запобігання старінню шкіри.

Винахід також стосується косметичного способу заповнення зморшок і/або дрібних зморшок, при якому ін'єктують щонайменше один ін'єкційний імплантат згідно з винаходом.

Винахід також стосується способу виготовлення імплантату, що ін'єктується, як описано вище. Він може бути виготовлений за допомогою будь-якої методики, відомої фахівцям в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою дієпокси, зокрема, бутандіолдигліцидилового ефіру (BDDE) або 1,2,7,8-дієпоксиктану. При зшиванні в базовому середовищі концентрація дієпокси може варіювати, наприклад, між 5 та 15% по відношенню до гіалуронової кислоти для зшивання на водяній бані при 45-55°C протягом 1,5-6 годин. Потім зшитий гель очищають за допомогою класичних методик фахівців в даній галузі техніки: різних бань з деіонізованою водою, спиртового осадження, діалізу і так далі для видалення слідів залишкового зшиваючого агента. До цього очищеного гелю додають ГК відповідної молекулярної маси, заздалегідь гідратовану у відповідному буфері. Нарешті, готовий продукт дегазують, поміщають в шприц або будь-який інший підходящий контейнер і стерилізують автоклавуванням.

Переважає методика згідно з винаходом включає наступні стадії:

1) приготування зшитого гелю відповідно до наступних стадій:

- додавання гіалуронової кислоти до основної рідини,

- набухання, гомогенізація при повільному перемішуванні і зшивання при нагріванні,

- нейтралізація і набухання зшитого гелю в буферному розчині при рН приблизно 7 при додаванні агента, надаючого ізоосмомолярність,

- видалення зшиваючого агента,

2) приготування гелю вільної гіалуронової кислоти шляхом:

- додавання гіалуронової кислоти до буферного розчину з рН приблизно 7, ізоосмомолярного;

- набухання,

3) змішування зшитого гелю, одержаного на стадії 1), з гелем вільної гіалуронової кислоти, одержаним на стадії 2),

4) можлива дегазація і можлива упаковка в пляшечки або шприци, а потім стерилізація.

Переважаю рН гелю після стерилізації дорівнює приблизно 7, і осмомолярність становить близько 250-350 мОсм, переважно, між 300 та 320 мОсм.

Далі винахід проілюстрований, не обмежуючи його, наведеними нижче прикладами.

Приклад 1:

Характеристика активності ГК різних молекулярних мас на:

- здорових фібробластах;

- старіючих фібробластах (за допомогою окиснювального стресу H_2O_2).

MMP-1 (колагеназа 1) являє собою інтерстиціальну колагеназу, яка розщеплює потрібну спіраль фібрилярних колагенів, таких як колагени I та III. У шкірі вона експресується і секретується фібробластами та кератиноцитами. MMP-1 залучена у старіння. Дійсно, її надпродукція в процесі старіння може бути залучена у втрату щільності та еластичності і в появу зморшок. Коли старіння індуковане H_2O_2 , у фібробластах спостерігають значне підвищення MMP-1. Основні активні речовини, здатні до зниження цієї надпродукції, отже, можуть мати властивості «проти старіння».

Фібробласти були одержані зі шкіри, яка має походження із залишків операційної від молодих суб'єктів. Зразки промивали у ФСБ та етанолі. Нарізували маленькі шматочки шкіри, розподіляли по культуральних чашках і занурювали в середовище, сприятливе для проліферації фібробластів (DMEM + 10% SVF). У це середовище додавали приміцин. Останній є антибіотиком, протигрибковим засобом і засобом проти мікоплазми. Культуральні чашки поміщали в інкубатор.

Для індукції старіння фібробласти висівали в культуральні чашки. Через 24 години додають тестовану активну речовину при підходящій концентрації до DMEM. Після 24 інкубації клітини піддають окиснювальному стресу. Клітини інкубували протягом 2 годин при 37°C в 75 мкм розчині H_2O_2 у ФСБ. Залучений гострий стрес, який викликає старіння клітин. Потім фібробласти знову поміщали в повне середовище DMEM з 10% SVF. Фібробласти повертають до старіння через 72 години після закінчення стресу.

1.1. Протокол інкубації

Для старіючих фібробластів: ГК додають до кінцевої концентрації 1 мкг/мл, їх залишають протягом стресу H_2O_2 тобто 24 годин інкубації.

Для здорових фібробластів: ГК також інкубують протягом 24 годин при 1 мкг/мл.

1.2. Виділення сумарної РНК за допомогою набору для виділення Rneasy (Qiagen) в кінці експерименту (доба 5, тобто 72 годин після стресу).

1.3. Аналіз сумарної РНК

Якісний і кількісний аналіз сумарних РНК проводять за допомогою аналітичного набору RNA 6000 Nano LabChip та апарату Bioanalyzer 2100 (Agilent). Він оснований на принципі електрофоретичної міграції зразків в наночипі. Обчислюють відношення рибосомних РНК 28S/18S; воно є інформативним при оцінці цілісності РНК. Крім того, оцінюють чистоту РЕК відносно геномної ДНК.

1.4. Аналіз швидкості транскрипції за допомогою ПЦР в реальному часі

ПЦР в реальному часі дає можливість кількісно визначити рівень експресії транскрипції гена, що цікавить, шляхом ампліфікації кДНК, одержаних шляхом зворотної транскрипції мРНК гена, присутніх в клітинному лізаті. Реакційну суміш готують з кДНК і суміші групи праймерів, що цікавлять, з розчином IQ SybrGreen Supermix (Biorad), який містить, серед іншого, Taq полімерази та інтеркалюючий агент малої борозенки подвійної спіралі ДНК: Sybr Green (флуоресцентний інтеркалюючий агент). Реакцію проводять в термоциклері iCycler IQ (Biorad); залучена послідовність циклів денатурації/гібридизації/елонгації.

1.4.1. Зворотна транскрипція: сумарні РНК "зворотно транскрибують" на кДНК за допомогою Reverse Transcription System (Promega) і Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

1.4.2. Вимірювання швидкості транскрипції гена, що цікавить: рівень експресії гена, що цікавить, нормалізують за рівнем експресії еталонних генів, який мало варіює при старінні. Рівень експресії гена, що цікавить, обчислюють відповідно до формули: $2^{-(CT_{\min} - CT)}$, де CT означає "поріг циклу".

Рівень експресії нормалізують по відношенню до експресії трьох вибраних еталонних генів згідно з обчисленням: $2^{-(CT_{\min} - CT)} / \text{коефіцієнт нормалізації}$.

1.5. Результати за експресією MMP-1

Фібробласти, піддані старінню шляхом інкубації з H_2O_2 , експресували в 2,14 разів більше MMP-1, ніж нормальні фібробласти (таким чином, старіння правильно індуковане). У присутності вітаміну E (позитивний контроль) гіперекспресія MMP-1 старіючими фібробластами була знижена на 40%.

Гіперекспресія MMP-1 була знижена на 40% у присутності ГК 450 кДа (10 мкг/мл), на 75% у присутності ГК 800 кДа (10 мкг/мл), на 71% у присутності ГК 1500 кДа (10 мкг/мл) і на 83% у присутності ГК 2600 кДа (10 мкг/мл).

1.6. Результати за експресією колагену типу I і типу III.

У фібробластах, підданих старінню шляхом інкубації з H_2O_2 , було виміряно варіабельне інгібування транскрипції колагену типу I; таке інгібування здавалося, однак, залежним від донорів. На одному з донорів, для якого транскрипція типу I була інгібована на 24% стресом H_2O_2 , різні ГК різних розмірів не відновлювали синтез колагену.

У фібробластах, підданих старінню, було виміряно підвищення +163% - +304% транскрипції колагену типу III. На донорі, для якого транскрипція колагену типу III стимульована на +304% стресом H_2O_2 , вільні ГК різних розмірів інгібують синтез колагену. ГК 450 кДа інгібує приблизно на 25% тоді як ГК маси, більшої, ніж 800 кДа, інгібує транскрипцію приблизно на 100%, повертаючи її до рівнів, близьких до рівнів молодих фібробластів.

1.7. Висновок.

Висновок цього експерименту полягає в тому, що виявляється, що ГК має анти-MMP-1 активність (отже, антиоксидантну, таким чином, маючи потенційну активність проти старіння) в даній моделі індукованого старіння. ГК більш високої молекулярної маси (800, 1500 та 2600 кДа) виявляються більш ефективними, ніж ГК 450 кДа.

У даних експериментальних умовах ГК молекулярної маси 450 кДа активні відносно MMP-1. ГК молекулярної маси вище, ніж 800 кДа, більш активні, оскільки вони інгібують гіперекспресію від -75 до -83%.

З іншого боку, ці результати показують, що різні вільні ГК не діють на синтез колагену типу I.

Нарешті, вільні ГК інгібують гіперекспресію колагену типу III, і це особливо помітно для ГК молекулярної маси 800 кДа і вище, яка інгібує гіперекспресію від -118 до -93%.

Таким чином, додатково до їх регуляторної дії на MMP-1, вільні ГК, які містяться в імплантаті згідно з даним винаходом, вносять вклад в обмеження руйнування і реструктуризації ПКМ. Крім того, знаючи, що було продемонстроване, що відношення колаген III/колаген I підвищується в процесі старіння, ГК, які містяться в імплантаті згідно з винаходом, дають можливість відновити співвідношення, виміряне в молодих тканинах.

Приклад 2: Приготування імплантату згідно з винаходом.

2.1. Приготування зшитої ГК

5 г гіалуронату натрію молекулярної маси 1,6 МДа додають до 1% гідроксиду натрію (35,6 г). Суміш залишають для періодичної гомогенізації протягом 1 години і 30 хвилин. Потім до суміші ГК/NaOH, яка була гомогенізована, додають 315 мг BDDE, закривають, а потім поміщають у водяну баню при 50 °C на 2 годин. Суміш нейтралізують додаванням 5 г 1 н. HCl.

Гель, одержаний таким чином, додавали при бажаній концентрації шляхом додавання EDI і солей, забезпечуючих ізоосмолярність, а також стабільний нейтральний pH із одержанням гелю при 20 мг/г за ГК.

2.2. Приготування імплантату

До даного очищеного гелю додають ГК 1,2 МДа, заздалегідь гідратовану у фосфатному буфері. Потім 60 г гелю ГК 1,2 МДа концентрації 20 мг/г додають до 226 г одержаного зшитого гелю. Ці 2 гелі гомогенізують у стандартному лопатевому змішувачі протягом 1-2 годин.

Кінцевий продукт можна потім дегазувати, упаковувати в шприци і стерилізувати паровим автоклавуванням шляхом виконання циклу, наприклад, 125 °C протягом 7 хв., 127 °C протягом 4 хв. або 130 °C протягом 3 хв.

Після стерилізації pH препарату становить 7,1, осмолярність 320 мОсм, і реологічні характеристики дають модуль пружності G' 45 Па·с при частоті 1 Гц. Кінцеву концентрацію гелю оцінюють як 19,8 мг/г (аналіз з карбазолом відповідно до методики Європейської Фармакопеї) для очікуваної концентрації 20 мг/г.