



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C08B 37/0072 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015118969, 24.10.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.10.2013

Дата регистрации:
14.05.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.10.2012 FR 1260146

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2016 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 14.05.2018 Бюл. № 14

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 25.05.2015

(86) Заявка РСТ:
IV 2013/059607 (24.10.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/064632 (01.05.2014)

Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов
и партнёры"

(72) Автор(ы):

БУРДОН Франсуа (FR),
МЕНЬЕ Стефан (FR)

(73) Патентообладатель(и):
ТЕОКСАН (CH)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2011135150 A1, 03.11.2011. WO
2012008722 A3, 19.01.2012. RU 2230752 C2,
20.06.2004.

(54) ДЕРМАЛЬНАЯ ИНЪЕЦИРУЕМАЯ СТЕРИЛЬНАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к гелю на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты. Гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты получают в результате поперечного сшивания гиалуроновой кислоты или ее соли в присутствии по меньшей мере эффективного количества по меньшей мере одного эндогенного полиамина в качестве поперечно сшивающего агента. Причем поперечное сшивание проводят в присутствии по меньшей мере одного активатора или в присутствии по меньшей мере одного активатора в сочетании с по меньшей мере одним вспомогательным агентом реакции

сочетания для проведения реакции ковалентного сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых) эндогенного(ых) полиамина(ов). Указанный гель имеет степень модификации меньше чем или равную 1%, причем степень модификации представляет собой соотношение числа молей эндогенного полиамина, присоединенного к гиалуроновой кислоте, и числа молей гиалуроновой кислоты, образующей указанный поперечно сшитый гель. Изобретение позволяет получить гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты с наименьшей степенью модификации, но с

удовлетворительными механическими свойствами
и высокой устойчивостью к стерилизации. 6 н. и

13 з.п. ф-лы, 4 табл., 2 пр.

R U 2 6 5 3 7 2 9 C 2

R U 2 6 5 3 7 2 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C08B 37/0072 (2006.01)

(21)(22) Application: **2015118969, 24.10.2013**
(24) Effective date for property rights:
24.10.2013
Registration date:
14.05.2018
Priority:
(30) Convention priority:
24.10.2012 FR 1260146
(43) Application published: **20.12.2016** Bull. № 35
(45) Date of publication: **14.05.2018** Bull. № 14
(85) Commencement of national phase: **25.05.2015**
(86) PCT application:
IB 2013/059607 (24.10.2013)
(87) PCT publication:
WO 2014/064632 (01.05.2014)
Mail address:
191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov i partnery"

(72) Inventor(s):
**BURDON Fransua (FR),
MENE Stefan (FR)**
(73) Proprietor(s):
TEOKSAN (CH)

(54) **DERMAL INJECTABLE STERILE COMPOSITION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.
SUBSTANCE: present invention relates to a crosslinked hyaluronic acid gel. Crosslinked hyaluronic acid gel is derived from the crosslinking of hyaluronic acid or a salt thereof in the presence of at least an effective amount of at least one endogenous polyamine as a crosslinking agent. Said crosslinking is carried out in the presence of at least one activator or in the presence of at least one activator in combination with at least one auxiliary coupling agent for carrying out a covalent coupling reaction of said hyaluronic acid and

said endogenous polyamine(s). Said gel has a degree of modification of less than or equal to 1%, the degree of modification being the ratio between the number of moles of endogenous polyamine attached to the hyaluronic acid and the number of moles of hyaluronic acid forming said crosslinked gel.

EFFECT: invention enables to obtain a crosslinked hyaluronic acid gel with the lowest degree of modification, but with satisfactory mechanical properties and high resistance to sterilisation.

19 cl, 4 tbl, 2 ex

RU 2 653 729 C 2

RU 2 653 729 C 2

Настоящее изобретение относится к области стерильных инъеклируемых композиций на основе гиалуроновой кислоты или ее соли и предназначенных для лечения дефектов и изъянов кожи.

5 Гиалуроновая кислота, которая в природе присутствует в коже, известна своими вязкоупругими свойствами и также своей очень высокой склонностью абсорбировать воду. Ее свойства в значительной степени способствуют эластичности кожи.

Принимая во внимание ее свойства и ее качества биологической совместимости, устойчивости и отсутствия токсичности, данное соединение, таким образом, использовали на протяжении более чем 10 лет во многих приложениях в областях 10 медицины и косметологии и, в частности, эстетических процедурах.

Таким образом, гиалуроновую кислоту используют для заполнения морщин и для снижения или даже устранения локального ослабления структуры дермы, представленного морщиной или угнетенным состоянием кожи, обычно посредством 15 прямой инъекции в дерму, в рассматриваемой области.

Немодифицированная гиалуроновая кислота обладает прекрасной биосовместимостью и идентична эндогенной гиалуроновой кислоте.

Однако гиалуроновую кислоту по существу используют в форме геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, и, как следствие, в модифицированной форме, принимая во внимание повышенную устойчивость данной конкретной формы к 20 деградации, высоким температурам и вследствие этого - к стерилизации.

Данные гели на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты могут быть получены разными способами. Обычно в данных способах требуются две главные стадии, причем первая заключается в гидратировании гиалуроновой кислоты для ее превращения в водный гель, и вторая нацелена на поперечное сшивание указанного 25 водного геля в присутствии агента, способного вызывать его поперечное сшивание (также называемый «поперечно сшивающим агентом»). Данный агент обычно выбран из эпоксида, альдегида, полиазиридила и дивинилсульфона (DVS) или бутандиолдиглицидилового эфира (BDDE), и вследствие этого является синтетическим по природе.

30 В качестве иллюстрации данных способов можно, в частности, упомянуть способы, описанные в документах US 2006/0105022, WO 2006/056204 и US 2007/0036745.

Поперечно сшитые гели, представленные в настоящее время в продаже и полученные с помощью традиционных поперечно сшивающих агентов, обычно имеют степени модификации выше чем 4% или даже степени модификации вплоть до 10%.

35 В целях настоящего изобретения подразумевается, что термин «степень модификации» обозначает соотношение числа молей поперечно сшивающего агента, присоединенного к гиалуроновой кислоте, и числа молей гиалуроновой кислоты, образующей указанный поперечно сшитый гель. Данное количество можно, в частности, измерять $1D^1$ НЯМР-анализом (ядерный магнитный резонанс) поперечно сшитого геля.

40 Подразумевается, что выражение «число молей гиалуроновой кислоты» означает число молей повторяющейся дисахаридной единицы гиалуроновой кислоты, причем дисахаридная единица состоит из D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина, связанных друг с другом посредством чередующихся бета-1,4 и бета-1,3 гликозидных связей.

45 Однако, с целью получения гиалуроновой кислоты, как можно более близкой к эндогенной гиалуроновой кислоте, было бы желательно получать гели на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты с более низкой степенью модификации.

Следует признать, что поперечно сшитые гели с более низкими степенями

модификации (то есть от 1% до 2%) уже были предложены. К сожалению, оказывается, что они являются низко когезивными и имеют низкую устойчивость к разрушению. Данные недостатки, в частности, проявляются в колебании реологических свойств в ограниченном диапазоне вязкоэластичности (диапазон вязкоэластичности представлен диапазоном напряжения, в котором G' остается постоянным во время измерения посредством градуального изменения напряжения. Ширину данного диапазона вязкоэластичности можно, в частности, оценивать путем измерения переходного напряжения, то есть напряжения, при котором значение G' уменьшается и становится равным значению G'').

Вследствие этого, данные характеристики должны быть улучшены для применения в заполнении морщин.

Более конкретно, сохраняется необходимость в гелях поперечно сшитой гиалуроновой кислоты с самыми низкими, насколько это возможно, степенями модификации, которые в то же время остаются удовлетворительными в отношении демонстрируемых механических свойств.

Вопреки всем ожиданиям, авторы изобретения отметили, что такой гель можно получать в том случае, когда стадию поперечного сшивания проводят в присутствии определенного типа соединения.

Таким образом, согласно первому аспекту изобретения его предметом является гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, который получают в результате поперечного сшивания гиалуроновой кислоты или ее соли в присутствии по меньшей мере эффективного количества по меньшей мере одного эндогенного полиамина в качестве поперечно сшивающего агента, причем указанное поперечное сшивание проводят в условиях, благоприятных для проведения реакции ковалентного сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых) эндогенного(ых) полиамина(ов).

Следует признать, что полиамины, которые, тем не менее, отличаются от полиаминов, рассматриваемых согласно изобретению, уже были предложены для образования гидрогелей на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты.

Так, согласно публикациям Xiang Mei Yuan et al. (Journal of biomaterials Applications 0 (0) 1-9; 27 February 2012) и Junseok Yeom et al. (Bioconjugate Chem., 1991 (2) 232-241), а также заявке WO 2012/008722, предложены гидрогели на основе гиалуроновой кислоты (НА), поперечно сшитые в присутствии гексаметилендиамина (HMDA). Однако, рассматриваемый полиамин, а именно гексаметилендиамин (HMDA), представляет собой синтетический диамин и, вследствие этого, не эндогенный диамин. Кроме того, количества поперечного сшивающего агента (HMDA), используемые в данном предшествующем уровне техники, находятся в интервале от 25% до 72% и приводят к очень высоким степеням модификации от 5% до 35%.

Подразумевается, что термин «количество поперечно сшивающего агента» обозначает соотношение числа молей полиамина(ов) и числа молей гиалуроновой кислоты, используемой для синтеза геля.

Наконец, как следует из примеров ниже в данном документе, гели НА-HMDA, как оказывается, являются значительно менее эффективными с точки зрения механических свойств, чем гели, полученные согласно изобретению.

В отношении эндогенных полиаминов, рассматриваемых согласно изобретению, согласно заявке WO 2008/015249 предложено, в свою очередь, использовать их вместе с частицами гиалуроновой кислоты для местного применения в качестве антивозрастного активного агента и в качестве антиоксиданта. По очевидным причинам, такая смесь очень отличается от гелей, рассматриваемых согласно изобретению.

В публикации Di Meo et al. (Biomacromolecules, 2006, 7: 1253-60) описано образование гидрогелей посредством реакции Уги или также конденсации гиалуроновой кислоты и спермидина. Таким образом, вовлекается механизм, который отличается от механизма, рассматриваемого в настоящем изобретении. Кроме того, гидрогели, полученные таким образом и не предназначенные для применения согласно изобретению, получают в результате способа с использованием больших количеств поперечно сшивающего агента (от 5% до 25%).

Таким образом, авторы изобретения отметили, что эндогенный полиамин представляет собой предпочтительный поперечно сшивающий агент для получения геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, соответствующий упомянутым выше ожиданиям, а именно обладающий сниженной степенью модификации, по сравнению с теми, которые наблюдаются в случае обычно рассматриваемых поперечно сшивающих агентов, и механическими свойствами и устойчивостью к стерилизации, которые являются особенно удовлетворительными.

Действительно, поперечно сшитые гели по изобретению имеют значительно сниженную степень модификации, а именно меньше чем или равную 1%, оставаясь в то же самое время удовлетворительными в отношении механических свойств.

Оказывается, что поперечно сшитый гель по изобретению также имеет преимущество в том, что он состоит из соединений, которые в природе присутствуют в большинстве живых организмов и, в частности, людях.

С точки зрения данной псевдоестественной природы он удовлетворяет возрастающую потребность потребителей в данном отношении.

Наконец, вероятно, что свойства, характерные для эндогенных полиаминов, рассматриваемые согласно изобретению, сохраняются в геле на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, полученном согласно изобретению. Дело в том, что поскольку данные свойства имеют антиоксидантный эффект или даже антивозрастной эффект, они особенно приятны в контексте настоящего изобретения.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения его предметом является стерильная инъеклируемая дерматологическая композиция, содержащая в физиологически приемлемой среде по меньшей мере один гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению.

В целях настоящего изобретения термин «кожа» охватывает кожу лица, шеи, линии шеи, рук, головы, живота и/или ног, а также губ.

Подразумевается, что термин «стерильный» характеризует окружающую среду, способную обеспечивать соединения, рассматриваемые в композиции по изобретению, и/или указанную композицию, которая их содержит, безвредность, требуемую для введения в или через кожу, в частности, внутриэпидермального и/или внутрикожного, и/или подкожного введения. В частности, существенно, чтобы композиция, содержащая указанные соединения и которую нужно вводить в соответствии с инъекционным методом, например, в соответствии с методом мезотерапии, не содержала какого-либо загрязняющего вещества, способного вызывать вредную побочную реакцию в организме хозяина.

В целях настоящего изобретения подразумевается, что термин «инъеклируемый» обозначает композицию, механические свойства которой подходят для рассматриваемого применения, а именно ее введения в или через кожу, в частности, для заполнения морщин.

Таким образом, композиция по изобретению является инъеклируемой посредством тонкой иглы для подкожных инъекций (в частности, с диаметром, меньше чем 18G или

даже меньше чем $27G$), и преимущественно имеет модуль упругости (G') от 20 до 1000 Па, предпочтительно от 40 Па до 400 Па, с фазовым углом (δ), меньше чем 45° .

Данный модуль упругости (G') и фазовый угол (δ) измеряют посредством протокола, определенного ниже.

5 Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения его предметом является дерматологическая или косметическая композиция, содержащая по меньшей мере один гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению.

Данное воплощение, которое не ограничивается в отношении способа введения, следовательно, позволяет вводить указанную композицию местно.

10 Согласно другому аспекту настоящего изобретения его предметом является набор, содержащий следующие компоненты:

- упаковка, содержащая по меньшей мере одну дозу геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению или композиции по изобретению; и

15 - устройство для инъектирования в, или через кожу, или устройство для микроперфорации кожи, предназначенное для введения указанной дозы.

Согласно еще одному аспекту изобретения его предметом является применение поперечно сшитого геля или композиции по изобретению для заполнения объемных дефектов кожи и, в частности, заполнения морщин.

20 Согласно еще одному аспекту изобретения его предметом является применение поперечно сшитого геля или композиции по изобретению для предупреждения и/или лечения признаков хронологического старения кожи и/или относящихся к коже признаков, которые вызваны внешними факторами, такими как стресс, атмосферное загрязнение, табак или длительное воздействие ультрафиолетового (УФ) излучения.

25 Согласно еще одному аспекту изобретения его предметом является применение поперечно сшитого геля или композиции по изобретению для предупреждения и/или лечения модификации внешнего вида кожи.

Согласно еще одному аспекту изобретения его предметом является применение поперечно сшитого геля или композиции по изобретению для предупреждения и/или лечения модификации вязкоупругих или биомеханических свойств кожи.

30 В целях настоящего изобретения подразумевается, что термин «предупреждение» означает снижение риска возникновения явления.

Согласно другому аспекту изобретения его предметом является косметический способ лечения кожи, включающий по меньшей мере одну стадию введения, в или через кожу, поперечно сшитого геля или композиции по изобретению.

35 Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения последнее относится к способу получения поперечно сшитого геля гиалуроновой кислоты или ее соли, включающему по меньшей мере стадии, заключающиеся в следующем:

а) берут водный гель гиалуроновой кислоты или ее соли в поперечно несшитом состоянии,

40 б) гель, полученный на стадии а), приводят в контакт с эффективным количеством по меньшей мере одного эндогенного полиамина,

в) поперечное сшивание указанной смеси, образованной на стадии б), причем указанное поперечное сшивание проводят в условиях, благоприятных для проведения реакции ковалентного сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых)

45 эндогенного(ых) полиамина(ов), и

г) выделение указанного поперечно сшитого гидрогеля.

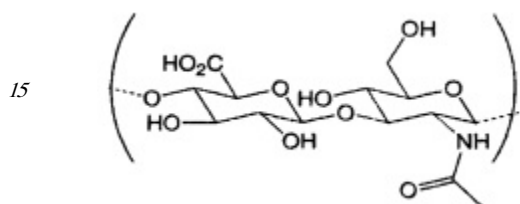
Согласно одному конкретному воплощению способ также включает стадию д) остановки поперечно сшивания, заключающуюся в помещении поперечно сшитого

геля в условия, благоприятные для остановки его поперечного сшивания, причем данную стадию возможно проводить перед, совместно с, или после стадии выделения г).

Гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты

5 Как указано ранее, гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению получают в результате поперечного сшивания по меньшей мере гиалуроновой кислоты или ее соли с, в качестве поперечно сшивающего агента, по меньшей мере одним эндогенным полиамином, причем указанное поперечное сшивание проводят в условиях, благоприятных для реакции сочетания указанной гиалуроновой
10 кислоты и указанного(ых) эндогенного(ых) полиамина(ов).

Гиалуроновые кислоты представляют собой линейные полисахариды с чередующимися единицами D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина.



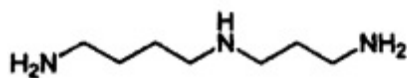
20 В природе они присутствуют в нескольких тканях и разрушаются посредством гиалуронидаз, которые присутствуют во всем организме, или посредством механизмов окисления.

В целях настоящего изобретения предполагается, что термин «эндогенный полиамин» обозначает полиамин, который в природе присутствует в живых организмах и, в частности, организме человека.

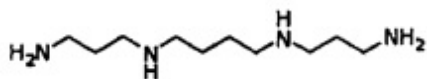
25 Следовательно, полиамин по изобретению отличается от гексаметилендиамина (HMDA), который представляет собой полиамин синтетического происхождения.

В качестве представления эндогенных полиаминов у животных эукариот вполне конкретно можно упомянуть путресцин (или 1,4-диаминобутан), спермидин (или 1,8-диамино-5-азаоктан) и спермин (1,12-диамино-5,9-диазадодекан).

30 Спермин представляет собой тетраамин и синтезируется из спермидина.



35 Спермидин



40 Спермин

40 Преимущественно, эндогенный полиамин, используемый для получения поперечно сшитого геля по изобретению, может быть выбран из спермидина, спермина и их смеси, и еще лучше спермина.

45 Данный выбор является еще более предпочтительным, так как спермин и спермидин участвуют в многочисленных фундаментальных клеточных механизмах, таких как синтез ДНК и экспрессия генов. При использовании местно, их положительные эффекты на улучшение состояния кожи и уменьшение признаков старения уже были описаны (в частности, см. заявку WO 2006/048671). Считается, что данные соединения также являются предпочтительными антиоксидантами и антивозрастными активными

агентами.

Реакцию сочетания, рассматриваемую в настоящем изобретении для осуществления реакции поперечного сшивания между гиалуроновой кислотой и эндогенным(и) полиамином(ами), проводят посредством реакции между функциональной аминогруппой и карбоновой кислотой, приводя, таким образом, к образованию функциональной амидной группы.

Другими словами, реакция поперечного сшивания, рассматриваемая в настоящем изобретении, приводит к образованию молекул поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, ковалентно связанной с эндогенным(и) полиамином(ами). Электростатических взаимодействий не происходит.

Вопреки всем ожиданиям, полученные поперечно сшитые гели, с учетом того, что рассматриваемые степени модификации значительно снижены, демонстрируют механические свойства, которые являются очень удовлетворительными или даже недостижимыми посредством традиционных способов, как упомянуто ранее.

Таким образом, согласно одному конкретному воплощению поперечно сшитый гель по изобретению преимущественно имеет степень модификации меньше чем или равную 1%, предпочтительно от 0,1% до 1% и еще лучше от 0,4% до 0,8%.

Как указано ранее, «степень модификации» соответствует соотношению числа молей эндогенного полиамина, присоединенного к гиалуроновой кислоте, и числа молей гиалуроновой кислоты, образующей указанный поперечно сшитый гель. Данное количество можно, в частности, измерять посредством 1D ^1H ЯМР-анализа поперечно сшитого геля.

Следует напомнить, что предполагается, что выражение «число молей гиалуроновой кислоты» означает число молей повторяющихся дисахаридных единиц гиалуроновой кислоты, причем дисахаридная единица состоит из D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина, связанных друг с другом посредством чередующихся бета-1,4 и бета-1,3 гликозидных связей.

Согласно одному конкретному воплощению поперечно сшитый гель по изобретению является таким, что он может содержать от 0,5 масс. % до 40 масс. % гиалуроновой кислоты, не подвергнувшейся реакции поперечного сшивания, относительно общего количества гиалуроновой кислоты.

Согласно другому конкретному воплощению поперечно сшитый гель по изобретению может иметь концентрацию гиалуроновой кислоты от 5 до 30 мг/г.

Согласно еще одному конкретному воплощению поперечно сшитый гель по изобретению может иметь модуль упругости (G') от 20 до 1000 Па, предпочтительно от 40 Па до 400 Па.

Согласно одному конкретному воплощению поперечно сшитый гель по изобретению может находиться в форме преимущественно упругого, вязкоупругого гидрогеля с фазовым углом (δ) составляющим менее 45° .

Согласно одному предпочтительному воплощению поперечно сшитый гель по изобретению может иметь модуль упругости (G') от 20 до 1000 Па, предпочтительно от 40 Па до 400 Па, в сочетании с фазовым углом (δ) составляющим менее 45° .

В частности, гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты согласно изобретению можно инъектировать посредством иглы для подкожных инъекций с диаметром от 34G до 18G.

Согласно еще одному конкретному воплощению поперечно сшитый гель по изобретению является высококогезивным. Данная характеристика проявляется, в частности, через высокое переходное напряжение, определенное способом градуального

изменения напряжения, составляющее больше чем 100 Па.

Модуль упругости (G' , в Па) и фазовый угол (δ , в °) могут быть измерены согласно следующему протоколу:

Измерения проводят при 25°C при частоте 1 Гц, с градуальным изменением
5 напряжения, используя реометр Thermo Haake RS3000 с геометрией конус/плита 1°/
диаметр 35 мм.

G' и δ записывают при приложенном напряжении деформации 5 Па, то есть в
диапазоне вязкоэластичности, где G' и δ остаются стабильными. Затем также записывают
10 значение переходного напряжения (когда G' снижается до значения, равного модулю
вязкости G'').

Для когезивного геля по изобретению данное переходное напряжение, таким образом,
выше чем 100 Па.

Наконец, согласно одному конкретному воплощению поперечно сшитый гель по
изобретению может обладать высокой устойчивостью к стерилизации (потеря G' ,
15 вызванная стерилизацией, составляет меньше чем 50%).

Стерилизацию можно проводить в автоклаве (влажное тепло) при $T \geq 121^\circ\text{C}$, так
чтобы получать $F_0 > 15$ (показатель стерильности).

Как указано ранее, реакцию поперечного сшивания для получения поперечно сшитого
геля по изобретению проводят в условиях, благоприятных для проведения реакции
20 ковалентного сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых) эндогенного
(ых) полиамина(ов).

В целях настоящего изобретения подразумевается, что термин «благоприятные
условия» означает элемент, который инициирует указанную реакцию сочетания.

Выбор данного инициирующего элемента очевидно входит в число навыков
25 специалистов в данной области техники.

Обычно, данную реакцию сочетания проводят посредством по меньшей мере одного
соединения «активатора», при необходимости в сочетании с по меньшей мере одним
«вспомогательным агентом реакции сочетания».

Например, такой активатор может выполнять функцию превращения углерода
30 карбоксильной группы гиалуроновой кислоты в более электрофильный углерод и,
вследствие этого, таким образом, стимулирования его реакционной способности в
отношении одной из аминогрупп эндогенного полиамина.

Активатор может преимущественно представлять собой конденсационный агент,
например, соль пиридиния, например, 2-хлор-1-водорастворимых карбодиимидов,
35 таких как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), 1-этил-3-(3-
триметиламинопропил)карбодиимид (ETC), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)
карбодиимид (CMC), и также их солей, и их смесей, и предпочтительно представлен
EDC.

Предпочтительно, вспомогательный агент реакции сочетания, когда он присутствует,
40 может быть выбран из N-гидроксисукцинимид (NHS), N-гидроксибензотриазола (HOBT),
3,4-дигидро-3-гидрокси-4-оксо-1,2,3-бензотриазола (HOObt), 1-гидрокси-7-
азабензотриазола (HAt) и N-гидроксисульфосукцинимид (сульфо-NHS) и их смесей, и
предпочтительно представлен HOBT.

Даже более предпочтительно, такой активатор может быть выбран из EDC, при
45 необходимости в сочетании с HOBT в качестве вспомогательного агента реакции
сочетания.

EDC позволяет активировать карбоновую кислоту посредством образования
промежуточного соединения с карбоксилатом. Добавление HOBT к реакционной среде

позволяет, в частности, избегать какой-либо эпимеризации и стимулировать реакцию.

Способ получения поперечно сшитого геля

Как указано выше, настоящее изобретение также относится к способу получения поперечно сшитого геля гиалуроновой кислоты или ее соли, включающему по меньшей мере стадии, заключающиеся в следующем:

а) берут водный гель гиалуроновой кислоты или ее соли в поперечно несшитом состоянии,

б) гель, полученный на стадии а), приводят в контакт с эффективным количеством по меньшей мере одного эндогенного полиамина,

в) поперечное сшивание указанной смеси, образованной на стадии б), причем указанное поперечное сшивание проводят в условиях, благоприятных для проведения реакции ковалентного сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых) эндогенного(ых) полиамина(ов), и

г) выделение указанного поперечно сшитого гидрогеля.

Согласно одному конкретному воплощению способ также включает стадию д) остановки поперечного сшивания, заключающуюся в помещении поперечно сшитого геля в условия, благоприятные для остановки его поперечного сшивания, причем данную стадию возможно проводить перед, совместно с или после стадии выделения г).

Согласно одному конкретному воплощению стадию поперечного сшивания в) можно проводить в присутствии по меньшей мере одного активатора, возможно в сочетании с по меньшей мере одним вспомогательным агентом реакции сочетания, то есть соединениями, которые стимулируют реакционную способность по меньшей мере одного из двух соединений, подлежащих связыванию, предпочтительно выбранными из соединений, упомянутых ранее.

Данную стадию добавления активатора и возможно вспомогательного агента реакции сочетания можно, вследствие этого, преимущественно проводить совместно со стадией поперечного сшивания в).

Согласно одному конкретному воплощению гиалуроновая кислота, используемая для получения геля по изобретению, может находиться в форме соли.

Предпочтительно, соль гиалуроновой кислоты может быть выбрана из соли натрия, соли калия, соли цинка, соли серебра и их смеси, предпочтительно соли натрия.

Преимущественно, гиалуроновая кислота, используемая для получения геля по изобретению, может иметь среднюю молекулярную массу, находящуюся в интервале от 50000 до 10000000 дальтон, предпочтительно от 500000 до 4000000 дальтон.

Корректирование количества гиалуроновой кислоты для проведения реакции поперечного сшивания очевидно входит в число навыков специалистов в данной области техники.

Преимущественно, гиалуроновую кислоту или ее соль можно использовать в способе получения поперечно сшитого геля по изобретению в содержании от 0,5 масс. % до 12 масс. %, предпочтительно от 1 масс. % до 4 масс. %, относительно общей массы смеси, полученной в конце стадии б), то есть перед проведением стадии поперечного сшивания в).

Корректирование количества эндогенного(ых) полиамина(ов) для проведения реакции поперечного сшивания очевидно входит в число навыков специалистов в данной области техники.

Количество поперечно сшивающего агента соответствует соотношению числа молей полиамина(ов) и числа молей гиалуроновой кислоты, используемой для синтезирования

геля.

Преимущественно, один или более чем один эндогенный полиамин можно использовать в способе получения геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению в содержании от 0,1% до 3%, предпочтительно от 0,5% до 1,5%, по числу молей полиами́на(ов) относительно числа молей гиалуроновой кислоты, которые присутствуют в реакционной среде, то есть среде стадии б).

Преимущественно, активатор(ы), при необходимости в сочетании с одним или более чем одним вспомогательным агентом реакции сочетания, можно использовать в способе получения геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению в содержании, таком, что число молей активатора(ов) и, при необходимости, вспомогательного(ых) агента(ов) реакции сочетания, относительно числа молей гиалуроновой кислоты реакционной среды (n активатора / n НА) составляет от 0,1 до 2, предпочтительно от 0,5 до 1,5.

Гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты получают с учетом присутствия по меньшей мере одного эндогенного полиами́на.

Следовательно, поперечное сшивание можно проводить с использованием только данного типа поперечно сшивающего агента. Однако, данное поперечное сшивание можно также проводить с учетом одновременного присутствия по меньшей мере одного дополнительного, в частности, традиционного поперечно сшивающего агента.

Преимущественно, данный дополнительный поперечно сшивающий агент можно затем учитывать в значительно уменьшенном количестве, по сравнению с количествами, традиционно поддерживаемыми в том случае, когда его используют в качестве единственного поперечно сшивающего агента.

Данный дополнительный поперечно сшивающий агент может быть выбран из эпоксида, альдегида, полиазиридила, полиаминов, отличных от эндогенных полиаминов, полифосфатов, дивинилсульфона (DVS) и их смесей, предпочтительно из поперечно сшивающих агентов на основе эпоксида, которые предпочтительно являются бифункциональными или мультифункциональными.

Предпочтительно, дополнительный поперечно сшивающий агент может быть выбран из эпоксида, более предпочтительно из 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (BDDE), диэпоксиоктана или 1,2-бис(2,3-эпоксипропил)-2,3-этилена, 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокси)этилена, 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана и их смесей, и еще лучше 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира (BDDE).

Кроме того, во время реакции поперечного сшивания также может рассматриваться присутствие неорганической соли галогенида щелочного металла.

Действительно, неожиданно авторы изобретения отметили, что присутствие неорганической соли галогенида щелочного металла "при проведении реакции поперечного сшивания позволяет дополнительно улучшать реологические свойства поперечно сшитого геля при той же степени поперечного сшивания.

В целях настоящего изобретения подразумевается, что термин «соль галогенида щелочного металла» обозначает соединение, образованное катионом щелочного металла и анионом, обязательно представляющим атом галогена.

Преимущественно, атом галогена может быть выбран из фтора, хлора, брома и йода, и предпочтительно представлен хлором.

Предпочтительно, неорганическая соль галогенида щелочного металла по изобретению может быть выбрана из солей натрия, солей калия и солей цезия, и еще лучше представлена солью натрия.

Даже более предпочтительно, неорганическая соль галогенида щелочного металла по изобретению может представлять собой NaCl.

NaCl фактически обладает преимуществом, заключающимся в том, что является физиологически приемлемой, и она является одним из компонентов одного из сырьевых материалов, которые являются частью композиции гелей на основе поперечно связанной гиалуроновой кислоты.

Преимущественно, неорганическую(ие) соль(и) галогенида щелочного металла можно использовать в способе по изобретению в содержании от 0,5 масс. % до 20 масс. %, предпочтительно от 1 масс. % до 10 масс. % относительно общей массы смеси, полученной в конце стадии б).

Ввиду вышеупомянутого, способ получения геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению требует, во-первых, следующего: берут водный гель, содержащий по меньшей мере гиалуроновую кислоту в поперечно несшитой форме, в сочетании с по меньшей мере одним эндогенным полиамином в качестве поперечно сшивающего агента.

В целях настоящего изобретения подразумевается, что термин «поперечно несшитый» обозначает водный гель гиалуроновой кислоты, который поперечно несшит или не трансформирован, то есть раствор гиалуроновой кислоты, цепи полимера которой не связаны одна с другой сильными или ковалентными связями.

Более конкретно, водный гель, рассматриваемый на стадии а), можно получать заранее путем объединения в соответствующей емкости следующих компонентов:

(i) водная среда;

(ii) по меньшей мере гиалуроновая кислота или ее соль в поперечно несшитой форме;

и

(iii) при необходимости, по меньшей мере один эндогенный полиамин; и гомогенизации полученной смеси, причем порядок добавления в емкость указанных соединений (i), (ii) и (iii) не важен.

Другими словами, в том случае, когда для водного геля стадии а) рассматривается присутствие по меньшей мере одного эндогенного полиамина, тогда стадии а) и б) способа по изобретению проводят одновременно.

Согласно первому варианту воплощения данный водный гель может быть образован введением в емкость водной среды и гиалуроновой кислоты с одновременной и/или последующей гомогенизацией образованной таким образом смеси, и затем, при необходимости, добавлением поперечно сшивающего агента с одновременной и/или последующей гомогенизацией.

Согласно второму варианту воплощения данный водный гель можно получать введением в емкость водной среды, гиалуроновой кислоты и поперечно сшивающего агента с одновременной и/или последующей гомогенизацией образованной таким образом смеси.

Данный второй вариант воплощения является преимущественным, так как проводят единственную стадию гомогенизации.

Преимущественно, данную стадию образования водного геля можно проводить при температуре ниже 35°C, предпочтительно при температуре, находящейся в интервале от 15 до 25°C, и еще лучше при температуре окружающей среды.

Водный гель, рассматриваемый на стадии а), является преимущественно гомогенным.

Данное качество гарантировано операцией, в которой водный гель гомогенизируют, причем указанная операция, возможно, представляет собой стадию, предшествующую стадии а).

Цель данной операции, возможно проводимой в присутствии поперечно сшивающего агента, более конкретно заключается в гидратации и полной гомогенизации гиалуроновой кислоты в водной среде и, при необходимости, поперечно сшивающего агента, и, таким образом, содействии оптимизации качеств ожидаемого поперечно сшитого геля.

Действительно, по очевидным причинам, гомогенность поперечно сшитого геля тесно связана с гомогенной природой геля перед поперечным сшиванием.

Считается, что гомогенизация является удовлетворительной, когда полученный раствор имеет гомогенную окраску, без агломератов и однородную вязкость. Ее можно преимущественно проводить в мягких рабочих условиях для предупреждения разрушения цепей гиалуроновой кислоты.

Данная стадия тем более важна, когда гиалуроновая кислота имеет большую молекулярную массу. Тогда гидратация такого соединения фактически имеет тенденцию вызывать образование раствора высокой вязкости, в котором обычно наблюдают появление агломератов.

Как следует из упомянутого выше, смесь, образованную на стадии б), или даже, при необходимости, водный гель стадии а), когда рассматривается наличие поперечно сшивающего агента, впоследствии подвергают реакции поперечного сшивания, проиллюстрированной стадией в) способа получения геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению.

Как указано ранее, данное поперечное сшивание проводят в условиях, благоприятных для проведения реакции сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых) эндогенного(ых) полиамина(ов).

Благоприятные условия, которые нужно поддерживать для индукции данной реакции сочетания и, вследствие этого, реакции поперечного сшивания, может зависеть от молекулярной массы гиалуроновой кислоты, от водной среды и от природы поперечно сшивающего агента, в данном случае полностью или частично образованного эндогенным полиамином.

Данные благоприятные условия могут, в частности, выражаться в присутствии по меньшей мере одного активатора, при необходимости, в сочетании с по меньшей мере одним вспомогательным агентом реакции сочетания, как указано выше.

Как указано ранее, стадию добавления активатора и, при необходимости, вспомогательного агента реакции сочетания, можно предпочтительно проводить совместно со стадией поперечного сшивания в).

Однако, согласно одному конкретному воплощению активатор и, при необходимости, вспомогательный агент реакции сочетания добавляют перед стадией поперечного сшивания в), и более конкретно перед стадией добавления по меньшей мере одного эндогенного полиамина.

Согласно другому воплощению данную стадию добавления активатора и, при необходимости, вспомогательного агента реакции сочетания проводят вместе со стадией б), в случае чего стадию б) тогда проводят вместе со стадией поперечного сшивания в).

Кроме того, степень поперечного сшивания также зависит от продолжительности стадии поперечного сшивания, применяемой для смеси, полученной в конце стадии б). Чем длительнее период времени, тем выше степень поперечного сшивания, однако, с оптимумом, который нельзя превышать, иначе существует риск разрушения гиалуроновой кислоты.

Таким образом, когда поперечное сшивание гиалуроновой кислоты проводят в

присутствии EDC и НОВt, стадию поперечного сшивания в) можно проводить на протяжении периода, находящегося в интервале от 30 минут до 72 часов, предпочтительно от 3 до 24 часов.

5 Как описано ранее, остановка поперечного сшивания (стадия д) может происходить перед, вместе с или после стадии выделения геля г).

Такая стадия д) может требовать помещения поперечно сшитого геля или геля, подвергающегося поперечному сшиванию, или даже емкости, содержащей его, в условия, благоприятные для остановки указанного поперечного сшивания или же в условия, способные останавливать образование связей между разными цепями полисахаридов.

10 Данную стадию можно инициировать естественным путем, если все реагенты расходуются во время стадии в), или стимулировать посредством стадии очистки, которая возвращает гель к физиологическому рН и устраняет непрореагировавшие остаточные реагенты.

15 Согласно одному предпочтительному варианту воплощения стадию д) проводят перед стадией г).

Согласно одному конкретному предпочтительному воплощению в способе по изобретению используются (i) гиалуронат натрия, (ii) спермин в качестве поперечно сшивающего агента и (iii) EDC, в качестве активатора в сочетании с НОВt в качестве вспомогательного агента реакции сочетания.

20 По очевидным причинам поперечно сшитый гель, полученный в конце способа по изобретению, обычно не подходит для прямой инъекции, поскольку соответствующая водная композиция может быть как несовместимой с физиологическими условиями, так и иметь неподходящий рН.

25 Таким образом, можно проводить одну или более чем одну дополнительную стадию, известную специалистам в данной области техники.

Более конкретно, стадия очистки геля по изобретению позволяет возвращать последний к физиологическому рН и устранять непрореагировавшие остаточные реагенты.

30 Данная стадия очистки может, в частности, быть представлена стадией диализа. Кроме того, последующие стадии гомогенизации, включения поперечно несшитой гиалуроновой кислоты и, возможно, фракционирования можно также проводить для дополнительного улучшения качества имплантата в соответствии с научно-техническими знаниями специалистов в данной области техники. Гель должен быть физиологически подготовлен в виде препарата в присутствии солей в количествах, эквивалентных
35 количествам инъецированной среды.

Наконец, полученный гидрогель может быть упакован в шприцы в контролируемых атмосферных условиях, причем указанные шприцы затем возможно подвергать стадии стерилизации, предпочтительно тепловой стерилизации.

Композиция

40 Согласно другому аспекту настоящего изобретения, как указано выше, последнее также относится к стерильной инъецируемой дерматологической композиции, содержащей в физиологически приемлемой среде по меньшей мере один гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, как определено выше.

45 Благодаря своей инъецируемой природе, композиция по изобретению, вследствие этого, обязательно содержит физиологически приемлемую среду.

Предполагается, что термин «физиологически приемлемая среда» означает среду, которая лишена токсичности и совместима с инъекцией и/или применением композиции в или через кератиновые вещества.

Композиция может содержать физиологически приемлемый растворитель или смесь физиологически приемлемых растворителей.

Композиция может содержать физиологически приемлемую водную среду.

5 В качестве водной среды, которая подходит для изобретения, можно упомянуть, например, воду.

В качестве изотонических агентов, которые подходят для получения композиции, которая подходит для изобретения, можно упомянуть сахара и хлорид натрия.

10 Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения, как указано выше, последнее относится к дерматологической или косметической композиции, содержащей по меньшей мере один гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты по изобретению.

Данное воплощение, которое не ограничивается в отношении способа введения, следовательно, позволяет вводить указанную композицию местно.

Дополнительные активные агенты

15 Композиция по изобретению также может содержать по меньшей мере один дополнительный активный агент, который совместим с применением в области стерильных инъеклируемых композиций.

Среди дополнительных активных агентов, пригодных для использования в настоящем изобретении, можно упомянуть антиоксиданты, аминокислоты, витамины, минералы, нуклеиновые кислоты, коферменты, адреналин-содержащие производные и их смеси.

20 В качестве антиоксидантов можно упомянуть, в частности, глутатион, эллаговую кислоту, спермин, ресвератрол, ретинол, L-карнитин, полиолы, полифенолы, флавонолы, теафлавины, катехины, кофеины, убихинол, убихинон и их смесь.

25 В качестве аминокислот можно упомянуть, в частности, аргинин, изолейцин, лейцин, лизин, глицин, валин, треонин, пролин, метионин, гистидин, фенилаланин, триптофан и их смесь.

В качестве витаминов или их производных можно упомянуть, в частности, витамины E, A, C и B, более конкретно витамины B₆, B₈, B₄, B₅, B₉, B₇ и B₁₂ и еще лучше пиридоксин.

30 В качестве минералов можно, в частности, упомянуть соли цинка, соли магния, соли кальция, соли калия, соли марганца, соли натрия и их смесь.

В качестве нуклеиновых кислот можно, в частности, упомянуть производные аденозина, цитидина, гуанозина, тимидина, цитодина и их смесь.

35 В качестве коферментов можно, в частности, упомянуть кофермент Q10, CoA (коэнзим A), NAD (никотинамидадениндинуклеотид), NADP (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) и их смесь.

В качестве адреналин-содержащих производных можно, в частности, упомянуть адреналин и норадреналин.

40 Кроме того, композиция по изобретению может также содержать любой эксципиент, обычно используемый в рассматриваемой области техники, такой как, например, натрия дигидрофосфат моногидрат и/или дигидрат, и хлорид натрия в физиологически подходящих содержаниях.

Количества дополнительных активных агентов и/или эксципиентов безусловно зависят от природы рассматриваемого соединения, от желательного эффекта и от назначения композиции по изобретению.

45 Данные параметры входят в число общих навыков специалистов в данной области техники.

Преимущественно, композиция по изобретению может содержать от 2 млн⁻¹ до 10000

млн⁻¹, предпочтительно от 5 млн⁻¹ до 1000 млн⁻¹ и еще лучше от 50 млн⁻¹ до 500 млн⁻¹ дополнительных активных агентов и/или эксципиентов относительно общей массы указанной композиции.

5 Кроме того, известно, что инъекция композиции, предназначенной для заполнения морщин, часто вызывает болезненное ощущение у пациента.

Таким образом, согласно одному конкретному воплощению композиция по изобретению может также содержать по меньшей мере один обезболивающий агент.

10 Обезболивающий агент точно имеет преимущество снижения или даже устранения болезненного ощущения, испытываемого пациентом во время и/или после введения композиции согласно изобретению.

Кроме того, авторы изобретения отметили, что наличие такого соединения не повышает риск несовместимости с другими соединениями, используемыми в композиции по изобретению и, в частности, с гиалуроновой кислотой.

15 Обезболивающий агент, пригодный для применения в настоящем изобретении, может быть выбран из амбукаина, амоланона, амилокаина, артикаина, беноксината, бензокаина, бетоксикаина, бифенамина, бупивакаина, бутакаина, бутамбена, бутаниликаина, бутетамина, бутоксикаина, картикаина, хлорпрокаина, кокаэтилена, кокаина, циклометикаина, дибукаина, диметизоквина, диметоккаина, диперодона, дициклонина, эгонидина, эгонины, этилхлорида, этидокаина, бета-эукаина, эупроцина, 20 феналкомина, формокаина, гексилкаина, гидрокситетракаина, изобутил п-аминобензоата, лейцинокаина мезилата, левоксадролла, лидокаина, мепивакаина, меприлкаина, метабутоксикаина, метилхлорида, миртекаина, наепаина, октакаина, ортокаина, оксетазаина, парэтоксикаина, фенакаина, фенола, пиперокаина, пиридокаина, полидоканола, прамоксина, прилокаина, прокаина, пропанокаина, пропаракаина, 25 пропипокаина, пропоксикаина, псевдококаина, пиррокаина, ропивакаина, салицилового спирта, тетракаина, толикаина, тримекаина, золамина или их соли.

30 Более конкретно, обезболивающее средство, пригодное для использования в настоящем изобретении, может быть выбрано из артикаина, бензокаина, бупивакаина, хлорпрокаина, лидокаина, мепивакаина, прилокаина, прокаина, ропивакаина и тетракаина.

Предпочтительно, обезболивающее средство может представлять собой лидокаин и еще лучше лидокаина гидрохлорид.

35 Композиция по изобретению может предпочтительно содержать от 0,01 масс. % до 1 масс. %, предпочтительно от 0,1 масс. % до 0,5 масс. % обезболивающего(их) средства (в) относительно общей массы указанной композиции.

Согласно одному конкретному воплощению гель или композиция по изобретению, помимо гиалуроновой кислоты в поперечно сшитой форме, может также содержать гиалуроновую кислоту в поперечно несшитой форме.

40 Такое сочетание гиалуроновой кислоты в свободной и поперечно сшитой форме немедленно приводит к увлажнению и поддержанию объема кожи. Кроме того, оно вызывает стимулирование фибробластов кожи, главным образом благодаря присутствию свободной гиалуроновой кислоты, и данное стимулирование фибробластов продолжается в течение того времени, как поперечно сшитая гиалуроновая кислота разрушается *in vivo*. С функциональной точки зрения, присутствие поперечно несшитой 45 гиалуроновой кислоты позволяет значительно улучшить силы вытеснения геля через иглу, таким образом, облегчая прикладываемые практикующим врачом усилия для инъектирования продукта.

Введение стерильного инъектируемого геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой

кислоты или дерматологической композиции

Гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты или композицию по изобретению можно инъектировать с использованием любого из способов, известных специалистам в данной области техники.

5 В частности, гель или композицию по изобретению можно вводить посредством инъекционного устройства, подходящего для внутриэпидермальной и/или внутрикожной, и/или подкожной инъекции.

Инъекционное устройство может быть выбрано из шприца, набора микрошприцев, гидравлической системы, лазерного устройства, шприца-пистолета, безыгольного
10 инъекционного устройства или ролика с микроиглами.

Предпочтительно, инъекционное устройство может быть выбрано из шприца или набора микрошприцев.

Предпочтительно, такое средство может представлять собой иглу для подкожных инъекций или канюлю.

15 Игла или канюля по изобретению может иметь диаметр, находящийся в интервале от 18 до 34G, предпочтительно от 25 до 32G, и длину, находящуюся в интервале от 4 до 70 мм и предпочтительно от 4 до 25 мм.

Игла или канюля является преимущественно одноразовой.

Преимущественно, игла или канюля объединена со шприцем или любым другим
20 устройством для доставки указанной инъектируемой композиции посредством иглы или канюли. Согласно одному варианту воплощения, между иглой/канюлей и шприцем может быть вставлен катетер.

В известном способе практикующий врач может использовать шприц вручную или же посредством штатива для шприцев, такого как пистолеты.

25 Набор

Согласно другому аспекту настоящего изобретения последнее относится к набору, содержащему:

- упаковку, содержащую по меньшей мере одну дозу геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты или композиции по изобретению; и

30 - устройство для инъектирования в или через кожу или устройство для микроперфорации кожи, предназначенное для введения указанной дозы.

Упаковка подходит для хранения по меньшей мере одной дозы геля или композиции по изобретению.

Упаковка может быть устроена так, чтобы, кроме того, позволять отбирать
35 указанный гель или указанную композицию.

Таким образом, согласно первому воплощению указанную упаковку градуируют так, чтобы позволять отбирать указанный гель или указанную композицию.

Например, она может быть представлена в форме ампулы, бутылки или капсулы, в частности мягкой капсулы.

40 Предпочтительно, упаковка может быть для однократного введения и/или иметь конец с риской.

Согласно второму воплощению указанная упаковка может иметь колпачок, который делает возможной герметизацию во время хранения и который можно прокалывать иглой или канюлей во время применения.

45 В отношении инъекционного устройства, оно может представлять собой такое, как определено ранее, и предпочтительно являться одноразовым.

Предпочтительно инъекционное устройство подходит для внутриэпидермальной и/или внутрикожной, и/или подкожной инъекции.

Предпочтительно, указанное устройство подходит для метода мезотерапии.

Применение

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения последнее относится к применению геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты или композиции по изобретению для предупреждения и/или лечения признаков хронологического старения кожи и/или относящихся к коже признаков, которые вызваны внешними факторами, такими как стресс, табак и/или длительное воздействие УФ излучения.

Гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты или композиция по изобретению также имеют преимущество в том, что их можно использовать для предупреждения и/или лечения модификации внешнего вида кожи, модификации вязкоупругих или биомеханических свойств кожи, сниженного клеточного энергетического метаболизма или обезвоживания кожи.

Кроме того, гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты или композиция по изобретению имеют преимущество в том, что их можно использовать для заполнения объемных дефектов кожи, в частности, морщин и/или восстановления сияния кожи.

Способ лечения

Согласно другому аспекту настоящего изобретения последнее относится к косметическому способу лечения кожи, включающему по меньшей мере одну стадию введения, в или через кожу, геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты или композиции по изобретению.

Согласно одному конкретному воплощению стадию введения можно повторять на всей поверхности или участке поверхности, подлежащей лечению. Повторение инъекций позволяет создавать наслоение, так чтобы композиция по изобретению гомогенно распределялась в участке кожи, подлежащем лечению.

Согласно одному конкретному воплощению участки кожи, преимущественно обрабатываемые посредством способа по изобретению, могут представлять собой кожу и губы, и, в частности, кожу лица, шеи, линии шеи, рук, головы, живота и/или ног.

Гель или композицию по изобретению можно преимущественно инъецировать на уровне морщин и тонких и мелких морщинок.

Существует несколько инъекционных методов.

В качестве пригодных для применения методов можно упомянуть метод «многократного болюсного введения», который заключается в осуществлении инъекций, называемых болюсом, в поверхностную дерму в среднем 0,05 мл композиции по изобретению, причем указанные болюсы осуществляются на расстоянии примерно 1 см друг от друга. Данный метод, в частности, рекомендуют в отношении лица и линии шеи.

Также можно упомянуть метод «возврата», который заключается в осуществлении в поверхностную дерму линейных инъекций слежения, во введении иглы под углом 45° вдоль кожи в угнетенном состоянии и затем нанесении композиции по изобретению в поверхностную дерму при осторожном извлечении иглы.

Наконец, можно упомянуть метод «множественной пункции», который заключается в осуществлении серии множественных инъекций в эпидермис небольших количеств композиции по изобретению. Точки инъекций находятся очень близко друг к другу, например, каждые 3 мм, и распределены равномерно по поверхности, подлежащей лечению, или путем образования линии вдоль морщины. Данный метод, в частности, рекомендуют для выравнивания цвета лица.

Оказывается, что способ лечения согласно изобретению также имеет преимущество в отношении предупреждения и/или лечения признаков старения кожи или фотостарения,

в частности, выбранных из морщинистой кожи, кожи, демонстрирующей модификацию ее вязкоупругих или биохимических свойств, кожи, демонстрирующей модификацию когезии ее тканей, истонченной кожи, кожи, демонстрирующей модификацию ее внешнего вида, обвисания кожи.

5 Оказывается, способ лечения по настоящему изобретению также имеет преимущество в отношении предупреждения и/или лечения снижения клеточного энергетического метаболизма или обезвоживания кожи.

Оказывается, что способ лечения по настоящему изобретению также имеет преимущество в отношении заполнения объемных дефектов кожи, в частности, морщин
10 и/или восстановления сияния кожи.

Способ лечения согласно настоящему изобретению можно предпочтительно осуществлять в эпидермальном, дермо-эпидермальном и/или кожном или даже подкожном участке.

По всему объему настоящей заявки выражение «содержащий» является синонимом
15 выражения «содержащий по меньшей мере один», и следует понимать, что выражения «от...до...» и «находящийся в интервале от...до...» означают охватывающие пределы.

В качестве неограничивающей иллюстрации настоящего изобретения даны следующие примеры.

ПРИМЕРЫ

20 Пример 1: Протокол получения геля гиалуроновой кислоты, поперечно сшитого со спермином в качестве поперечно сшивающего агента.

Гиалуроновую кислоту растворяют в воде в концентрации 3 масс. %. После получения
гомогенного раствора к раствору гиалуроновой кислоты добавляют раствор,
содержащий спермин ($\geq 96\%$, который продает фирма Sigma-Aldrich под названием
25 Sigma), EDC в качестве активатора (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид
гидрохлорид, $\geq 98,0\%$, который продается фирмой Sigma-Aldrich под названием Fluka)
и НОВт в качестве вспомогательного агента реакции сочетания (1-гидроксибензотриазол
гидрат, $\geq 97\%$, который продается фирмой Sigma-Aldrich под названием Aldrich). Объем
данного раствора определяют так, чтобы получать итоговую смесь, содержащую 2,3%
30 гиалуроновой кислоты.

pH данного раствора корректируют так, чтобы получать pH итоговой смеси,
составляющий от 5,5 до 6,5 перед реакцией, используя разбавленный раствор HCl или
NaOH.

35 Количества реагентов корректируют в соответствии с желательной степенью модификации.

Они находятся в интервале от 5×10^{-3} до 2×10^{-2} моль/моль повторяющихся единиц
гиалуроновой кислоты в отношении полиамина и от 0,5 до 1 моль/моль повторяющихся
единиц гиалуроновой кислоты в отношении активатора и вспомогательного агента
реакции сочетания, участвующих в реакции сочетания. Используемая стехиометрия
40 указана в приведенных примерах.

Для поперечного сшивания водный гель подвергают реакции в течение 7-24 ч при
25°C.

После поперечного сшивания полученный гель очищают посредством нескольких
ванн для диализа в течение периода от 2 до 3 суток и, при необходимости, доводят до
45 физиологического pH.

В водном геле, полученном после промывки, концентрация гиалуроновой кислоты
близка к 20 мг/г.

Для облегчения усилий выдавливания при прохождении геля через иглу, в гель,

полученный выше, затем включают и гомогенизируют поперечно несшитую гиалуроновую кислоту.

Стерилизацию проводят в автоклаве (влажное тепло) при $T^{\circ} \geq 121^{\circ}\text{C}$, так чтобы получить $F_0 > 15$ (показатель стерильности).

5 Пример 2: Получение гелей на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, которые находятся в соответствии с изобретением (со спермином) и являются сравнительными (с HMDA).

Три геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты получают на основе протокола, определенного выше в примере 1.

10 Для данных трех гелей $n\text{HOBt} = n\text{EDC} = n\text{HA}$.

Данные три геля отличаются один от другого по природе рассматриваемого полиамина и/или соотношению «полиамин/гиалуроновая кислота», как проиллюстрировано ниже в настоящем документе в таблице 1. В последнем столбце [HA] указана концентрация гиалуроновой кислоты полученных гелей.

15

Таблица 1:

Поперечно сшитый гель	Поперечно сшивающий агент	Стехиометрия: n полиамина / n HA	[HA], мг/г
A (сравнительный)	HMDA*	0,100	21
B	Спермин	0,020	21
C	Спермин	0,010	21

30

* HMDA = гексаметилендиамин

$n\text{HOBt} = n\text{EDC} = n\text{HA}$

1) Характеристика степени модификации гелей A, B и C

Протокол получения образцов

35 Гели A, B и C промывают/осаждают изопропанолом.

Полученные твердые вещества высушивают и затем солибилизируют в D_2O , и обрабатывают в присутствии гиалуронидазы (тип VI-S, Sigma, 3000 U) в 1 мл D_2O для разрушения геля в целях получения жидкого матрикса для анализа.

40 Полученную гомогенную смесь затем анализируют посредством ^1H ЯМР.

Измерение степени модификации

Характеристику соответствующих степеней модификации гелей A, B и C осуществляют посредством ЯМР-спектроскопии.

45 Для полиаминов ^1H -протонные пики для HMDA при $1,34 \text{ млн}^{-1}$ и для спермина при $1,73 \text{ млн}^{-1}$ оставляют в качестве эталонов.

Степень модификации каждого из трех гелей на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты затем характеризуют с использованием интеграла данных эталонных пиков согласно следующей формуле:

Степень модификации =

X: число протонов пика, оставленного для измерения, то есть 4 для спермина и HMDA.

5 δ - Ацетамид: сдвиг, соответствующий пику ацетамида НА, вследствие этого содержащему 3 протона.

ЯМР-анализ проводят на спектрометре Bruker Avance 1, работающем при 400 МГц (^1H).

Разные результаты и наблюдения обобщены в следующей таблице 2:

10 **Таблица 2**

ГЕЛЬ	$\delta\text{H-эт (млн}^{-1}\text{)}$	X	Степень модификации (%)
15 А (контроль HMDA)	1,34	4	5,0
В	1,73	4	0,7
С	1,73	4	1,0

20 Из таблицы 2, представленной выше, следует, что степени модификации поперечно сшитых гелей В и С согласно изобретению значительно снижены, по сравнению со степенями модификации контрольного геля А.

Гиалуроновая кислота, поперечно сшитая со спермином, вследствие этого, менее модифицирована, чем гиалуроновая кислота, получающаяся в результате поперечного сшивания с HMDA.

2) Характеристика механических свойств

а) вязкоупругие свойства гелей А, В и С характеризуют посредством измерения их модуля упругости G' (в Па) и их фазового угла δ ($^\circ$), измеренных при 1 Гц при напряжении 5 Па.

30 Ниже в данном документе в таблице 3 представлены измеренные значения:

Таблица 3

Гель	Амплитуда градуального изменения (конус/плита)		
	G' (Па), измеренный при $\tau = 5$ Па	δ ($^\circ$), измеренный при $\tau = 5$ Па	τ (Па), измеренное при переходе
35 А (контроль HMDA)	64	48,2	90
40 В	318	10,8	510
45 С	227	18,1	590

Контрольный гель А, несмотря на то, что поперечно сшит с полиамином (HMDA), не является достаточным, так как, несмотря на то, что степень модификации гиалуроновой кислоты является высокой, его механические свойства являются слабыми.

С другой стороны, несмотря на сниженную степень модификации, гели В и С демонстрируют реологическое поведение, которое значительно улучшено, по сравнению со сравнительным гелем А.

б) Устойчивость к стерилизации гелей А, В и С определяют посредством характеристики потери модуля упругости G' (в Па) данных гелей после подвергания стерилизации, проводимой в автоклаве (влажное тепло) при $T \geq 121^\circ\text{C}$, так чтобы получать $F0 > 15$ (показатель стерильности).

Ниже в данном документе в таблице 4 представлены измеренные значения.

Таблица 4

Гель	Амплитуда градуального изменения (конус/плита), измеренная при $t = 5$ Па
	Потеря G' (%)
А (контроль HMDA)	60%
В	23%
С	24%

Контрольный гель А вновь не является удовлетворительным, так как он демонстрирует низкую устойчивость к стерилизации, по сравнению с гелями В и С.

(57) Формула изобретения

1. Гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, который получают в результате поперечного сшивания гиалуроновой кислоты или ее соли в присутствии по меньшей мере эффективного количества по меньшей мере одного эндогенного полиамина в качестве поперечно сшивающего агента, причем поперечное сшивание проводят в присутствии по меньшей мере одного активатора или в присутствии по меньшей мере одного активатора в сочетании с по меньшей мере одним вспомогательным агентом реакции сочетания для проведения реакции ковалентного сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых) эндогенного(ых) полиамина(ов), где указанный гель имеет степень модификации меньше чем или равную 1%, причем степень модификации представляет собой соотношение числа молей эндогенного полиамина, присоединенного к гиалуроновой кислоте, и числа молей гиалуроновой кислоты, образующей указанный поперечно сшитый гель.

2. Гель по п. 1, отличающийся тем, что эндогенный полиамин выбирают из спермидина, спермина, их смеси и предпочтительно спермина.

3. Гель по п. 1, отличающийся тем, что указанный активатор выбирают из водорастворимых карбодиимидов, таких как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), 1-этил-3-(3-триметиламинопропил)карбодиимид (ETC), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимид (CMC), а также их солей, их смесей, и предпочтительно представляет собой EDC.

4. Гель по п. 1, отличающийся тем, что вспомогательный агент реакции сочетания, в том случае, когда он присутствует, выбирают из N-гидроксисукцинимиды (NHS), N-гидроксисбензотриазола (HOBT), 3,4-дигидро-3-гидрокси-4-оксо-1,2,3-бензотриазола (HOObt), 1-гидрокси-7-азабензотриазола (HAt) и N-гидроксисульфосукцинимиды (сульфо-

NHS), их смесей, и предпочтительно представляет собой НОВt.

5. Гель по п. 1, отличающийся тем, что реакцию сочетания проводят в присутствии по меньшей мере EDC и НОВt.

6. Гель по п. 1, где указанный гель имеет степень модификации от 0,1% до 1%, предпочтительно от 0,4% до 0,8%.

7. Гель по п. 1, где величина модуля упругости (G') указанного геля составляет от 20 до 1000 Па, предпочтительно от 40 Па до 400 Па, в сочетании с фазовым углом (δ), составляющим менее 45°.

8. Гель по п. 1, где величина переходного напряжения указанного геля, измеренного способом градуального изменения напряжения, составляет более 100 Па.

9. Способ получения поперечно сшитого геля гиалуроновой кислоты или ее соли, включающий по меньшей мере стадии, заключающиеся в следующем:

а) получают водный гель гиалуроновой кислоты или ее соли в поперечно несшитом состоянии,

б) гель, полученный на стадии а), приводят в контакт с эффективным количеством по меньшей мере одного эндогенного полиамина,

в) осуществляют поперечное сшивание указанной смеси, образованной на стадии б), причем указанное поперечное сшивание проводят в присутствии по меньшей мере одного активатора или в присутствии по меньшей мере одного активатора в сочетании с по меньшей мере одним вспомогательным агентом реакции сочетания для проведения реакции ковалентного сочетания указанной гиалуроновой кислоты и указанного(ых) эндогенного(ых) полиамина(ов), и

г) осуществляют выделение указанного поперечно сшитого гидрогеля.

10. Способ по п. 9, где указанный способ также включает стадию д) остановки поперечного сшивания, причем остановка инициируется естественным путем, если все реагенты расходуются во время стадии в), или ее стимулируют посредством стадии очистки, которая возвращает гель к физиологическому рН и устраняет непрореагировавшие остаточные реагенты, причем данную стадию возможно проводить перед, совместно с или после стадии выделения г).

11. Способ по любому из пп. 9 или 10, отличающийся тем, что эндогенный(ые) полиамин(ы) выбирают из спермидина, спермина, их смеси и предпочтительно спермина.

12. Способ по любому из пп. 9 или 10, отличающийся тем, что эндогенный(ые) полиамин(ы) применяют в содержании от 0,1% до 3%, предпочтительно от 0,5% до 1,5%, по числу молей полиамина(ов) относительно числа молей гиалуроновой кислоты, которые находятся в смеси стадии б).

13. Способ по любому из пп. 9 или 10, отличающийся тем, что гиалуроновую кислоту или ее соль применяют в содержании от 0,5 мас.% до 12 мас.%, предпочтительно от 1 мас.% до 4 мас.% относительно общей массы смеси, полученной в конце стадии б).

14. Способ по любому из пп. 9 или 10, отличающийся тем, что поперечное сшивание проводят в присутствии дополнительного поперечносшивающего агента.

15. Способ по любому из пп. 9 или 10, отличающийся тем, что в нем применяют (i) гиалуронат натрия, (ii) спермин в качестве поперечно сшивающего агента и (iii) EDC в сочетании с НОВt в качестве активатора и вспомогательного агента реакции сочетания, соответственно.

16. Стерильная инъеклируемая дерматологическая композиция, содержащая в физиологически приемлемой среде по меньшей мере один гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, как определено в любом из пп. 1-8.

17. Косметическая или дерматологическая композиция, содержащая по меньшей

мере один гель на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, как определено в любом из пп. 1-8.

18. Набор для хранения по меньшей мере одной дозы геля, как определено в любом из пп. 1-8, или композиции, как определено в п.16, содержащий:

5 - упаковку, содержащую по меньшей мере одну дозу геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, как определено в любом из пп. 1-8, или композицию, как определено в п. 16; и

- устройство для инъектирования в или через кожу или устройство для микроперфорации кожи, предназначенное для введения указанной дозы.

10 19. Применение геля на основе поперечно сшитой гиалуроновой кислоты, как определено в любом из пп. 1-8, или композиции, как определено в п. 16, для заполнения объемных дефектов кожи и, в частности, заполнения морщин.

15

20

25

30

35

40

45