

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090145** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.06.03

(51) Int. Cl. *A61L 27/20* (2006.01)  
*A61L 27/50* (2006.01)  
*A61L 27/52* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.06.26

---

(54) **ТКАНЕВЫЕ ФИЛЛЕРЫ НА ОСНОВЕ ШЕЛКА И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 62/525,131; 62/641,095

(72) Изобретатель:

(32) 2017.06.26; 2018.03.09

Алтман Грегори Х., Сюй Пэн, Цзинь  
Эрлей (US)

(33) US

(86) PCT/US2018/039574

(74) Представитель:

(87) WO 2019/005848 2019.01.03

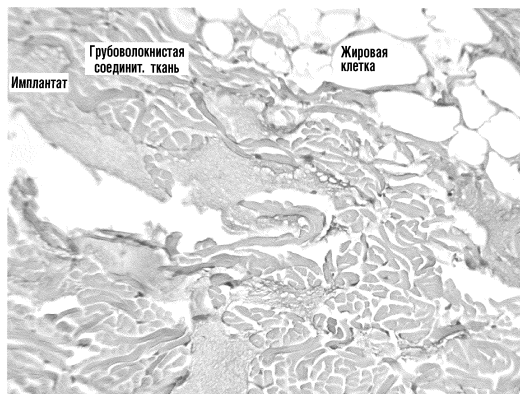
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ИВОЛВД БАЙ НЭЙЧЕР, ИНК. (US)

---

(57) Настоящее изобретение относится к тканевым филлерам на основе гиалуроновой кислоты и фрагментов белка шелка и способам их применения.



**A1**

**202090145**

**202090145**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-561128EA/072

### **ТКАНЕВЫЕ ФИЛЛЕРЫ НА ОСНОВЕ ШЕЛКА И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной патентной заявке США № 62/525131, поданной 26 июня 2017 года, и временной патентной заявке США № 62/641095, поданной 9 марта 2018 года, включенным в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Шелк является природным полимером, продуцируемым различными насекомыми и пауками. Шелк содержит фибриллярный коровый белок фиброин шелка, и клееобразное покрытие, состоящее из нефибриллярного белка серицина. На протяжении истории шелк исследовали для использования в области медицины. Гиалуроновая кислота является гликозаминогликаном, распространенным по всему организму и обнаруживаемым в соединительной и эпителиальной тканях. Из-за ее биосовместимости и структурных преимуществ, она является полезным компонентом в медицинских устройствах и имплантируемых материалах.

Мягкие ткани организма человека частично обязаны своей структурой внеклеточному матриксу, включающему коллаген, эластин и гликозаминогликан. Могут возникать дефекты мягких тканей, искажающие, деформирующие или иным образом изменяющие их структуры. Такую структуру можно восстанавливать с использованием тканевых филлеров, которые могут накапливаться в участке дефекта, исправляя его. Например, тканевые филлеры можно помещать в участок лицевой морщины для ее исправления.

Однако, в этой области необходимы новые тканевые филлеры, с помощью которых можно исправлять ряд дефектов тканей, одновременно обеспечивая их настраиваемые свойства, которые могут сделать возможной адаптацию тканевого филлера к конкретному дефекту ткани.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, содержащему: гликозаминогликан, выбранный из группы, состоящей из гиалуроновой кислоты (НА), карбоксиметилцеллюлозы (СМС), крахмала, альгината, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, ксантановой камеди, хитозана, пектина, агара, каррагенана и гуаровой камеди; и активное средство, выбранное из группы, состоящей из ингибитора фермента, анестезирующего средства, лекарственного нейротоксина, антиоксиданта, противомикробного средства, противовоспалительного средства, блокатора ультрафиолета (УФ), красителя, гормона, иммуносупрессора и противовоспалительного средства; где часть гликозаминогликана перекрестно сшита перекрестно-сшивающими молекулами, содержащими одно или более из алкановой или

алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта; и где перекрестной сшивки достигают с использованием сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства. В некоторых вариантах осуществления гликозаминогликан является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления количество перекрестно-сшитой НА в % масс./масс. относительно общего количества НА составляет приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки перекрестно-сшитой НА составляет от приблизительно 1% до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки перекрестно-сшитой НА составляет приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%,

приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки перекрестно-сшитой НА составляет от приблизительно 1% до приблизительно 15%. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки перекрестно-сшитой НА составляет одно или более из приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14% и приблизительно 15%.

В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитая НА содержит перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую цепь полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство и/или перекрестно-сшивающий предшественник содержит эпокси-группу. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера, диэпокси-линкера, полиэпокси-PEG, диэпокси-PEG, полиглицидил-PEG, диглицидил-PEG, полиакрилат-PEG, диакрила-PEG, 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокси)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-

эпоксипропил)-2,3-эпоксциклогексана, карбодиимида и любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием полифункционального эпокси-соединения, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), диглицидилового простого эфира этиленгликоля (EGDGE), диглицидилового простого эфира 1,6-гександиола, диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диглицидилового простого эфира полипропиленгликоля, диглицидилового простого эфира политетраметилэтиленгликоля, диглицидилового простого эфира неопентилгликоля, полиглицидилового простого эфира полиглицерина, полиглицидилового простого эфира диглицерина, полиглицидилового простого эфира глицерина, полиглицидилового простого эфира три-метилолпропана, полиглицидилового простого эфира пентаэритрита и полиглицидилового простого эфира сорбита. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диэпокси-PEG, диглицидилового простого эфира PEG, бисглицидилового простого эфира полиоксиэтилена, PEGDE и PEGDGE. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, имеющего среднюю  $M_n$  приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000 или приблизительно 6000. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, содержащего от 2 до 25 групп этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера с фиброином шелка, диэпокси-линкера с фиброином шелка, полиэпокси-линкера с фрагментом фиброина шелка, диэпокси-линкера с фрагментом фиброина шелка, полиглицидил-линкера с фиброином шелка, диглицидил-линкера с фиброином шелка, полиглицидил-линкера с фрагментом фиброина шелка и диглицидил-линкера с фрагментом фиброина шелка.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевому филлеру, дополнительно содержащему органическое соединение и/или неорганическое соединение. В некоторых вариантах осуществления неорганическое соединение содержит гидроксипатит кальция. В некоторых вариантах осуществления гидроксипатит кальция составляют в виде частиц, имеющих диаметр от приблизительно 1 мкм до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 1 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 2 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 3 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 4 мкм до приблизительно 15 мкм, от приблизительно 8 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 6 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 7 мкм до приблизительно 20 мкм, от приблизительно 9 мкм до приблизительно 18 мкм или от

приблизительно 10 мкм до приблизительно 25 мкм. В некоторых вариантах осуществления концентрация гидроксиапатита кальция составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления концентрация гидроксиапатита кальция составляет приблизительно 0,001%, приблизительно 0,002%, приблизительно 0,003%, приблизительно 0,004%, приблизительно 0,005%, приблизительно 0,006%, приблизительно 0,007%, приблизительно 0,008%, приблизительно 0,009%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,011%, приблизительно 0,012%, приблизительно 0,013%, приблизительно 0,014%, приблизительно 0,015%, приблизительно 0,016%, приблизительно 0,017%, приблизительно 0,018%, приблизительно 0,019% или приблизительно 0,02%. В некоторых вариантах осуществления концентрация гидроксиапатита кальция составляет приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,15%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,25%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,35%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,45%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,55%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,65%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,75%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,85%, приблизительно 0,9%, приблизительно 0,95%, приблизительно 1%, приблизительно 1,05%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,15%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,25%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,35%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,45%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,55%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,65%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,75%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,85%, приблизительно 1,9%, приблизительно 1,95% или приблизительно 2%. В некоторых вариантах осуществления органическое соединение содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, L-пролина, аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевому филлеру, содержащему НА, где НА получают из бактерий *Streptococcus* или бактерий *Bacillus subtilis*.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, содержащему: гликозаминогликан, выбранный из группы, состоящей из гиалуроновой кислоты (НА), карбоксиметилцеллюлозы (СМС), крахмала, альгината, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, ксантановой камеди, хитозана, пектина, агара, каррагенана и гуаровой камеди; и анестезирующее средство; где часть гликозаминогликана перекрестно сшита перекрестно-сшивающими молекулами, содержащим одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта; и где перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства. В некоторых вариантах осуществления анестезирующее средство является

лидокаином. В некоторых вариантах осуществления концентрация анестезирующего средства в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления концентрация лидокаина в тканевом филлере составляет приблизительно 0,3%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, содержащему: гликозаминогликан, выбранный из группы, состоящей из гиалуроновой кислоты (НА), карбоксиметилцеллюлозы (СМС), крахмала, альгината, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, ксантановой камеди, хитозана, пектина, агара, каррагенана и гуаровой камеди; и анестезирующее средство; где часть гликозаминогликана перекрестно сшита перекрестно-сшивающими молекулами, содержащими одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта; и где перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства; где тканевой филлер представляет собой гель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер представляет собой гидрогель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация НА в тканевом филлере составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация НА в тканевом филлере составляет приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл или приблизительно 30 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация перекрестно-сшитой НА в тканевом филлере составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация перекрестно-сшитой НА в тканевом филлере составляет приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, приблизительно 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл или приблизительно 30 мг/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, содержащему: гликозаминогликан, выбранный из группы, состоящей из гиалуроновой кислоты (НА), карбоксиметилцеллюлозы (СМС), крахмала, альгината, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, ксантановой камеди, хитозана, пектина, агара, каррагенана и гуаровой камеди; и анестезирующее средство; где часть гликозаминогликана перекрестно сшита перекрестно-сшивающими молекулами, содержащими одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и

вторичного спирта; и где перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства; тканевому филлеру, содержащему белок шелка или фрагменты белка шелка (SPF). В некоторых вариантах осуществления белок шелка является фиброином шелка. В некоторых вариантах осуществления белок шелка является фиброином шелка, по существу, не содержащим серицин. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют низкую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления фрагменты белка шелка (SPF) имеют полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют степень кристалличности до 60%. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно сшитой. В некоторых вариантах осуществления количество перекрестно-сшитых SPF в % масс./масс. относительно общего количества SPF составляет приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%,





1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14% и приблизительно 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, содержащему: гликозаминогликан, выбранный из группы, состоящей из гиалуроновой кислоты (НА), карбоксиметилцеллюлозы (СМС), крахмала, альгината, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, ксантановой камеди, хитозана, пектина, агара, каррагенана и гуаровой камеди; и анестезирующее средство; где часть гликозаминогликана перекрестно сшита перекрестно-сшивающими молекулами, содержащими одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта; и где перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства; тканевому филлеру, содержащему белок шелка или фрагменты белка шелка (SPF), где часть SPF перекрестно сшита. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитые SPF содержат перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую алкановую или алкильную цепь и/или эфирную группу. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитые SPF содержат перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую цепь полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитые SPF содержат перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую вторичный спирт. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство и/или перекрестно-сшивающий предшественник содержит эпокси-группу. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера, диэпокси-линкера, полиэпокси-PEG, диэпокси-PEG, полиглицидил-PEG, диглицидил-PEG, полиакрилат-PEG, диакрилат-PEG, 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокси)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана, карбодиимида и любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием полифункционального эпокси-соединения, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), диглицидилового простого эфира этиленгликоля (EGDGE), диглицидилового простого эфира 1,6-гександиола, диглицидилового простого эфира

полиэтиленгликоля, диглицидилового простого эфира полипропиленгликоля, диглицидилового простого эфира политетраметиленгликоля, диглицидилового простого эфира неопентилгликоля, полиглицидилового простого эфира полиглицерина, полиглицидилового простого эфира диглицерина, полиглицидилового простого эфира глицерина, полиглицидилового простого эфира три-метилолпропана, полиглицидилового простого эфира пентаэритрита и полиглицидилового простого эфира сорбита. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диэпокси-PEG, диглицидилового простого эфира PEG, бис-глицидилового простого эфира полиоксиэтилена, PEGDE и PEGDGE. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, имеющего среднюю  $M_n$  приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000 или приблизительно 6000. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, содержащего от 2 до 25 групп этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранных из группы, состоящей из полиэпокси-линкера из фиброина шелка, диэпокси-линкера из фиброина шелка, полиэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, диэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фиброина шелка, диглицидил-линкера из фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка и диглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с НА. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер представляет собой гель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер представляет собой гидрогель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация SPF в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация SPF в тканевом филлере составляет приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,5 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 3,5 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 4,5 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 5,5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 6,5 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 7,5 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 8,5 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 9,5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 10,5 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 11,5 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 12,5 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл,

приблизительно 13,5 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 14,5 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация перекрестно-сшитого SPF в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация перекрестно-сшитого SPF в тканевом филлере составляет приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,5 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 3,5 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 4,5 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 5,5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 6,5 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 7,5 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 8,5 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 9,5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 10,5 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 11,5 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 12,5 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 13,5 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 14,5 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, содержащему: гликозаминогликан, выбранный из группы, состоящей из гиалуроновой кислоты (НА), карбоксиметилцеллюлозы (СМС), крахмала, альгината, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, ксантановой камеди, хитозана, пектина, агара, каррагенана и гуаровой камеди; и анестезирующее средство; где часть гликозаминогликана перекрестно сшита перекрестно-сшивающими молекулами, содержащими одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта; и где перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства; тканевому филлеру, необязательно, содержащему белок шелка или фрагменты белка шелка (SPF), где часть SPF перекрестно сшита. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является дермальным филлером. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является инъектируемым. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер имеет динамический модуль упругости ( $G'$ ) от приблизительно 25 Па до приблизительно 1500 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер имеет динамический модуль упругости ( $G'$ ) приблизительно 25 Па, приблизительно 26 Па, приблизительно 27 Па, приблизительно 28 Па, приблизительно 29 Па, приблизительно 30 Па, приблизительно 31 Па, приблизительно 32 Па, приблизительно 33 Па, приблизительно 34 Па, приблизительно 35 Па, приблизительно 36 Па, приблизительно 37 Па, приблизительно 38 Па, приблизительно 39 Па, приблизительно 40 Па, приблизительно 41 Па, приблизительно 42 Па, приблизительно 43 Па, приблизительно 44 Па, приблизительно 45 Па, приблизительно 46 Па, приблизительно 47 Па, приблизительно 48 Па, приблизительно 49 Па, приблизительно 50 Па, приблизительно 51 Па, приблизительно 52 Па, приблизительно 53 Па, приблизительно 54 Па, приблизительно



состояния у нуждающегося в этом индивидуума и/или способу косметического лечения нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества биосовместимого тканевого филлера, содержащего: гликозаминогликан, выбранный из группы, состоящей из гиалуроновой кислоты (НА), карбоксиметилцеллюлозы (СМС), крахмала, альгината, хондроитин-4-сульфата, хондроитин-6-сульфата, ксантановой камеди, хитозана, пектина, агара, каррагенана и гуаровой камеди; и анестезирующее средство; где часть гликозаминогликана перекрестно сшита перекрестно-сшивающими молекулами, содержащими одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта; и где перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства; тканевой филлер, необязательно, содержащий белок шелка или фрагменты белка шелка (SPF), где часть SPF перекрестно сшита. В некоторых вариантах осуществления состояние является состоянием кожи. В некоторых вариантах осуществления состояние кожи выбрано из группы, состоящей из дегидратация кожи, недостатка эластичности кожи, огрубления кожи, недостатка натяжения кожи, растяжек на коже, бледности кожи, впадин на коже, впалых щек, тонких губ, ретроорбитального дефекта, складки на лице и морщин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер вводят в область дермы индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или области тела. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта или лечение несовершенства лица. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер устойчив к биодеградации, биоэрозии, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 21 дня, приблизительно 28 дней, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления введение тканевого филлера индивидууму приводит к сниженному воспалительному ответу по сравнению с воспалительным ответом, индуцируемым контрольным тканевым филлером, содержащим полисахарид и лидокаин, где контрольный тканевой филлер не включает фрагменты белка шелка (SPF). В некоторых вариантах осуществления введение тканевого филлера индивидууму приводит к повышенной продукции коллагена по сравнению с продукцией коллагена, индуцируемой контрольным тканевым филлером, содержащим полисахарид и лидокаин, где контрольный тканевой филлер не включает фрагменты белка шелка (SPF).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид. В

некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В варианте осуществления настоящее изобретение включает тканевые филлеры, которые можно получать из шелка и гиалуроновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF) со средней молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF) со средней молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 80 кДа до приблизительно 150 кДа.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), которые на приблизительно 0-100% перекрестно сшиты с SPF. В некоторых вариантах осуществления SPF перекрестно сшивали с SPF с использованием сшивающих средств, таких как BDDE, или одного из других перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки составляет до приблизительно 100%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и гиалуроновую кислоту (НА), где приблизительно от 0% до 100% SPF перекрестно сшиты с SPF, и SPF перекрестно сшивали с SPF с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из других перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании, и степень перекрестной сшивки SPF составляет до приблизительно 100%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и гиалуроновую кислоту (НА), где до 100% НА перекрестно сшито с НА с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из других перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления до приблизительно 100% SPF перекрестно сшито с SPF, где SPF перекрестно сшивали с SPF с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из других перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании, и

степень перекрестной сшивки SPF составляет до приблизительно 100%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и гиалуроновую кислоту (НА), где от 0% до 100% НА не является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления до приблизительно 100% SPF являются перекрестно-сшитыми, где SPF перекрестно сшивали с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из других перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании, и степень перекрестной сшивки SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления вся НА не является перекрестно-сшитой.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и гиалуроновую кислоту (НА), где от 0% до 100% SPF перекрестно сшито с НА. В некоторых вариантах осуществления SPF и НА перекрестно сшивали с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из сшивающих средств, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки SPF-НА составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления до 100% НА перекрестно сшито с НА. В некоторых вариантах осуществления НА перекрестно сшивали с НА с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из сшивающих средств, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,1% НА не является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления вся НА не является перекрестно-сшитой.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и гиалуроновую кислоту (НА), где по меньшей мере 0,1% НА не является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления до приблизительно 100% SPF являются перекрестно-сшитыми, где SPF перекрестно сшивали с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из других перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании, и степень перекрестной сшивки SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления вся НА не является перекрестно-сшитой.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и гиалуроновую кислоту (НА), где по меньшей мере 0,1% SPF перекрестно сшито с НА. В некоторых вариантах осуществления SPF и НА перекрестно сшивали с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из перекрестно-сшивающих средств,



представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки SPF-НА составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления до 100% НА перекрестно сшито с НА. В некоторых вариантах осуществления НА перекрестно сшивали с НА с использованием перекрестно-сшивающего средства, такого как BDDE, или одного из перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,1% НА не является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления вся НА не является перекрестно-сшитой.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, где SPF, по существу, не содержит серицин.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому гелевому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому гидрогелевому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, полисахарид и воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, где SPF имеют степень кристалличности от приблизительно 0% до приблизительно 60%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, и дополнительно включающему активное средство. В некоторых вариантах осуществления активное средство может являться ингибитором фермента, анестезирующим средством, лекарственным нейротоксином, антиоксидантом, противомикробным средством, вазодилаторами, отражающим средством, противовоспалительным средством, блокатором ультрафиолета (УФ), красителем, гормоном, иммуносупрессором или противовоспалительным средством. В одном из вариантов осуществления анестезирующее средство является лидокаином.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к инъекционному биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие

полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 Гц. В одном из вариантов осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 1 Гц.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения биосовместимого тканевого филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, включающему получение раствора SPF и добавление к раствору усилителя желирования, который может являться любым донором протонов.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения биосовместимого тканевого филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, включающему получение раствора SPF и подвергание раствора механическому возбуждению.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения состояния у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества биосовместимого тканевого филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид. В некоторых вариантах осуществления состояние является состоянием кожи. В некоторых вариантах осуществления состояние кожи может являться дегидратацией кожи, недостатком эластичности кожи, огрублением кожи, недостатком натяжения кожи, растяжками на коже, бледностью кожи, впадинами на коже, впалыми щеками, впалой височной областью, тонкими губами, ретроорбитальным дефектом, складками на лице или морщинами.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу косметического лечения нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества биосовместимого тканевого филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают введение биосовместимого тканевого филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, в область дермы индивидуума.

В одном из вариантов осуществления способ по изобретению, включающий введение биосовместимого тканевого филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, может представлять собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или

области тела.

В одном из вариантов осуществления способ по изобретению, включающий введение биосовместимого тканевого филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, может представлять собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта или лечение несовершенства лица.

В одном из вариантов осуществления биосовместимый тканевой филлер, включающий фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, вводимый способом по изобретению, устойчив к биодegradации, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней после введения.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биодegradуемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно-сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно-сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (HA). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биодegradуемым. В некоторых вариантах осуществления

часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную

массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду.

В некоторых вариантах осуществления количество перекрестно-сшитого SPF в % масс./масс. относительно общего количества SPF составляет до приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%,





приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство и/или перекрестно-сшивающий предшественник содержат эпокси-группу. В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная



сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство и/или перекрестно-сшивающий предшественник содержат эпокси-группу. В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокси)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира

пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана, карбодиимида и любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (HA). В некоторых вариантах осуществления перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из 1,4-бис(2,3-эпоксипропокс)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокс)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана, карбодиимида и любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гелю биосовместимого тканевого филлера, например, гелю дермального филлера, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В

некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления гель дополнительно содержит воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гелю биосовместимого тканевого филлера, например, гелю дермального филлера, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления гель дополнительно содержит воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гидрогелю биосовместимого тканевого филлера, например, гидрогелю дермального филлера, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до

приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления гидрогель дополнительно содержит воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гидрогелю биосовместимого тканевого филлера, например, гидрогелю дермального филлера, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления гидрогель дополнительно содержит воду.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от

приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF имеет степень кристалличности до приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60% или более 60%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида

перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF имеет степень кристалличности до приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60% или более 60%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку

нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит активное средство. В некоторых вариантах осуществления активное средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора фермента, анестезирующего средства, лекарственного нейротоксина, антиоксиданта, противомикробных средств, противовоспалительного средства, блокатора ультрафиолета (УФ), красителя, гормона, иммуносупрессора и противовоспалительного средства. В некоторых вариантах осуществления анестезирующее средство является лидокаином.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, например, дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит активное средство. В некоторых вариантах осуществления активное средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора фермента, анестезирующего средства, лекарственного нейротоксина, антиоксиданта, противомикробного средства, противовоспалительного средства, блокатора ультрафиолета (УФ), красителя, гормона, иммуносупрессора и противовоспалительного средства. В некоторых вариантах осуществления анестезирующее средство является лидокаином.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому инъекционному тканевому филлеру, например, инъекционному дермальному филлеру,

включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому инъецируемому тканевому филлеру, например, инъецируемому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, имеющему динамический модуль упругости ( $G'$ ) от приблизительно 50 Па до приблизительно 1500 Па, например, дермальному филлеру, имеющему



динамический модуль упругости ( $G'$ ) от приблизительно 50 Па до приблизительно 1500 Па, филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (HA). В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 Гц. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 1 Гц.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, имеющему динамический модуль упругости ( $G'$ ) от приблизительно 50 Па до приблизительно 1500 Па, например, дермальному филлеру, имеющему динамический модуль упругости ( $G'$ ) от приблизительно 50 Па до приблизительно 1500 Па, филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка включает перекрестную сшивку с помощью химических связей. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой перекрестную сшивку нулевой длины. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления

часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 Гц. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 1 Гц.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения биосовместимого тканевого филлера, например, дермального филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, включающему получение композиции, содержащей SPF и полисахарид, и добавление в раствор перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника, активирующего средства или усилителя желирования, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения биосовместимого тканевого филлера, например, дермального филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, включающему получение композиции, содержащей SPF и полисахарид, и добавление в раствор перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника, активирующего средства или усилителя желирования, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых

вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения состояния у нуждающегося в этом индивидуума, например, состояния кожи, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества биосовместимого тканевого филлера, например, дермального филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления состояние кожи выбрано из группы, состоящей из дегидратации кожи,

недостатка эластичности кожи, огрубления кожи, недостатка натяжения кожи, растяжек на коже, бледности кожи, впадин на коже, впалых щек, тонких губ, ретроорбитального дефекта, складок на лице и морщин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер вводят в область дермы индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или области тела. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта или лечение несовершенства лица. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер устойчив к биодеградации, биоэрозии, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 21 дня, приблизительно 28 дней, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения состояния у нуждающегося в этом индивидуума, например, состояния кожи, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества биосовместимого тканевого филлера, например, дермального филлера, включающего фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биодеградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления состояние кожи выбрано из группы, состоящей из дегидратации кожи, недостатка эластичности кожи, огрубления кожи, недостатка натяжения кожи, растяжек на коже, бледности кожи, впадин на коже, впалых щек, тонких губ, ретроорбитального дефекта, складок на лице и морщин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер вводят в область дермы

индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или области тела. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта или лечение несовершенства лица. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер устойчив к биодеградации, биоэрозии, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 21 дня, приблизительно 28 дней, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу косметического лечения нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества биосовместимого тканевого филлера, например, дермального филлера, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа или от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биодеградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (HA). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер вводят в область дермы индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или области тела. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта

или лечение несовершенства лица. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер устойчив к биодеградации, биоэрозии, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 21 дня, приблизительно 28 дней, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу косметического лечения нуждающегося в этом индивидуума, способ включающий введение индивидууму эффективного количества биосовместимого тканевого филлера, например, дермального филлера, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, и полисахарид, при этом SPF имеют низкую молекулярную массу, среднюю молекулярную массу и/или высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биодеградируемым. В некоторых вариантах осуществления часть SPF является перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть SPF перекрестно сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления часть полисахарида перекрестно-сшита с полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает перекрестно-сшивающие молекулы, например, перекрестно-сшивающие молекулы на основе эпокси-групп. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестной сшивки представляет собой аутоперекрестную сшивку. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитых SPF составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления часть перекрестно сшитого полисахарида составляет до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления полисахарид является гиалуроновой кислотой (НА). В некоторых вариантах осуществления SPF, по существу, не содержит серицин. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер вводят в область дермы индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или области тела. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта или лечение несовершенства лица. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер устойчив к биодеградации, биоэрозии, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 21 дня, приблизительно 28 дней, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к биосовместимому тканевому филлеру, содержащему гиалуроновую кислоту (НА) и анестезирующее

средство, где часть НА модифицируют с помощью одной или более линкерных молекул, содержащих одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта, где линкерные молекулы присоединяют к НА на один конец линкера. В некоторых вариантах осуществления модификацию осуществляют с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства. В некоторых вариантах осуществления НА в тканевом филлере имеет степень модификации (MoD) приблизительно 10,0%, приблизительно 10,1%, приблизительно 10,2%, приблизительно 10,3%, приблизительно 10,4%, приблизительно 10,5%, приблизительно 10,6%, приблизительно 10,7%, приблизительно 10,8%, приблизительно 10,9%, приблизительно 11,0%, приблизительно 11,1%, приблизительно 11,2%, приблизительно 11,3%, приблизительно 11,4%, приблизительно 11,5%, приблизительно 11,6%, приблизительно 11,7%, приблизительно 11,8%, приблизительно 11,9%, приблизительно 12,0%, приблизительно 12,1%, приблизительно 12,2%, приблизительно 12,3%, приблизительно 12,4%, приблизительно 12,5%, приблизительно 12,6%, приблизительно 12,7%, приблизительно 12,8%, приблизительно 12,9%, приблизительно 13,0%, приблизительно 13,1%, приблизительно 13,2%, приблизительно 13,3%, приблизительно 13,4%, приблизительно 13,5%, приблизительно 13,6%, приблизительно 13,7%, приблизительно 13,8%, приблизительно 13,9%, приблизительно 14,0%, приблизительно 14,1%, приблизительно 14,2%, приблизительно 14,3%, приблизительно 14,4%, приблизительно 14,5%, приблизительно 14,6%, приблизительно 14,7%, приблизительно 14,8%, приблизительно 14,9%, приблизительно 15,0%, приблизительно 15,1%, приблизительно 15,2%, приблизительно 15,3%, приблизительно 15,4%, приблизительно 15,5%, приблизительно 15,6%, приблизительно 15,7%, приблизительно 15,8%, приблизительно 15,9%, приблизительно 16,0%, приблизительно 16,1%, приблизительно 16,2%, приблизительно 16,3%, приблизительно 16,4%, приблизительно 16,5%, приблизительно 16,6%, приблизительно 16,7%, приблизительно 16,8%, приблизительно 16,9%, приблизительно 17,0%, приблизительно 17,1%, приблизительно 17,2%, приблизительно 17,3%, приблизительно 17,4%, приблизительно 17,5%, приблизительно 17,6%, приблизительно 17,7%, приблизительно 17,8%, приблизительно 17,9%, приблизительно 18,0%, приблизительно 18,1%, приблизительно 18,2%, приблизительно 18,3%, приблизительно 18,4%, приблизительно 18,5%, приблизительно 18,6%, приблизительно 18,7%, приблизительно 18,8%, приблизительно 18,9%, приблизительно 19,0%, приблизительно 19,1%, приблизительно 19,2%, приблизительно 19,3%, приблизительно 19,4%, приблизительно 19,5%, приблизительно 19,6%, приблизительно 19,7%, приблизительно 19,8%, приблизительно 19,9% или приблизительно 20,0%. В некоторых вариантах осуществления количество модифицированной НА в % масс./масс. относительно общего количества НА в тканевом филлере составляет приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%,





приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления степень перекрестной сшивки перекрестно-сшитой НА составляет от приблизительно 1% до приблизительно 15%.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная или перекрестно-сшитая НА содержит линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую цепь полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство и/или перекрестно-сшивающий предшественник содержит эпокси-группу. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера, диэпокси-линкера, полиэпокси-PEG, диэпокси-PEG, полиглицидил-PEG, диглицидил-PEG, полиакрилат-PEG, диакрилат-PEG, 1,4-бис(2,3-эпоксипропокс)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокс)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана, карбодиимида и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием полифункционального эпокси-соединения, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), диглицидилового простого эфира этиленгликоля (EGDGE), диглицидилового простого эфира 1,6-гександиола, диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диглицидилового простого эфира полипропиленгликоля, диглицидилового простого эфира политетраметиленгликоля, диглицидилового простого эфира неопентилгликоля, полиглицидилового простого эфира полиглицерина, полиглицидилового простого эфира диглицерина, полиглицидилового простого эфира глицерина, полиглицидилового простого эфира три-метилолпропана, полиглицидилового простого эфира пентаэритрита и полиглицидилового простого эфира

сорбита. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диэпокси-PEG, диглицидилового простого эфира PEG, бис-глицидилового простого эфира полиоксиэтилена, PEGDE и PEGDGE. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, имеющего среднюю  $M_n$  приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000 или приблизительно 6000. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, содержащего от приблизительно 2 до приблизительно 25 групп этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера из фиброина шелка, диэпокси-линкера из фиброина шелка, полиэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, диэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фиброина шелка, диглицидил-линкера из фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка и диглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно включает органическое соединение и/или неорганическое соединение. В некоторых вариантах осуществления неорганическое соединение содержит гидроксиапатит кальция. В некоторых вариантах осуществления гидроксиапатит кальция составляют в виде частиц, имеющих диаметр от приблизительно 1 мкм до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 1 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 2 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 3 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 4 мкм до и приблизительно 15 мкм, от приблизительно 8 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 6 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 7 мкм до приблизительно 20 мкм, от приблизительно 9 мкм до приблизительно 18 мкм или от приблизительно 10 мкм до приблизительно 25 мкм. В некоторых вариантах осуществления концентрация гидроксиапатита кальция составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления концентрация гидроксиапатита кальция составляет приблизительно 0,001%, приблизительно 0,002%, приблизительно 0,003%, приблизительно 0,004%, приблизительно 0,005%, приблизительно 0,006%, приблизительно 0,007%, приблизительно 0,008%, приблизительно 0,009%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,011%, приблизительно 0,012%, приблизительно 0,013%, приблизительно 0,014%, приблизительно 0,015%, приблизительно 0,016%, приблизительно 0,017%, приблизительно 0,018%, приблизительно 0,019% или приблизительно 0,02%. В некоторых вариантах

осуществления концентрация гидроксиапатита кальция составляет приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,15%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,25%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,35%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,45%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,55%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,65%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,75%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,85%, приблизительно 0,9%, приблизительно 0,95%, приблизительно 1%, приблизительно 1,05%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,15%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,25%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,35%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,45%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,55%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,65%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,75%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,85%, приблизительно 1,9%, приблизительно 1,95%, или приблизительно 2%. В некоторых вариантах осуществления органическое соединение содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, L-пролина, аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

В некоторых вариантах осуществления НА получают из бактерий *Streptococcus* или бактерий *Bacillus subtilis*. В некоторых вариантах осуществления активное средство является лидокаином. В некоторых вариантах осуществления концентрация активного средства в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 5%. В некоторых вариантах осуществления концентрация лидокаина в тканевом филлере составляет приблизительно 0,3%.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, представляет собой гель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер представляет собой гидрогель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация НА в тканевом филлере составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация НА в тканевом филлере составляет приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл или приблизительно 30 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация модифицированной или перекрестно-сшитой НА в тканевом филлере составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация модифицированного или перекрестно-сшитого НА в тканевом филлере составляет приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, приблизительно 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл,

приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл или приблизительно 30 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления описанный тканевой филлер дополнительно включает белок шелка или фрагменты белка шелка (SPF). В некоторых вариантах осуществления белок шелка является фиброином шелка. В некоторых вариантах осуществления белок шелка является фиброином шелка, по существу, не содержащим серицин. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют низкую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют среднюю молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют высокую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления фрагменты белка шелка (SPF) имеют полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В некоторых вариантах осуществления SPF имеют степень кристалличности до 60%.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевому филлеру, включающему HA и SPF, где часть SPF является модифицированной или перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления количество модифицированных или перекрестно-сшитых SPF в % масс./масс. относительно общего количества SPF составляет приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%,



приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления степень модификации или перекрестной сшивки модифицированных или перекрестно-сшитых SPF составляет от приблизительно 1% до приблизительно 15%. В некоторых вариантах осуществления степень модификации или перекрестной сшивки модифицированных или перекрестно-сшитых SPF составляет одно или более из приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14% и приблизительно 15%.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные или перекрестно-сшитые SPF содержат линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую алкановую или алкильную цепь и/или эфирную группу, где линкер или перекрестно-сшивающую молекулу присоединяют к SPF на одном конце линкера или перекрестно-сшивающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления модифицированные или перекрестно-сшитые SPF содержат линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую цепь полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах осуществления модифицированные или перекрестно-сшитые SPF содержат линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую вторичный спирт. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства, модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства. В некоторых вариантах осуществления модифицирующее или перекрестно-сшивающее средство и/или модифицирующий или перекрестно-сшивающий предшественник содержит эпокси-группы. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства, модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера, диэпокси-линкера, полиэпокси-PEG, диэпокси-PEG, полиглицидил-PEG, адиглицидил-PEG, полиакрилат-PEG, диакрилат-PEG, 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокси)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана, карбодиимида и любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием полифункционального эпокси-соединения, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), диглицидилового

простого эфира этиленгликоля (EGDGE), диглицидилового простого эфира 1,6-гександиола, диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диглицидилового простого эфира полипропиленгликоля, диглицидилового простого эфира политетраметиленгликоля, диглицидилового простого эфира неопентилгликоля, полиглицидилового простого эфира полиглицерина, полиглицидилового простого эфира диглицерина, полиглицидилового простого эфира глицерина, полиглицидилового простого эфира три-метилолпропана, полиглицидилового простого эфира пентаэритрита и полиглицидилового простого эфира сорбита.

В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства и/или модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диэпоксипег, диглицидилового простого эфира PEG, бис-глицидилового простого эфира полиоксиэтилена, PEGDE и PEGDGE. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, имеющего среднюю  $M_n$  приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000 или приблизительно 6000. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, содержащего от приблизительно 2 до приблизительно 25 групп этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства и/или модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из полиэпоксид-линкера из фиброина шелка, диэпоксид-линкера из фиброина шелка, полиэпоксид-линкера из фрагмента фиброина шелка, диэпоксид-линкера из фрагмента фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фиброина шелка, диглицидил-линкера из фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка и диглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевому филлеру, включающему HA и SPF, где часть SPF перекрестно сшита с HA. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевому филлеру, включающему HA и SPF, где часть SPF перекрестно сшита с SPF. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер представляет собой гель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер представляет собой гидрогель. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация SPF в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация SPF в тканевом филлере составляет приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,5 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 3,5 мг/мл,

приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 4,5 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 5,5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 6,5 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 7,5 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 8,5 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 9,5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 10,5 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 11,5 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 12,5 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 13,5 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 14,5 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация модифицированных или перекрестно-сшитых SPF в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация модифицированных или перекрестно-сшитых SPF в тканевом филлере составляет приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,5 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 3,5 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 4,5 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 5,5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 6,5 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 7,5 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 8,5 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 9,5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 10,5 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 11,5 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 12,5 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 13,5 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 14,5 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевому филлеру, включающему модифицированную или перекрестно-сшитую НА и/или модифицированные или перекрестно-сшитые SPF, где тканевой филлер является дермальным филлером. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является биodeградируемым. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер является инъекцируемым. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер имеет динамический модуль упругости ( $G'$ ) от приблизительно 25 Па до приблизительно 1500 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер имеет динамический модуль упругости ( $G'$ ) приблизительно 25 Па, приблизительно 26 Па, приблизительно 27 Па, приблизительно 28 Па, приблизительно 29 Па, приблизительно 30 Па, приблизительно 31 Па, приблизительно 32 Па, приблизительно 33 Па, приблизительно 34 Па, приблизительно 35 Па, приблизительно 36 Па, приблизительно 37 Па, приблизительно 38 Па, приблизительно 39 Па, приблизительно 40 Па, приблизительно 41 Па, приблизительно 42 Па, приблизительно 43 Па, приблизительно 44 Па, приблизительно 45 Па, приблизительно 46 Па, приблизительно 47 Па, приблизительно 48 Па, приблизительно 49 Па, приблизительно 50 Па, приблизительно 51 Па, приблизительно 52 Па, приблизительно 53 Па, приблизительно 54 Па, приблизительно 55 Па, приблизительно 56 Па, приблизительно 57 Па, приблизительно 58 Па, приблизительно 59 Па, приблизительно 60 Па,



приблизительно 61 Па, приблизительно 62 Па, приблизительно 63 Па, приблизительно 64 Па, приблизительно 65 Па, приблизительно 66 Па, приблизительно 67 Па, приблизительно 68 Па, приблизительно 69 Па, приблизительно 70 Па, приблизительно 71 Па, приблизительно 72 Па, приблизительно 73 Па, приблизительно 74 Па, приблизительно 75 Па, приблизительно 76 Па, приблизительно 77 Па, приблизительно 78 Па, приблизительно 79 Па, приблизительно 80 Па, приблизительно 81 Па, приблизительно 82 Па, приблизительно 83 Па, приблизительно 84 Па, приблизительно 85 Па, приблизительно 86 Па, приблизительно 87 Па, приблизительно 88 Па, приблизительно 89 Па, приблизительно 90 Па, приблизительно 91 Па, приблизительно 92 Па, приблизительно 93 Па, приблизительно 94 Па, приблизительно 95 Па, приблизительно 96 Па, приблизительно 97 Па, приблизительно 98 Па, приблизительно 99 Па, приблизительно 100 Па, приблизительно 101 Па, приблизительно 102 Па, приблизительно 103 Па, приблизительно 104 Па, приблизительно 105 Па, приблизительно 106 Па, приблизительно 107 Па, приблизительно 108 Па, приблизительно 109 Па, приблизительно 110 Па, приблизительно 111 Па, приблизительно 112 Па, приблизительно 113 Па, приблизительно 114 Па, приблизительно 115 Па, приблизительно 116 Па, приблизительно 117 Па, приблизительно 118 Па, приблизительно 119 Па, приблизительно 120 Па, приблизительно 121 Па, приблизительно 122 Па, приблизительно 123 Па, приблизительно 124 Па или приблизительно 125 Па. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 Гц. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 1 Гц. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 5 Гц. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 10 Гц. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер имеет комплексную вязкость от приблизительно 1 Па·с до приблизительно 10 Па·с. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер имеет комплексную вязкость приблизительно 1 Па·с, приблизительно 1,5 Па·с, приблизительно 2 Па·с, приблизительно 2,5 Па·с, приблизительно 3 Па·с, приблизительно 3,5 Па·с, приблизительно 4 Па·с, приблизительно 4,5 Па·с, приблизительно 5 Па·с, приблизительно 5,5 Па·с, приблизительно 6 Па·с, приблизительно 6,5 Па·с, приблизительно 7 Па·с, приблизительно 7,5 Па·с, приблизительно 8 Па·с, приблизительно 8,5 Па·с, приблизительно 9 Па·с, приблизительно 9,5 Па·с или приблизительно 10 Па·с. В некоторых вариантах осуществления комплексную вязкость измеряют посредством колебательного напряжения от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 Гц. В некоторых вариантах осуществления комплексную вязкость измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 1 Гц. В некоторых вариантах осуществления комплексную вязкость измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 5 Гц.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения состояния у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму

терапевтически эффективного количества тканевого филлера, включающего модифицированную или перекрестно-сшитую НА, и/или модифицированные или перекрестно-сшитые SPF. В некоторых вариантах осуществления состояние является состоянием кожи. В некоторых вариантах осуществления состояние кожи выбрано из группы, состоящей из дегидратации кожи, недостатка эластичности кожи, огрубления кожи, недостатка натяжения кожи, растяжек на коже, бледности кожи, впадин на коже, впалых щек, тонких губ, ретроорбитального дефекта, складок на лице и морщин.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу косметического лечения нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества тканевого филлера, включающего модифицированную или перекрестно-сшитую НА и/или модифицированные или перекрестно-сшитые SPF. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер вводят в область дермы индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или области тела. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта или лечение несовершенства лица.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем описании, тканевой филлер устойчив к биодеградации, биоэрозии, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 21 дня, приблизительно 28 дней, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем описании, введение тканевого филлера индивидууму приводит к сниженному воспалительному ответу по сравнению с воспалительным ответом, индуцируемым контрольным тканевым филлером, содержащим полисахарид и лидокаин, где контрольный тканевой филлер не включает фрагменты белка шелка (SPF).

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем описании, введение тканевого филлера индивидууму приводит к повышенной продукции коллагена по сравнению с продукцией коллагена, индуцируемой контрольным тканевым филлером, содержащим полисахарид и лидокаин, где контрольный тканевой филлер не включает фрагменты белка шелка (SPF).

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Описанные варианты осуществления будут дополнительно объяснены со ссылкой на сопутствующие чертежи. Представленные чертежи не обязательно показаны в масштабе, вместо этого, как правило, сделан акцент на иллюстрировании принципов описанных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 1 представляет собой блок-схему, на которой показаны различные варианты

осуществления для получения чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка (SPF) по настоящему изобретению.

Фиг. 2 представляет собой блок-схему, на которой показаны различные параметры, которые можно модифицировать во время получения SPF по настоящему изобретению на стадиях экстракции и растворения.

Фиг. 3 является таблицей, в которой приведена концентрация LiBr и карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) в растворах белка шелка по настоящему изобретению.

Фиг. 4 является таблицей, в которой приведена концентрация LiBr и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в растворах белка шелка по настоящему изобретению.

Фиг. 5 является таблицей, в которой приведены молекулярные массы в растворах белка шелка по настоящему изобретению.

Фиг. 6 и 7 представляют собой графики, на которых показан эффект объема извлечения на % потери массы.

Фиг. 8 является таблицей, в которой приведены молекулярные массы шелка, растворенного при разных концентрациях LiBr и разных масштабах экстракции и растворения.

Фиг. 9 является графиком, на котором показан эффект времени экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции  $100^\circ\text{C}$ , LiBr при  $100^\circ\text{C}$  и растворения в печи при  $100^\circ\text{C}$  (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 10 является графиком, на котором показан эффект времени экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции  $100^\circ\text{C}$ , кипящего LiBr и растворения в печи при  $60^\circ\text{C}$  (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 11 является графиком, на котором показан эффект времени экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции  $100^\circ\text{C}$ , LiBr при  $60^\circ\text{C}$  и растворения в печи  $60^\circ\text{C}$  (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 12 является графиком, на котором показан эффект времени экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции  $100^\circ\text{C}$ , LiBr при  $80^\circ\text{C}$  и растворения в печи  $80^\circ\text{C}$  (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 13 является графиком, на котором показан эффект времени экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции  $100^\circ\text{C}$ , LiBr при  $80^\circ\text{C}$  и растворения в печи при  $60^\circ\text{C}$  (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 14 является графиком, на котором показан эффект времени экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции  $100^\circ\text{C}$ , LiBr при  $100^\circ\text{C}$  и растворения в печи при  $60^\circ\text{C}$  (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 15 является графиком, на котором показан эффект времени экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, LiBr при 140°C и растворения в печи 140°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 16 является графиком, на котором показан эффект температуры экстракции в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях времени экстракции 60 минут, LiBr при 100°C и растворения в печи при 100°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 17 является графиком, на котором показан эффект температуры LiBr в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях времени экстракции 60 минут, температуры экстракции 100°C и растворения в печи при 60°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 18 является графиком, на котором показан эффект температуры LiBr в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях времени экстракции 30 минут, температуры экстракции 100°C и растворения в печи при 60°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 19 является графиком, на котором показан эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 30 минут и бромида лития при 100°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 20 является графиком, на котором показан эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 60 минут и бромида лития при 100°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 21 является графиком, на котором показан эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 60 минут и бромида лития при 140°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 22 является графиком, на котором показан эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени 30 минут экстракции и бромида лития при 140°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 23 является графиком, на котором показан эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 60 минут и бромида лития при 80°C (время в печи/растворения варьировали).

Фиг. 24 является графиком, на котором приведены молекулярные массы шелка, обрабатываемого в различных условиях, включающих время экстракции, температуру экстракции, температуру бромида лития (LiBr), температуру печи для растворения, время в печи для растворения.

Фиг. 25 является графиком, на котором приведены молекулярные массы шелка, обрабатываемого в условиях, когда температура печи/растворения равна температуре LiBr.

Фиг. 26 является изображением составов шелка/НА в воде или фосфатно-солевом буфере (PBS) при различных концентрациях, где показано, что составы шелка/НА приводят к получению гомогенных, непрозрачных растворов. Первый немаркированный флакон является контрольным флаконом (22 мг/мл НА в воде).

Фиг. 27 является изображением водных составов шелка/НА, набранных в шприцы, где показано, что составы шелка/НА приводят к получению гомогенных, непрозрачных растворов. Контроль представлял собой раствор 22 мг/мл НА в вода.

Фиг. 28 является графиком, на котором показан профиль деградации гидрогелей шелк-НА и НА.

Фиг. 29 является изображением интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали контрольный дермальный филлер (коммерчески доступный филлер с НА, включающий лидокаин); повышенную степень воспаления отражает объем гранулематозных областей. Коммерчески доступный филлер обозначен как синий/серый материал. Гранулематозное воспаление, ассоциированное с материалом, можно наблюдать через 7 дней.

Фиг. 30 является изображением интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали контрольный дермальный филлер (коммерчески доступный филлер с НА, включающий лидокаин); коммерчески доступный продукт обозначен как синий/серый материал. Через 30 дней можно наблюдать воспаление с фиброзом.

Фиг. 31 является изображением интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (24 мг/мл НА, 9,6 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый BDDE); уменьшенные гранулематозные области по сравнению с контрольной инъекцией свидетельствуют о незначительном остром воспалительном ответе и лучшей биodeградируемости филлера шелк-НА по сравнению с контролем. Наблюдали очень небольшое воспаление через 7 дней. Воспаление является фокальным, и временами его трудно обнаружить. Не обнаруживали материал имплантата.

Фиг. 32 является изображением интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (24 мг/мл НА, 9,6 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый BDDE); через 30 дней воспаление крайне сложно обнаружить, и оно было минимальным. Не обнаруживали материал имплантата.

Фиг. 33 является изображением интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (24 мг/мл НА, 0,48 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый BDDE); введение филлера приводило к фокальному слабому воспалению за 7 дней. Воспаление являлось хроническим. Для этого воспаления потребовалась тщательная оценка, т.к. оно было фокальным и минимальным. Не обнаруживали материал имплантата.

Фиг. 34 является изображением интрадермальной области морской свинки,

которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (24 мг/мл НА, 0,48 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый BDDE); на изображении, полученном через 30 дней, показано даже меньшее воспаление. Его было даже труднее идентифицировать, чем имплантаты через 7 дней. Не обнаруживали материал имплантата.

Фиг. 35 является графиком, на котором показано измерение мутности гидрогеля шелк-НА. Черная кривая (а): стандартное пропускание; красная кривая (b): пропускание и прямое рассеяние.

Фиг. 36 является графиком, на котором показано измерение мутности гидрогеля НА без шелка. Черная кривая (а): стандартное пропускание; красная кривая (b): пропускание и прямое рассеяние.

Фиг. 37 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали контрольный дермальный филлер.

Фиг. 38 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер НА по изобретению (24 мг/мл НА, перекрестно-сшитый PEGDE, образец С4 - таблица 25).

Фиг. 39 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (22,8 мг/мл НА, 1,2 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец L - таблица 25).

Фиг. 40 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (23,76 мг/мл НА, 0,24 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец M - таблица 25).

Фиг. 41 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (22,8 мг/мл НА, 1,2 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец N - таблица 25).

Фиг. 42 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (22,8 мг/мл НА, 1,2 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец O - таблица 25).

Фиг. 43 является графиком, на котором показаны результаты гистологического анализа на деградацию геля через 7 дней после имплантации (составы в таблице 25 - составы перекрестно-сшитого BDDE являлись наиболее деградировавшими; баллы: 0 - норма; 1 - минимальная; 2 - слабая; 3 - умеренная и 4 - тяжелая).

Фиг. 44 является графиком, на котором показаны результаты гистологического анализа на миграцию геля через 7 дней после имплантации (составы в таблице 25; баллы: 0 - норма; 1 - минимальная; 2 - слабая; 3 - умеренная и 4 - тяжелая).

Фиг. 45 является графиком, на котором показаны результаты гистологического

анализа на воспаление через 7 дней после имплантации (составы в таблице 25 - не наблюдали некроз тканей, не наблюдали свертывания крови, и наблюдали минимальное отложение коллагена на контрольном составе и некоторых из тестируемых составов; баллы: 0 - норма; 1 - минимальная; 2 - слабая; 3 - умеренная и 4 - тяжелая).

Фиг. 46 является графиком, на котором показаны результаты гистологического анализа на макрофагов через 7 дней после имплантации (составы в таблице 25; баллы: 0 - норма; 1 - минимальная; 2 - слабая; 3 - умеренная и 4 - тяжелая).

На фиг. 47А и 47В показан  $G'$  гидрогелей с различными концентрациями шелка до и после диализа. Фиг. 47А: смешанная перекрестно-сшитая НА при 100 мг/мл, и фиг. 47В: перекрестно-сшитая НА одной MW при 25 мг/мл.

На фиг. 48А и 48В показана степень набухания гидрогеля с различными концентрациями шелка во время диализа. Фиг. 48А: смешанная перекрестно-сшитая НА при 100 мг/мл, и фиг. 48В: перекрестно-сшитая НА одной MW при 25 мг/мл.

На фиг. 49А и 49В показаны калибровочные кривые для растворов шелка средней и низкой молекулярной массы, соответственно.

На фиг. 50А и 50В показаны спектры поглощения разведенных гелей шелк-НА с неизвестной концентрацией шелка; теоретическая концентрация шелка (мг/мл) показана для каждого образца геля шелк-НА в таблице 26.

На фиг. 51 показано измерение мутности гидрогеля НА без шелка (красный; более высокое пропускание по всему интервалу длины волны) и с 3 мг/мл шелка (синий; более низкое пропускание по всему интервалу длины волны); более высокий % пропускания свидетельствует о менее мутном образце с меньшей оптической мутностью.

Хотя описанные выше чертежи соответствуют описываемым вариантам осуществления, также предусмотрены другие варианты осуществления, как указано в описании. В описании представлены иллюстративные варианты осуществления, не предназначенные для ограничения изобретения. Специалисты в этой области могут осуществлять многочисленные другие модификации и варианты осуществления, попадающие в объем и соответствующие сущности принципов описываемых вариантов осуществления настоящего изобретения.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к тканевым филлерам, включающим фрагменты белка шелка (SPF). В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры получают из композиций, представленных в настоящем описании, которые могут включать SPF и гиалуроновую кислоту (НА). В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут являться дермальными филлерами.

В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры получают способом, представленным в настоящем описании, с использованием НА, имеющей MW от приблизительно 5 кДа до приблизительно 5 МДа, от приблизительно 100 кДа до приблизительно 4 МДа, или от приблизительно 500 кДа до приблизительно 3 МДа. В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры получают способом,

представленным в настоящем описании, с использованием НА, имеющей MW приблизительно 50 кДа, приблизительно 100 кДа, приблизительно 150 кДа, приблизительно 200 кДа, приблизительно 250 кДа, приблизительно 300 кДа, приблизительно 350 кДа, приблизительно 400 кДа, приблизительно 450 кДа, приблизительно 500 кДа, приблизительно 550 кДа, приблизительно 600 кДа, приблизительно 650 кДа, приблизительно 700 кДа, приблизительно 750 кДа, приблизительно 800 кДа, приблизительно 850 кДа, приблизительно 900 кДа, приблизительно 950 кДа, приблизительно 1000 кДа, приблизительно 1050 кДа, приблизительно 1100 кДа, приблизительно 1150 кДа, приблизительно 1200 кДа, приблизительно 1250 кДа, приблизительно 1300 кДа, приблизительно 1350 кДа, приблизительно 1400 кДа, приблизительно 1450 кДа, приблизительно 1500 кДа, приблизительно 1550 кДа, приблизительно 1600 кДа, приблизительно 1650 кДа, приблизительно 1700 кДа, приблизительно 1750 кДа, приблизительно 1800 кДа, приблизительно 1850 кДа, приблизительно 1900 кДа, приблизительно 1950 кДа, приблизительно 2000 кДа, приблизительно 2050 кДа, приблизительно 2100 кДа, приблизительно 2150 кДа, приблизительно 2200 кДа, приблизительно 2250 кДа, приблизительно 2300 кДа, приблизительно 2350 кДа, приблизительно 2400 кДа, приблизительно 2450 кДа, приблизительно 2500 кДа, приблизительно 2550 кДа, приблизительно 2600 кДа, приблизительно 2650 кДа, приблизительно 2700 кДа, приблизительно 2750 кДа, приблизительно 2800 кДа, приблизительно 2850 кДа, приблизительно 2900 кДа, приблизительно 2950 кДа, приблизительно 3000 кДа, приблизительно 3050 кДа, приблизительно 3100 кДа, приблизительно 3150 кДа, приблизительно 3200 кДа, приблизительно 3250 кДа, приблизительно 3300 кДа, приблизительно 3350 кДа, приблизительно 3400 кДа, приблизительно 3450 кДа, приблизительно 3500 кДа, приблизительно 3550 кДа, приблизительно 3600 кДа, приблизительно 3650 кДа, приблизительно 3700 кДа, приблизительно 3750 кДа, приблизительно 3800 кДа, приблизительно 3850 кДа, приблизительно 3900 кДа, приблизительно 3950 кДа или приблизительно 4000 кДа. НА с любой из указанных выше MW можно смешивать с НА с любой другой из указанных выше MW в любых возможных пропорциях. В некоторых вариантах осуществления дермальный филлер получают посредством смешивания НА с высокой MW с НА с низкой MW, где НА с высокой MW имеет долю приблизительно 0,01%, или приблизительно 0,1%, или приблизительно 0,2%, или приблизительно 0,3%, или приблизительно 0,4%, или приблизительно 0,5%, или приблизительно 0,6%, или приблизительно 0,7%, или приблизительно 0,8%, или приблизительно 0,9%, или приблизительно 1%, или приблизительно 2%, или приблизительно 3%, или приблизительно 4%, или приблизительно 5%, или приблизительно 6%, или приблизительно 7%, или приблизительно 8%, или приблизительно 9%, или приблизительно 10%, или приблизительно 11%, или приблизительно 12%, или приблизительно 13%, или приблизительно 14%, или приблизительно 15%, или приблизительно 16%, или приблизительно 17%, или





приблизительно 28 кДа, или приблизительно 29 кДа или приблизительно 30 кДа.

В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры получают способом, представленным в настоящем описании, с использованием начальной концентрации НА приблизительно 80 мг/мл, или приблизительно 81 мг/мл, или приблизительно 82 мг/мл, или приблизительно 83 мг/мл, или приблизительно 84 мг/мл, или приблизительно 85 мг/мл, или приблизительно 86 мг/мл, или приблизительно 87 мг/мл, или приблизительно 88 мг/мл, или приблизительно 89 мг/мл, или приблизительно 90 мг/мл, или приблизительно 91 мг/мл, или приблизительно 92 мг/мл, или приблизительно 93 мг/мл, или приблизительно 94 мг/мл, или приблизительно 95 мг/мл, или приблизительно 96 мг/мл, или приблизительно 97 мг/мл, или приблизительно 98 мг/мл, или приблизительно 99 мг/мл, или приблизительно 100 мг/мл, или приблизительно 101 мг/мл, или приблизительно 102 мг/мл, или приблизительно 103 мг/мл, или приблизительно 104 мг/мл, или приблизительно 105 мг/мл, или приблизительно 106 мг/мл, или приблизительно 107 мг/мл, или приблизительно 108 мг/мл, или приблизительно 109 мг/мл, или приблизительно 110 мг/мл, или приблизительно 111 мг/мл, или приблизительно 112 мг/мл, или приблизительно 113 мг/мл, или приблизительно 114 мг/мл, или приблизительно 115 мг/мл, или приблизительно 116 мг/мл, или приблизительно 117 мг/мл, или приблизительно 118 мг/мл, или приблизительно 119 мг/мл, или приблизительно 120 мг/мл или более.

В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры, представленные в настоящем описании, имеют концентрацию SPF шелка приблизительно 0,1%, или приблизительно 0,2%, или приблизительно 0,3%, или приблизительно 0,4%, или приблизительно 0,5%, или приблизительно 0,6%, или приблизительно 0,7%, или приблизительно 0,8%, или приблизительно 0,9%, или приблизительно 1%, или приблизительно 1,1%, или приблизительно 1,2%, или приблизительно 1,3%, или приблизительно 1,4%, или приблизительно 1,5%, или приблизительно 1,6%, или приблизительно 1,7%, или приблизительно 1,8%, или приблизительно 1,9%, или приблизительно 2%, или приблизительно 2,1%, или приблизительно 2,2%, или приблизительно 2,3%, или приблизительно 2,4%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,6%, или приблизительно 2,7%, или приблизительно 2,8%, или приблизительно 2,9%, или приблизительно 3%, или приблизительно 3,1%, или приблизительно 3,2%, или приблизительно 3,3%, или приблизительно 3,4%, или приблизительно 3,5%, или приблизительно 3,6%, или приблизительно 3,7%, или приблизительно 3,8%, или приблизительно 3,9%, или приблизительно 4%, или приблизительно 4,1%, или приблизительно 4,2%, или приблизительно 4,3%, или приблизительно 4,4%, или приблизительно 4,5%, или приблизительно 4,6%, или приблизительно 4,7%, или приблизительно 4,8%, или приблизительно 4,9% или приблизительно 5% от всей НА и SPF шелка.

В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры получают способом, представленным в настоящем описании, с использованием кросслинкера PEGDE,

имеющего  $M_n$  приблизительно 100, приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400, приблизительно 500, приблизительно 600, приблизительно 700, приблизительно 800, приблизительно 900, приблизительно 1000, приблизительно 1100 или приблизительно 1200.

В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры получают способом, представленным в настоящем описании, с использованием условий реакции, включающих стадию перекрестной сшивки при приблизительно 35°C, приблизительно 36°C, приблизительно 37°C, приблизительно 38°C, приблизительно 39°C, приблизительно 40°C, приблизительно 41°C, приблизительно 42°C, приблизительно 43°C, приблизительно 44°C, приблизительно 45°C, приблизительно 46°C, приблизительно 47°C, приблизительно 48°C, приблизительно 49°C, приблизительно 50°C, приблизительно 51°C, приблизительно 52°C, приблизительно 53°C, приблизительно 54°C или приблизительно 55°C. В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры получают способом, представленным в настоящем описании, с использованием условий реакции, включающих стадию перекрестной сшивки в течение приблизительно 15 минут, приблизительно 16 минут, приблизительно 17 минут, приблизительно 18 минут, приблизительно 19 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 21 минуты, приблизительно 22 минут, приблизительно 23 минут, приблизительно 24 минут, приблизительно 25 минут, приблизительно 26 минут, приблизительно 27 минут, приблизительно 28 минут, приблизительно 29 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 31 минуты, приблизительно 32 минут, приблизительно 33 минут, приблизительно 34 минут, приблизительно 35 минут, приблизительно 36 минут, приблизительно 37 минут, приблизительно 38 минут, приблизительно 39 минут, приблизительно 40 минут, приблизительно 41 минуты, приблизительно 42 минут, приблизительно 43 минут, приблизительно 44 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 46 минут, приблизительно 47 минут, приблизительно 48 минут, приблизительно 49 минут, приблизительно 50 минут, приблизительно 51 минуты, приблизительно 52 минут, приблизительно 53 минут, приблизительно 54 минут, приблизительно 55 минут, приблизительно 56 минут, приблизительно 57 минут, приблизительно 58 минут, приблизительно 59 минут, приблизительно 60 минут, приблизительно 61 минуты, приблизительно 62 минут, приблизительно 63 минут, приблизительно 64 минут или приблизительно 65 минут.

В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры включают свободную НА, например, не-перекрестно-сшитую НА. В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры включают приблизительно 0,1%, или приблизительно 0,2%, или приблизительно 0,3%, или приблизительно 0,4%, или приблизительно 0,5%, или приблизительно 0,6%, или приблизительно 0,7%, или приблизительно 0,8%, или приблизительно 0,9%, или приблизительно 1%, или приблизительно 1,1%, или приблизительно 1,2%, или приблизительно 1,3%, или приблизительно 1,4%, или приблизительно 1,5%, или приблизительно 1,6%, или приблизительно 1,7%, или



10,3%, приблизительно 10,4%, приблизительно 10,5%, приблизительно 10,6%, приблизительно 10,7%, приблизительно 10,8%, приблизительно 10,9%, приблизительно 11,0%, приблизительно 11,1%, приблизительно 11,2%, приблизительно 11,3%, приблизительно 11,4%, приблизительно 11,5%, приблизительно 11,6%, приблизительно 11,7%, приблизительно 11,8%, приблизительно 11,9%, приблизительно 12,0%, приблизительно 12,1%, приблизительно 12,2%, приблизительно 12,3%, приблизительно 12,4%, приблизительно 12,5%, приблизительно 12,6%, приблизительно 12,7%, приблизительно 12,8%, приблизительно 12,9%, приблизительно 13,0%, приблизительно 13,1%, приблизительно 13,2%, приблизительно 13,3%, приблизительно 13,4%, приблизительно 13,5%, приблизительно 13,6%, приблизительно 13,7%, приблизительно 13,8%, приблизительно 13,9%, приблизительно 14,0%, приблизительно 14,1%, приблизительно 14,2%, приблизительно 14,3%, приблизительно 14,4%, приблизительно 14,5%, приблизительно 14,6%, приблизительно 14,7%, приблизительно 14,8%, приблизительно 14,9%, приблизительно 15,0%, приблизительно 15,1%, приблизительно 15,2%, приблизительно 15,3%, приблизительно 15,4%, приблизительно 15,5%, приблизительно 15,6%, приблизительно 15,7%, приблизительно 15,8%, приблизительно 15,9%, приблизительно 16,0%, приблизительно 16,1%, приблизительно 16,2%, приблизительно 16,3%, приблизительно 16,4%, приблизительно 16,5%, приблизительно 16,6%, приблизительно 16,7%, приблизительно 16,8%, приблизительно 16,9%, приблизительно 17,0%, приблизительно 17,1%, приблизительно 17,2%, приблизительно 17,3%, приблизительно 17,4%, приблизительно 17,5%, приблизительно 17,6%, приблизительно 17,7%, приблизительно 17,8%, приблизительно 17,9%, приблизительно 18,0%, приблизительно 18,1%, приблизительно 18,2%, приблизительно 18,3%, приблизительно 18,4%, приблизительно 18,5%, приблизительно 18,6%, приблизительно 18,7%, приблизительно 18,8%, приблизительно 18,9%, приблизительно 19,0%, приблизительно 19,1%, приблизительно 19,2%, приблизительно 19,3%, приблизительно 19,4%, приблизительно 19,5%, приблизительно 19,6%, приблизительно 19,7%, приблизительно 19,8%, приблизительно 19,9% или приблизительно 20,0%.

В некоторых вариантах осуществления дермальные филлеры имеют силу инъекционного введения приблизительно 5 Н, приблизительно 6 Н, приблизительно 7 Н, приблизительно 8 Н, приблизительно 9 Н, приблизительно 10 Н, приблизительно 11 Н, приблизительно 12 Н, приблизительно 13 Н, приблизительно 14 Н, приблизительно 15 Н, приблизительно 16 Н, приблизительно 17 Н, приблизительно 18 Н, приблизительно 19 Н, приблизительно 20 Н, приблизительно 21 Н, приблизительно 22 Н, приблизительно 23 Н, приблизительно 24 Н или приблизительно 25 Н. В некоторых вариантах осуществления сила инъекционного введения относится к инъекции через иглу 30G.

Тканевые филлеры по настоящему изобретению включают композиции, дополнительно включающие один или более компонентов, таких как SPF, например, перекрестно-сшитые SPF и/или не-перекрестно-сшитые SPF, гиалуроновая кислота, например, перекрестно-сшитая НА и/или не-перекрестно-сшитая НА. В рамках

изобретения термин "перекрестно-сшитые SPF" относится к SPF, перекрестно-сшитым с идентичными или неидентичными SPF. Перекрестно-сшитые SPF также можно обозначать как гомо-перекрестно-сшитые SPF. В рамках изобретения термин "перекрестно-сшитая HA" относится к HA, перекрестно-сшитой с идентичной или неидентичной HA. Перекрестно-сшитую HA также можно обозначать как гомо-перекрестно-сшитая HA. Тканевые филлеры по настоящему изобретению также могут включать SPF, перекрестно-сшитые с HA, и/или HA, перекрестно-сшитую с SPF. SPF, перекрестно-сшитые с HA, и/или HA, перекрестно-сшитую с SPF, также можно обозначать как перекрестно-сшитые SPF-HA или гетеро-перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению являются монофазными. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению являются двухфазными или многофазными. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению включают не-перекрестно-сшитую полимерную фазу, например, не-перекрестно-сшитые SPF и/или не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению включают перекрестно-сшитую фазу, например, перекрестно-сшитые SPF и/или перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению включают жидкую фазу, например, воду и/или водный раствор. В некоторых вариантах осуществления водный раствор может включать SPF. В некоторых вариантах осуществления водная фаза может включать HA. В некоторых вариантах осуществления жидкая фаза может включать не-перекрестно-сшитый полимер, такой как не-перекрестно-сшитая HA и/или не-перекрестно-сшитые SPF.

В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению содержит фазу носителя. В связи с этим, описываемые композиции могут являться монофазными или многофазными композициями. В рамках изобретения термин "фаза носителя" является синонимом "носителя" и относится к материалу, используемому для повышения текучести гидрогеля. Носитель, предпочтительно, является физиологически приемлемым носителем и может включать один или более общепринятых эксципиентов, которые можно использовать в фармацевтических композициях. В рамках изобретения термин "физиологически приемлемый носитель" относится к носителю, соответствующему или характерному для нормального функционирования живого организма. В связи с этим, введение композиции, содержащей гидрогель и носитель, по существу, не имеет длительного или перманентного неблагоприятного эффекта при введении млекопитающему. Тканевые филлеры по настоящему изобретению включают носитель, где основная часть объема приходится на воду или физиологический раствор. Однако, другие носители, которые можно использовать, включают любой физиологически переносимый материал, улучшающийся в результате экструдированности или intrudability гидрогеля через иглу или в целевую среду в организме-хозяине. Потенциальные носители могут включать, в качестве неограничивающих примеров, физиологические буферные растворы, сыворотку, другие растворы белков, гели, состоящие из полимеров,

включающих белки, гликопротеины, протеогликаны или полисахариды. Любые из указанных потенциальных носителей могут являться природными носителями, полностью синтетическими носителями или их комбинациями.

В одном из вариантов осуществления композиция, представленная в настоящем описании, включает один или более из модифицированных SPF, перекрестно-сшитых SPF, не-перекрестно-сшитых SPF, модифицированной HA, перекрестно-сшитой HA, не-перекрестно-сшитой HA, гомо-перекрестно-сшитых SPF, гомо-перекрестно-сшитой HA и гетеро-перекрестно-сшитых SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF и не-перекрестно-сшитые SPF. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF и не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF и перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают не-перекрестно-сшитые SPF и не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают не-перекрестно-сшитые SPF и перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают не-перекрестно-сшитые SPF и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитые SPF и не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитые SPF и перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитые SPF и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA и не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают не-перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA и не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают не-перекрестно-сшитые SPF,

перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании включают не-перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA и не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA, не-перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают не-перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA, не-перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF, не-перекрестно-сшитые SPF, перекрестно-сшитую HA, не-перекрестно-сшитую HA и перекрестно-сшитые SPF-HA.

В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые SPF. В некоторых вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, включают SPF и гиалуроновую кислоту (HA). В одном из аспектов композиции на основе SPF/HA, представленные в настоящем описании, включают перекрестно-сшитые молекулы HA. В некоторых вариантах осуществления композиции включают перекрестно-сшитые молекулы SPF-HA. В некоторых вариантах осуществления композиции включают не-перекрестно-сшитую HA. В некоторых вариантах осуществления композиции могут включать не-перекрестно-сшитые SPF. В некоторых вариантах осуществления композиции могут включать по меньшей мере одно дополнительное средство. В некоторых вариантах осуществления композиции включают перекрестно-сшитые SPF-SPF, SPF-HA и/или HA-HA с разной стабильностью, что приводит к получению композиций с различной степенью биоабсорбируемости и/или биорезорбируемости.

В некоторых вариантах осуществления HA перекрестно-сшита в матрице. В некоторых вариантах осуществления в матрице HA инкапсулируют или полуинкапсулируют один или более SPF. В некоторых вариантах осуществления HA перекрестно-сшита с одним или более SPF.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры или их части являются биосовместимыми, биodeградируемыми, биоабсорбируемыми, биорезорбируемыми или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры,



представленные в настоящем описании, включают жидкий компонент, например, однокомпонентную жидкость или раствор, включающий, по существу, одну или более жидкостей. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры включают воду или водный раствор. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры являются инъекруемыми, имплантируемыми или вводимыми под кожу любыми способами, известными в этой области, например, после хирургической резекции ткани. В некоторых вариантах осуществления композиции представляют собой дермальные филлеры. В некоторых вариантах осуществления композиции являются стерильными.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать приблизительно 1% (масс./масс.) SPF и приблизительно 0,3% (масс./масс.) лидокаина.

Настоящее изобретение относится к способам производства композиций, включающих фрагменты белка шелка (SPF) и гиалуроновую кислоту (НА), способам введения композиций, включающих SPF и НА, и способам лечения с использованием композиций, включающих SPF и НА.

#### Определения

В рамках изобретения термин "фиброин" включает фиброин, белок шелка тутового шелкопряда, насекомого или паука, или рекомбинантный фиброин шелка. В варианте осуществления фиброин получают из *Bombyx mori*.

В рамках изобретения термины "по существу, не содержит серицин" или "по существу, не содержащий серицин" относятся к волокнам шелка, из которого удалена основная часть белка серицина, и/или SPF, полученным из волокон шелка, из которых удалена основная часть белка серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 10,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 9,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 8,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 7,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 6,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 5,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 5,0% (масс./масс.) серицина.

серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,05% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,1% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 0,5% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 1,0% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 1,5% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 2,0% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, содержащим от приблизительно 2,5% (масс./масс.) до приблизительно 4,0% (масс./масс.) серицина. В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, имеющим содержание серицина от приблизительно 0,01% (масс./масс.) до приблизительно 0,1% (масс./масс.). В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, имеющим содержание серицина ниже приблизительно 0,1% (масс./масс.). В варианте осуществления термин "фиброин шелка и SPF, по существу, не содержащие серицин" относится к фиброину шелка и SPF, имеющим содержание серицина ниже приблизительно 0,05% (масс./масс.). В варианте осуществления, если источник шелка добавляют к кипящему (100°C) водному раствору карбоната натрия при времени обработки от приблизительно 30 минут до приблизительно 60 минут, достигают потери при обесклеивании от приблизительно 26% масс. до приблизительно 31% масс.

В рамках изобретения термин "по существу, гомогенный" может относиться к чистым фрагментам белка на основе фиброина шелка, имеющим нормальное распределение относительно идентифицированной молекулярной массы. В рамках изобретения термин "по существу гомогенный" может относиться к равномерному распределению добавки, например, лидокаина, по всей композиции по настоящему изобретению.

В рамках изобретения термин "по существу, не содержит неорганические примеси"

означает, что композиция содержит 0,1% (масс./масс.) примесей или менее. В варианте осуществления термин "по существу, не содержит неорганические примеси" относится к композиции, содержащей 0,05% (масс./масс.) примесей или менее. В варианте осуществления термин "по существу, не содержит неорганические примеси" относится к композиции, содержащей 0,01% (масс./масс.) примесей или менее. В варианте осуществления количество неорганических примесей составляет от 0 м.д. ("неопределимо" или "ND") до 1000 м.д. В варианте осуществления количество неорганических примесей составляет от ND до приблизительно 500 м.д. В варианте осуществления количество неорганических примесей составляет от ND до приблизительно 400 м.д. В варианте осуществления количество неорганических примесей составляет от ND до приблизительно 300 м.д. В варианте осуществления количество неорганических примесей составляет от ND до приблизительно 200 м.д. В варианте осуществления количество неорганических примесей составляет от ND до приблизительно 100 м.д. В варианте осуществления количество неорганических примесей составляет от 10 м.д. до 1000 м.д.

В рамках изобретения термин "по существу, не содержит органические примеси" означает, что композиция содержит 0,1% (масс./масс.) примесей или менее. В варианте осуществления термин "по существу, не содержит органические примеси" относится к композиции, содержащей 0,05% (масс./масс.) примесей или менее. В варианте осуществления термин "по существу, не содержит органические примеси" относится к композиции, содержащей 0,01% (масс./масс.) примесей или менее. В варианте осуществления количество органических примесей составляет от 0 м.д. ("неопределимо" или "ND") до 1000 м.д. В варианте осуществления количество органических примесей составляет от ND до приблизительно 500 м.д. В варианте осуществления количество органических примесей составляет от ND до приблизительно 400 м.д. В варианте осуществления количество органических примесей составляет от ND до приблизительно 300 м.д. В варианте осуществления количество органических примесей составляет от ND до приблизительно 200 м.д. В варианте осуществления количество органических примесей составляет от ND до приблизительно 100 м.д. В варианте осуществления количество органических примесей составляет от 10 м.д. до 1000 м.д.

В рамках изобретения термин "не-перекрестно-сшитый" относится к отсутствию межмолекулярных связей, соединяющих отдельные полимерные молекулы матрицы, макромолекулы и/или мономерные цепи. В связи с этим, не-перекрестно-сшитый полимер матрицы не соединен с каким-либо другим полимером матрицы с помощью внутримолекулярной цепи.

Тканевые филлеры, композиции или их части по настоящему изобретению проявляют "биосовместимость" или являются "биосовместимыми", что означает, что композиции совместимы с живой тканью или живой системой, не являясь, по существу, токсичными, вредными или физиологически реактивными и не вызывая иммунологическое отторжение. Термин "биосовместимый" включает термины

"биоабсорбируемый", "биорезорбируемый" и "биodeградируемый", определенные в настоящем описании.

Тканевые филлеры, композиции или их части по настоящему изобретению могут являться "биоабсорбируемыми", "биорезорбируемыми" и/или "биodeградируемыми". В рамках изобретения термин "биоабсорбируемый" относится к материалам или веществам, распадающимся после имплантации в организм, независимо от механизма распада, такого как растворение, деградация, абсорбция и экскреция. В рамках изобретения термин "биорезорбируемый" означает способный абсорбироваться организмом. В рамках изобретения термин "биodeградируемый" относится к материалам, разрушающимся в физиологических условиях на побочные продукты. Такие физиологические условия включают, например, гидролиз (разрушение посредством гидролитического расщепления), ферментативный катализ (ферментативную деградацию), механические взаимодействия и т.п. В рамках изобретения термин "биodeградируемый" также включает термин "биорезорбируемый", означающий материал или вещество, разрушающееся в физиологических условиях до продуктов, подвергающихся биорезорбции в организме-хозяине, а именно, становящихся метаболитами биохимических систем организма-хозяина. В рамках изобретения термины "биорезорбируемый" и "биорезорбция" включают такие процессы, как клеточно-опосредованная деградация, ферментативная деградация и/или гидролитическая деградация биорезорбируемого полимера, и/или элиминация биорезорбируемого полимера из живой ткани, как будет понятно специалисту в этой области. В некоторых вариантах осуществления композиции и материалы SPF-НА, представленные в настоящем описании, могут являться биосовместимыми, биорезорбируемыми, биоабсорбируемыми и/или биodeградируемыми.

Если тканевые филлеры по настоящему изобретению являются биodeградируемыми или биорезорбируемыми, они могут быть устойчивыми к биodeградации или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 1 дня, или по меньшей мере приблизительно 2 дней, или по меньшей мере приблизительно 3 дней, или по меньшей мере приблизительно 4 дней, по меньшей мере приблизительно 5 дней, или по меньшей мере приблизительно 10 дней, или по меньшей мере приблизительно 15 дней, или по меньшей мере приблизительно 20 дней, или по меньшей мере приблизительно 25 дней, или по меньшей мере приблизительно 30 дней, или по меньшей мере приблизительно 35 дней, или по меньшей мере приблизительно 40 дней, или по меньшей мере приблизительно 45 дней, или по меньшей мере приблизительно 50 дней, или по меньшей мере приблизительно 60 дней, или по меньшей мере приблизительно 70 дней, или по меньшей мере приблизительно 80 дней, или по меньшей мере приблизительно 90 дней, или по меньшей мере приблизительно 100 дней, или по меньшей мере приблизительно 110 дней, или по меньшей мере приблизительно 120 дней, или по меньшей мере приблизительно 130 дней, или по меньшей мере приблизительно 140 дней, или по меньшей мере приблизительно 140 дней, или по меньшей мере приблизительно 160 дней, или по меньшей мере



года, или по меньшей мере приблизительно 2 лет, или они могут быть устойчивыми к биоабсорбции в течение менее приблизительно 5 дней, или не более приблизительно 10 дней, или не более приблизительно 15 дней, или не более приблизительно 20 дней, или не более приблизительно 25 дней, или не более приблизительно 30 дней, или не более приблизительно 35 дней, или не более приблизительно 40 дней, или не более приблизительно 45 дней, или не более приблизительно 50 дней, или не более приблизительно 60 дней, или не более приблизительно 70 дней, или не более приблизительно 80 дней, или не более приблизительно 90 дней, или не более приблизительно 100 дней, или не более приблизительно 110 дней, или не более приблизительно 120 дней, или не более приблизительно 130 дней, или не более приблизительно 140 дней, или не более приблизительно 140 дней, или не более приблизительно 150 дней, или не более приблизительно 160 дней, или не более приблизительно 170 дней, или не более приблизительно 180 дней, или не более приблизительно 190 дней, или не более приблизительно 200 дней, или не более приблизительно 250 дней, или не более приблизительно 300 дней, или не более приблизительно 1 года или не более приблизительно 2 лет.

Как представлено в настоящем описании, степень биодеградации, биоабсорбции и биорезорбции можно модифицировать и/или контролировать, например, добавляя в композиции, представленные в настоящем описании, одно или более средств, задерживающих биодеградацию, биоабсорбцию и/или биорезорбцию. Кроме того, степень биодеградации, биоабсорбции и биорезорбции можно модифицировать и/или контролировать, повышая или снижая степень перекрестной сшивки полимеров, присутствующих в полимерных материалах, представленных в настоящем описании. Например, скорость биодеградации, биоабсорбции и/или биорезорбции композиций, представленных в настоящем описании, можно повышать, снижая степень перекрестной сшивки в полимерных материалах, представленных в настоящем описании. Альтернативно, скорость биодеградации, биоабсорбции и/или биорезорбции тканевых филлеров и композиций, представленных в настоящем описании, можно снижать, повышая степень перекрестной сшивки в полимерных материалах, представленных в настоящем описании.

Тканевые филлеры и композиции по настоящему изобретению являются "гипоаллергенными", что означает, что маловероятно, что они вызовут аллергическую реакцию. Такую гипоаллергенность могут подтверждать участники исследования местно, нанося композиции по настоящему изобретению на кожу на длительный период времени. В варианте осуществления длительный период времени составляет приблизительно 3 дня. В варианте осуществления длительный период времени составляет приблизительно 7 дней. В варианте осуществления длительный период времени составляет приблизительно 14 дней. В варианте осуществления длительный период времени составляет приблизительно 21 день. В варианте осуществления длительный период времени составляет приблизительно 30 дней. В варианте осуществления длительный период

времени выбран из группы, состоящей из приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, приблизительно 12 месяцев и бесконечности.

В рамках изобретения термин "низкомолекулярный" шелк относится к фрагментам белка шелка, имеющим молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления целевая низкая молекулярная масса для некоторых фрагментов белка шелка может составлять приблизительно 11 кДа.

В рамках изобретения "среднемолекулярный" шелк относится к фрагментам белка шелка, имеющим молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 20 кДа до приблизительно 55 кДа. В некоторых вариантах осуществления целевая низкая молекулярная масса для некоторых фрагментов белка шелка может составлять приблизительно 40 кДа.

В рамках изобретения термин "высокомолекулярный" шелк относится к фрагментам белка шелка, имеющим молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 55 кДа до приблизительно 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления целевая низкая молекулярная масса для некоторых фрагментов белка шелка может составлять от приблизительно 100 кДа до приблизительно 145 кДа.

В некоторых вариантах осуществления молекулярные массы, представленные в настоящем описании, например, в отношении низкомолекулярных SPF, среднемолекулярных SPF, высокомолекулярных SPF, можно преобразовывать в приблизительно количество аминокислот, содержащихся в соответствующих природных или рекомбинантных белках, таких как природные или рекомбинантные белки шелка, как будет понятно специалисту в этой области. Например, средняя масса аминокислоты может составлять приблизительно 110 дальтон, т.е. 110 г/моль. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления разделение молекулярной массы линейного белка на 110 дальтон можно использовать для приблизительного определения количества аминокислотных остатков в нем.

В рамках изобретения термин "полидисперсность" относится к мере распределения молекулярной массы в указанном образце полимера. Полидисперсность можно вычислять посредством разделения средневзвешенной молекулярной массы ( $M_w$ ) на среднечисловую молекулярную массу ( $M_n$ ). В рамках изобретения термин "средневзвешенная молекулярная масса" ( $M_w$ ), как правило, относится к измерению молекулярной массы, зависящему от долей полимерных молекул в соответствии с их размерами.

Средневзвешенную молекулярную массу можно определять по формуле: 
$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$
, где  $M_i$  является молекулярной массой цепи, а  $N_i$  является количеством цепей с такой

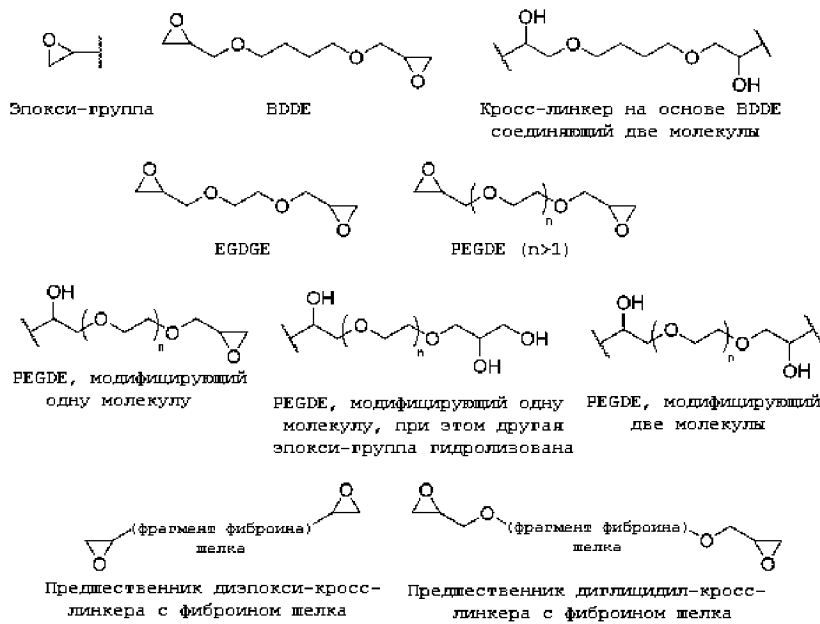
молекулярной массой. В рамках изобретения термин "среднечисловая молекулярная масса" ( $M_n$ ), как правило, относится к измерению молекулярной массы, вычисляемой посредством разделения общей массы всех молекул полимеров в образце на общее количество молекул полимеров в образце. Среднечисловую молекулярную массу можно определять по формуле: 
$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$
, где  $M_i$  является молекулярной массой цепи, а  $N_i$  является количеством цепей с такой молекулярной массой. Например, монодисперсный полимер, в котором все полимерные цепи равны, имеет полидисперсность ( $M_w/M_n$ ) 1. В основном, средние значения молекулярной массы можно определять посредством гелепроникающей хроматографии (GPC) и эксклюзионной хроматографии (SEC). Чем больше индекс полидисперсности, тем шире диапазон молекулярной массы.

В рамках изобретения термин "тканевой филлер" в широком смысле относится к материалу, который можно вводить в мягкую ткань и вокруг нее для добавления объема, добавления поддержки или другого лечения недостаточности мягкой ткани. Термин "тканевой филлер" также включает дермальные филлеры; однако, термин "дермальный филлер" не следует истолковывать как накладывающий какое-либо ограничение на локализацию и тип введения такого филлера. Несмотря на это, дермальные филлеры, представленные в настоящем описании, как правило, могут включать использование и введение таких дермальных филлеров на множестве уровней под кожей. В рамках изобретения термин "мягкая ткань" может относиться к тканям, соединяющим, поддерживающим или окружающим другие структуры и органы тела. Например, мягкие ткани, представленные в настоящем описании, могут включать, в качестве неограничивающих примеров, кожу, дермальные ткани, субдермальные ткани, кожные ткани, подкожные ткани, интрадуральную ткань, мышцы, сухожилия, связки, фиброзные ткани, жир, кровеносные сосуды и артерии, нервы и синовиальные (интрадермальные) ткани.

В рамках изобретения термин "кросслинкер на основе эпокси-группы" относится к молекулярному мостику между двумя молекулами в одной или разных полимерных цепях, получаемых с использованием перекрестно-сшивающего предшественника, включающего эпокси-группу, например, диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля (PEGDE, или PEGDGE) или полиэпокси-линкера с фиброином шелка или фрагментом фиброина шелка. Без желания быть связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что при реакции с активным центром в полимерной цепи, включенном в боковую цепь полимера, эпоксидное кольцо открывается с образованием вторичного спирта и новой связи (схема 1). Реакционноспособные группы включают, в качестве неограничивающих примеров, нуклеофильные группы, такие как карбоксильные группы, аминогруппы или гидроксильные группы.

Схема 1





В рамках изобретения термин "ауто-перекрестная сшивка" относится к а) перекрестной сшивке между двумя цепями полимеров схожей химической природы, например, перекрестной сшивке между двумя цепями гиалуроновой кислоты или перекрестной сшивке между двумя цепями SPF, или б) перекрестной сшивке между перекрестно-сшивающими группами на одной полимерной цепи с образованием циклического сложного эфира (лактона), циклического амида, циклической конструкции, включающей перекрестно-сшивающую молекулу, или т.п., например, перекрестной сшивке между двумя группами на одной цепи гиалуроновой кислоты или перекрестной сшивке между двумя группами на одной цепи SPF.

В рамках изобретения термины "перекрестная сшивка нулевой длины", и/или "перекрестная сшивка, включающая связь", и/или "перекрестная сшивка с использованием активирующего средства" относятся к перекрестной сшивке между двумя группами на отдельных полимерных цепях или одной полимерной цепи, где группы реагируют непосредственно друг с другом, и между ними не встраивается дополнительная перекрестно-сшивающая молекула. Перекрестная сшивка между группой карбоновой кислоты и амином или спиртом, где одну из групп активируют с помощью активирующего средства, например карбодиимида, является примером перекрестной сшивки нулевой длины.

В рамках изобретения "эффект Тиндаля" и/или "рассеяние Тиндаля" является нежелательным явлением, возникающим у некоторых пациентов, которым вводят тканевые филлеры. Эффект Тиндаля отличается появлением синей окраски в месте инъекции тканевого филлера, соответствующей видимой композиции дермального филлера, наблюдаемой через полупрозрачный эпидермис. Эффект Тиндаля можно наблюдать, когда рассеивающие свет твердые частицы диспергированы в, в ином случае, пропускающей свет среде, если поперечный срез частиц имеет размер в конкретном диапазоне, как правило, несколько ниже или вблизи длины волны видимого света. При

эффекте Тиндаля свет с большей длиной волны (например, красный) в большей степени проходит через среду, при этом свет с меньшей длиной волны (например, синий) в большей степени отражается благодаря рассеянию, создавая общее впечатление, что среда окрашена в синий цвет.

#### Фрагменты белка шелка

В некоторых вариантах осуществления композиции на основе белка шелка и фрагменты белка шелка или способы их получения могут включать композиции, фрагменты и способы, описанные в публикациях патентных заявок США №№ 2015/00933340, 2015/0094269, 2016/0193130, 2016/0022560, 2016/0022561, 2016/0022562, 2016/0022563, и 2016/0222579, 2016/0281294 и патентах США №№ 9187538, 9522107, 9517191, 9522108, 9511012 и 9545369, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В рамках изобретения термин "фрагменты белка шелка" (SPF), как правило, относится к смеси, композиции или популяции пептидов и/или белков, получаемых из шелка. В некоторых вариантах осуществления SPF получают в виде, по существу, чистых и легко масштабируемых растворов смесей SPF, которые можно использовать в различных областях. Растворы получают из сырого, чистого, интактного материала белка шелка и обрабатывают для удаления любого серицина и достижения желаемой средневзвешенной молекулярной массы (MW) и полидисперсности смеси фрагментов. Выбранные параметры способа можно изменять для достижения индивидуальных характеристик конечного фрагмента белка шелка в зависимости от предполагаемого использования. Получаемый раствор конечных фрагментов представляют собой чистые фрагменты белка шелка и воду с уровнями технологических загрязнений от м.д. до неопределимых уровней, приемлемых в области фармацевтики, медицины и косметологии. Можно дополнительно изменять концентрацию, размер и полидисперсность фрагментов белка шелка в растворе в зависимости от желаемого использования и требований к характеристикам. В варианте осуществления чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка в растворе, по существу, не содержат серицин, имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа и имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В варианте осуществления чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка в растворе, по существу, не содержат серицин, имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа и имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В варианте осуществления чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка в растворе, по существу, не содержат серицин, имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа и имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В варианте осуществления чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка в растворе, по существу, не содержат

серицин, имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа и имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В варианте осуществления чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка в растворе, по существу, не содержат серицин, имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа и имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В варианте осуществления чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка в растворе, по существу, не содержат серицин, имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 80 кДа до приблизительно 150 кДа и имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0.

В варианте осуществления фрагменты белка шелка, представленные в настоящем описании, можно получать в растворе или в виде твердого вещества, при этом твердое вещество суспендируют в физиологическом растворе (например, воде, физиологическом растворе и т.п.) или геле НА, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления фрагменты белка шелка, представленные в настоящем описании, можно получать в липосомах или микросферах перед их накоплением в геле НА.

В варианте осуществления растворы шелка по настоящему изобретению можно использовать для получения композиций тканевого филлера, представленных в настоящем описании. В варианте осуществления растворы можно использовать для получения гелей, которые можно гомогенизировать с НА и дополнительными средствами для получения тканевых филлеров, представленных в настоящем описании. В зависимости от используемого раствора шелка и способов отливки пленок или гелей достигают различных свойств.

В некоторых вариантах осуществления процентное содержание SPF по массе в тканевых филлерах, представленных в настоящем описании, составляет по меньшей мере 0,01%, или по меньшей мере 0,1%, или по меньшей мере 0,2%, или по меньшей мере 0,3%, или по меньшей мере 0,4%, или по меньшей мере 0,5%, или по меньшей мере 0,6%, или по меньшей мере 0,7%, или по меньшей мере 0,8%, или по меньшей мере 0,9%, или по меньшей мере 1%, или по меньшей мере 2%, или по меньшей мере 3%, или по меньшей мере 4%, или по меньшей мере 5%, или по меньшей мере 6%, или по меньшей мере 7%, или по меньшей мере 8%, или по меньшей мере 9%, или по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 11%, или по меньшей мере 12%, или по меньшей мере 13%, или по меньшей мере 14%, или по меньшей мере 15%, или по меньшей мере 16%, или по меньшей мере 17%, или по меньшей мере 18%, или по меньшей мере 19%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере 21%, или по меньшей мере 22%, или по меньшей мере 23%, или по меньшей мере 24%, или по меньшей мере 25%, или по меньшей мере 26%, или по меньшей мере 27%, или по меньшей мере 28%, или по меньшей мере 29%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 31%, или по







приблизительно 15%, или от приблизительно 1% до приблизительно 16%, или от приблизительно 1% до приблизительно 17%, или от приблизительно 1% до приблизительно 18%, или от приблизительно 1% до приблизительно 19%, или от приблизительно 1% до приблизительно 20%, или от приблизительно 1% до приблизительно 21%, или от приблизительно 1% до приблизительно 22%, или от приблизительно 1% до приблизительно 23%, или от приблизительно 1% до приблизительно 24%, или от приблизительно 1% до приблизительно 25%; или от приблизительно 10% до приблизительно 20%, или от приблизительно 10% до приблизительно 25%, или от приблизительно 10% до приблизительно 30%, или от приблизительно 10% до приблизительно 35%, или от приблизительно 10% до приблизительно 40%, или от приблизительно 10% до приблизительно 45%, или от приблизительно 10% до приблизительно 50%, или от приблизительно 10% до приблизительно 55%, или от приблизительно 10% до приблизительно 60%, или от приблизительно 10% до приблизительно 65%, или от приблизительно 10% до приблизительно 70%, или от приблизительно 10% до приблизительно 75%, или от приблизительно 10% до приблизительно 80%, или от приблизительно 10% до приблизительно 85%, или от приблизительно 10% до приблизительно 90%, или от приблизительно 10% до приблизительно 100%.

SPF, представленные в настоящем описании, могут иметь различные механические и физические свойства в зависимости от степени кристалличности пептидов и/или белков SPF. В варианте осуществления композиция SPF по настоящему изобретению нерастворима в водном растворе по причине кристалличности белка. В варианте осуществления композиция SPF по настоящему изобретению растворима в водном растворе. В варианте осуществления SPF из композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть, составляющую приблизительно две трети, и аморфную область, составляющую приблизительно одну треть. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть, составляющую приблизительно половину, и аморфную область, составляющую приблизительно половину. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 99% и аморфную область 1%. В варианте осуществления SPF композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 95% и аморфную область 5%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 90% и аморфную область 10%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 85% и аморфную область 15%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 80% и аморфную область 20%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 75% и аморфную область 25%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 70% и аморфную область 30%. В варианте

осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 65% и аморфную область 35%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 60% и аморфную область 40%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 50% и аморфную область 50%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 40% и аморфную область 60%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 35% и аморфную область 65%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 30% и аморфную область 70%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 25% и аморфную область 75%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 20% и аморфную область 80%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 15% и аморфную область 85%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 10% и аморфную область 90%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 5% и аморфную область 90%. В варианте осуществления SPF в композиции по настоящему изобретению включают кристаллическую часть 1% и аморфную область 99%.

В некоторых вариантах осуществления физические и механические свойства SPF варьируются в зависимости от степени наличия в композиции SPF областей  $\alpha$ -спиралей и/или случайных спиралей. В некоторых вариантах осуществления гидрогель SPF, представленный в настоящем описании, имеет белковую структуру, по существу, не содержащую области  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей. В аспектах этих вариантов осуществления гидрогель имеет белковую структуру, включающую, например, приблизительно 5% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 10% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 15% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 20% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 25% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 30% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 35% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 40% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, приблизительно 45% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей или приблизительно 50% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей. В других аспектах этих вариантов изобретения гидрогель имеет белковую структуру, включающую, например, не более 5% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, не более 10% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, не более 15% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, не более 20% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, не более 25% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, не более 30% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, не более 35% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, не более 40% областей  $\alpha$ -спиралей и



случайных спиралей, не более 45% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, или не более 50% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей. В других аспектах этих вариантов осуществления гидрогель имеет белковую структуру, включающую, например, от приблизительно 5% до приблизительно 10% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 5% до приблизительно 15% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 5% до приблизительно 20% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 5% до приблизительно 25% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 5% до приблизительно 30% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 5% до приблизительно 40% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 5% до приблизительно 50% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 10% до приблизительно 20% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 10% до приблизительно 30% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 15% до приблизительно 25% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей, от приблизительно 15% до приблизительно 30% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей или от приблизительно 15% до приблизительно 35% областей  $\alpha$ -спиралей и случайных спиралей.

В некоторых вариантах осуществления композиции растворов SPF по настоящему изобретению имеют стабильность при хранении, т.е. они не будут медленно или спонтанно желироваться при хранении в водном растворе без очевидной агрегации фрагментов и/или повышения молекулярной массы с течением времени от 10 дней до 3 лет в зависимости от условий хранения, процента шелка, количества транспортировок и условий транспортировок. Кроме того, можно изменять pH для увеличения срока годности и/или поддержания условий транспортировки, предотвращая преждевременный фолдинг и агрегацию шелка. В варианте осуществления композиция раствора SPF по настоящему изобретению имеет стабильность при хранении в течение до 2 недель при комнатной температуре (RT). В варианте осуществления композиция раствора SPF по настоящему изобретению имеет стабильность при хранении в течение до 4 недель при RT. В варианте осуществления композиция раствора SPF по настоящему изобретению имеет стабильность при хранении в течение до 6 недель при RT. В варианте осуществления композиция раствора SPF по настоящему изобретению имеет стабильность при хранении в течение до 8 недель при RT. В варианте осуществления композиция раствора SPF по настоящему изобретению имеет стабильность при хранении в течение до 10 недель при RT. В варианте осуществления композиция раствора SPF по настоящему изобретению имеет стабильность при хранении в течение до 12 недель при RT. В варианте осуществления композиция раствора SPF по настоящему изобретению имеет стабильность при хранении в диапазоне от приблизительно 4 недель до приблизительно 52 недель при RT. В **таблице 1** ниже показаны результаты тестирования стабильности при хранении для вариантов осуществления композиций SPF по настоящему изобретению.

<b>Таблица 1.</b> Стабильность при хранении композиций SPF по настоящему изобретению		
% шелка	Температура	Время до желирования

2	RT	4 недели
2	4°C	>9 недель
4	RT	4 недели
4	4°C	>9 недель
6	RT	2 недели
6	4°C	>9 недель

В композицию раствора SPF по настоящему изобретению можно добавлять известную добавку, такую как витамин (например, витамин С), для получения геля, являющегося стабильным в период от 10 дней до 3 лет при комнатной температуре (RT). Оба примера, композицию SPF и композицию SPF с добавкой, можно лиофилизировать для усиленного контроля хранения в диапазоне от 10 дней до 10 лет в зависимости от условий хранения и транспортировки. В качестве сырого ингредиента в медицине, на потребительском рынке и в электронике также можно использовать лиофилизированный порошок шелка. Кроме того, лиофилизированный порошок шелка после хранения можно ресуспендировать в воде, HFIP или органическом растворе для получения растворов шелка разной концентрации, включая более концентрированные растворы, чем полученные исходно. В другом варианте осуществления белковые фрагменты на основе фиброина шелка сушат с использованием испарителя Rototherm или другими известными в этой области способами получения сухой формы белка, содержащей менее 10% масс. воды.

SPF, используемые в тканевых филлерах и способах, представленных в настоящем описании, можно обрабатывать и включать различными способами, например, в форме раствора, который можно комбинировать с другими материалами (например, НА) для получения композиций тканевых филлеров, представленных в настоящем описании. Далее приведены неограничивающие примеры подходящих диапазонов различных параметров для получения растворов шелка по настоящему изобретению. Растворы шелка по настоящему изобретению могут включать один или более, но не обязательно все, из этих параметров, и их можно получать с использованием различных комбинаций диапазонов таких параметров.

В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 30%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 25%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 20%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 19%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 18%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 17%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 16%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 15%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 14%. В варианте осуществления процент шелка в растворе составляет менее 13%. В варианте

































В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий один или более из низкомолекулярного шелка, среднемолекулярного шелка и высокомолекулярного шелка.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий один или более из низкомолекулярного шелка, среднемолекулярного шелка и высокомолекулярного шелка. В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий низкомолекулярный шелк и среднемолекулярный шелк. В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий низкомолекулярный шелк и высокомолекулярный шелк. В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий среднемолекулярный шелк и высокомолекулярный шелк. В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий низкомолекулярный шелк, среднемолекулярный шелк и высокомолекулярный шелк.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий низкомолекулярный шелк и среднемолекулярный шелк. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком и среднемолекулярным шелком составляет от приблизительно 99:1 до приблизительно 1:99, от приблизительно 95:5 до приблизительно 5:95, от приблизительно 90:10 до приблизительно 10:90, от приблизительно 75:25 до приблизительно 25:75, от приблизительно 65:35 до приблизительно 35:65 или от приблизительно 55:45 до приблизительно 45:55. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком и среднемолекулярным шелком составляет от приблизительно 99:1 до приблизительно 55:45, от приблизительно 95:5 до приблизительно 45:55, от приблизительно 90:10 до приблизительно 35:65, от приблизительно 75:25 до приблизительно 15:85, от приблизительно 65:35 до приблизительно 10:90 или от приблизительно 55:45 до приблизительно 1:99. В варианте осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком и среднемолекулярным шелком составляет приблизительно 99:1, приблизительно 98:2, приблизительно 97:3, приблизительно 96:4, приблизительно 95:5, приблизительно 94:6, приблизительно 93:7, приблизительно 92:8, приблизительно 91:9, приблизительно 90:10, приблизительно 89:11, приблизительно 88:12, приблизительно 87:13, приблизительно 86:14, приблизительно 85:15, приблизительно 84:16, приблизительно 83:17, приблизительно 82:18, приблизительно 81:19, приблизительно 80:20, приблизительно 79:21, приблизительно 78:22, приблизительно 77:23, приблизительно 76:24, приблизительно 75:25, приблизительно 74:26, приблизительно 73:27, приблизительно 72:28, приблизительно 71:29, приблизительно 70:30, приблизительно 69:31, приблизительно 68:32, приблизительно 67:33, приблизительно 66:34, приблизительно

65:35, приблизительно 64:36, приблизительно 63:37, приблизительно 62:38, приблизительно 61:39, приблизительно 60:40, приблизительно 59:41, приблизительно 58:42, приблизительно 57:43, приблизительно 56:44, приблизительно 55:45, приблизительно 54:46, приблизительно 53:47, приблизительно 52:48, приблизительно 51:49, приблизительно 50:50, приблизительно 49:51, приблизительно 48:52, приблизительно 47:53, приблизительно 46:54, приблизительно 45:55, приблизительно 44:56, приблизительно 43:57, приблизительно 42:58, приблизительно 41:59, приблизительно 40:60, приблизительно 39:61, приблизительно 38:62, приблизительно 37:63, приблизительно 36:64, приблизительно 35:65, приблизительно 34:66, приблизительно 33:67, приблизительно 32:68, приблизительно 31:69, приблизительно 30:70, приблизительно 29:71, приблизительно 28:72, приблизительно 27:73, приблизительно 26:74, приблизительно 25:75, приблизительно 24:76, приблизительно 23:77, приблизительно 22:78, приблизительно 21:79, приблизительно 20:80, приблизительно 19:81, приблизительно 18:82, приблизительно 17:83, приблизительно 16:84, приблизительно 15:85, приблизительно 14:86, приблизительно 13:87, приблизительно 12:88, приблизительно 11:89, приблизительно 10:90, приблизительно 9:91, приблизительно 8:92, приблизительно 7:93, приблизительно 6:94, приблизительно 5:95, приблизительно 4:96, приблизительно 3:97, приблизительно 2:98 или приблизительно 1:99. В варианте осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком и средномолекулярным шелком составляет приблизительно 9:1, приблизительно 8:1, приблизительно 7:1, приблизительно 6:1, приблизительно 5:1, приблизительно 4:1, приблизительно 3:1, приблизительно 2:1 или приблизительно 1:1. В варианте осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком и средномолекулярным шелком составляет приблизительно 1:9, приблизительно 1:8, приблизительно 1:7, приблизительно 1:6, приблизительно 1:5, приблизительно 1:4, приблизительно 1:3, приблизительно 1:2 или приблизительно 1:1.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий низкомолекулярный шелк и высокомолекулярный шелк. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет от приблизительно 99:1 до приблизительно 1:99, от приблизительно 95:5 до приблизительно 5:95, от приблизительно 90:10 до приблизительно 10:90, от приблизительно 75:25 до приблизительно 25:75, от приблизительно 65:35 до приблизительно 35:65 или от приблизительно 55:45 до приблизительно 45:55. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет от приблизительно 99:1 до приблизительно 55:45, от приблизительно 95:5 до приблизительно 45:55, от приблизительно 90:10 до приблизительно 35:65, от приблизительно 75:25 до приблизительно 15:85, от приблизительно 65:35 до приблизительно 10:90 или от приблизительно 55:45 до приблизительно 1:99. В варианте осуществления массовое

соотношение между низкомолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет приблизительно 99:1, приблизительно 98:2, приблизительно 97:3, приблизительно 96:4, приблизительно 95:5, приблизительно 94:6, приблизительно 93:7, приблизительно 92:8, приблизительно 91:9, приблизительно 90:10, приблизительно 89:11, приблизительно 88:12, приблизительно 87:13, приблизительно 86:14, приблизительно 85:15, приблизительно 84:16, приблизительно 83:17, приблизительно 82:18, приблизительно 81:19, приблизительно 80:20, приблизительно 79:21, приблизительно 78:22, приблизительно 77:23, приблизительно 76:24, приблизительно 75:25, приблизительно 74:26, приблизительно 73:27, приблизительно 72:28, приблизительно 71:29, приблизительно 70:30, приблизительно 69:31, приблизительно 68:32, приблизительно 67:33, приблизительно 66:34, приблизительно 65:35, приблизительно 64:36, приблизительно 63:37, приблизительно 62:38, приблизительно 61:39, приблизительно 60:40, приблизительно 59:41, приблизительно 58:42, приблизительно 57:43, приблизительно 56:44, приблизительно 55:45, приблизительно 54:46, приблизительно 53:47, приблизительно 52:48, приблизительно 51:49, приблизительно 50:50, приблизительно 49:51, приблизительно 48:52, приблизительно 47:53, приблизительно 46:54, приблизительно 45:55, приблизительно 44:56, приблизительно 43:57, приблизительно 42:58, приблизительно 41:59, приблизительно 40:60, приблизительно 39:61, приблизительно 38:62, приблизительно 37:63, приблизительно 36:64, приблизительно 35:65, приблизительно 34:66, приблизительно 33:67, приблизительно 32:68, приблизительно 31:69, приблизительно 30:70, приблизительно 29:71, приблизительно 28:72, приблизительно 27:73, приблизительно 26:74, приблизительно 25:75, приблизительно 24:76, приблизительно 23:77, приблизительно 22:78, приблизительно 21:79, приблизительно 20:80, приблизительно 19:81, приблизительно 18:82, приблизительно 17:83, приблизительно 16:84, приблизительно 15:85, приблизительно 14:86, приблизительно 13:87, приблизительно 12:88, приблизительно 11:89, приблизительно 10:90, приблизительно 9:91, приблизительно 8:92, приблизительно 7:93, приблизительно 6:94, приблизительно 5:95, приблизительно 4:96, приблизительно 3:97, приблизительно 2:98 или приблизительно 1:99.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий среднемолекулярный шелк и высокомолекулярный шелк. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение между среднемолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет от приблизительно 99:1 до приблизительно 1:99, от приблизительно 95:5 до приблизительно 5:95, от приблизительно 90:10 до приблизительно 10:90, от приблизительно 75:25 до приблизительно 25:75, от приблизительно 65:35 до приблизительно 35:65 или от приблизительно 55:45 до приблизительно 45:55. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение между среднемолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет от приблизительно 99:1 до приблизительно 55:45, от приблизительно 95:5 до приблизительно 45:55, от

приблизительно 90:10 до приблизительно 35:65, от приблизительно 75:25 до приблизительно 15:85, от приблизительно 65:35 до приблизительно 10:90 или от приблизительно 55:45 до приблизительно 1:99. В варианте осуществления массовое соотношение между среднемолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет приблизительно 99:1, приблизительно 98:2, приблизительно 97:3, приблизительно 96:4, приблизительно 95:5, приблизительно 94:6, приблизительно 93:7, приблизительно 92:8, приблизительно 91:9, приблизительно 90:10, приблизительно 89:11, приблизительно 88:12, приблизительно 87:13, приблизительно 86:14, приблизительно 85:15, приблизительно 84:16, приблизительно 83:17, приблизительно 82:18, приблизительно 81:19, приблизительно 80:20, приблизительно 79:21, приблизительно 78:22, приблизительно 77:23, приблизительно 76:24, приблизительно 75:25, приблизительно 74:26, приблизительно 73:27, приблизительно 72:28, приблизительно 71:29, приблизительно 70:30, приблизительно 69:31, приблизительно 68:32, приблизительно 67:33, приблизительно 66:34, приблизительно 65:35, приблизительно 64:36, приблизительно 63:37, приблизительно 62:38, приблизительно 61:39, приблизительно 60:40, приблизительно 59:41, приблизительно 58:42, приблизительно 57:43, приблизительно 56:44, приблизительно 55:45, приблизительно 54:46, приблизительно 53:47, приблизительно 52:48, приблизительно 51:49, приблизительно 50:50, приблизительно 49:51, приблизительно 48:52, приблизительно 47:53, приблизительно 46:54, приблизительно 45:55, приблизительно 44:56, приблизительно 43:57, приблизительно 42:58, приблизительно 41:59, приблизительно 40:60, приблизительно 39:61, приблизительно 38:62, приблизительно 37:63, приблизительно 36:64, приблизительно 35:65, приблизительно 34:66, приблизительно 33:67, приблизительно 32:68, приблизительно 31:69, приблизительно 30:70, приблизительно 29:71, приблизительно 28:72, приблизительно 27:73, приблизительно 26:74, приблизительно 25:75, приблизительно 24:76, приблизительно 23:77, приблизительно 22:78, приблизительно 21:79, приблизительно 20:80, приблизительно 19:81, приблизительно 18:82, приблизительно 17:83, приблизительно 16:84, приблизительно 15:85, приблизительно 14:86, приблизительно 13:87, приблизительно 12:88, приблизительно 11:89, приблизительно 10:90, приблизительно 9:91, приблизительно 8:92, приблизительно 7:93, приблизительно 6:94, приблизительно 5:95, приблизительно 4:96, приблизительно 3:97, приблизительно 2:98 или приблизительно 1:99.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать белок шелка, содержащий низкомолекулярный шелк, среднемолекулярный шелк и высокомолекулярный шелк. В варианте осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным шелком, среднемолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет приблизительно 1:1:8, 1:2:7, 1:3:6, 1:4:5, 1:5:4, 1:6:3, 1:7:2, 1:8:1, 2:1:7, 2:2:6, 2:3:5, 2:4:4, 2:5:3, 2:6:2, 2:7:1, 3:1:6, 3:2:5, 3:3:4, 3:4:3, 3:5:2, 3:6:1, 4:1:5, 4:2:4, 4:3:3, 4:4:2, 4:5:1, 5:1:4, 5:2:3, 5:3:2, 5:4:1, 6:1:3, 6:2:2, 6:3:1, 7:1:2, 7:2:1 или 8:1:1. В варианте осуществления массовое соотношение между низкомолекулярным

шелком, среднемолекулярным шелком и высокомолекулярным шелком составляет приблизительно 3:0,1:0,9, 3:0,2:0,8, 3:0,3:0,7, 3:0,4:0,6, 3:0,5:0,5, 3:0,6:0,4, 3:0,7:0,3, 3:0,8:0,2 или 3:0,9:0,1.

В варианте осуществления белковые фрагменты на основе фиброина шелка, включенные в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 5,0. В варианте осуществления белковые фрагменты на основе фиброина шелка, включенные в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. В варианте осуществления белковые фрагменты на основе фиброина шелка, включенные в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 1,5. В варианте осуществления белковые фрагменты на основе фиброина шелка, включенные в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 1,5 до приблизительно 2,0. В варианте осуществления белковые фрагменты на основе фиброина шелка, включенные в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеют полидисперсность в диапазоне от приблизительно 2,0 до приблизительно 2,5. В варианте осуществления композиция по настоящему изобретению, содержащая чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка, имеет полидисперсность в диапазоне от приблизительно 2,0 до приблизительно 3,0. В варианте осуществления композиция по настоящему изобретению, содержащая чистые белковые фрагменты на основе фиброина шелка, имеет полидисперсность в диапазоне от приблизительно 2,5 до приблизительно 3,0.

В варианте осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании и включающий SPF, имеет недетектируемые уровни примесей LiBr. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет от 10 м.д. до 1000 м.д. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет от 10 м.д. до 300 м.д. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет менее 25 м.д. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет менее 50 м.д. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет менее 75 м.д. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет менее 100 м.д. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет менее 200 м.д. В варианте осуществления количество примесей LiBr в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет менее 300 м.д. В варианте





тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, является недетектируемым или составляет до 200 м.д. В варианте осуществления количество примесей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, является недетектируемым или составляет до 150 м.д. В варианте осуществления количество примесей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, является недетектируемым или составляет до 100 м.д. В варианте осуществления количество примесей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет от 100 м.д. до 200 м.д. В варианте осуществления количество примесей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет от 200 м.д. до 300 м.д. В варианте осуществления количество примесей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет от 300 м.д. до 400 м.д. В варианте осуществления количество примесей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в тканевом филлере, представленном в настоящем описании и включающем SPF, составляет от 400 м.д. до 500 м.д.

В варианте осуществления растворимость в воде чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению составляет от 50 до 100%. В варианте осуществления растворимость в воде чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению составляет от 60 до 100%. В варианте осуществления растворимость в воде чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению составляет от 70 до 100%. В варианте осуществления растворимость в воде чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению составляет от 80 до 100%. В варианте осуществления растворимость в воде составляет от 90 до 100%. В варианте осуществления фрагменты на основе фиброина шелка по настоящему изобретению нерастворимы в водных растворах.

В варианте осуществления растворимость чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению в органических растворах составляет от 50 до 100%. В варианте осуществления растворимость чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению в органических растворах составляет от 60 до 100%. В варианте осуществления растворимость чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению в органических растворах составляет от 70 до 100%. В варианте осуществления растворимость чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению в органических растворах составляет от 80 до 100%. В варианте осуществления растворимость чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка по настоящему изобретению в органических растворах составляет от 90 до 100%. В варианте осуществления фрагменты на основе фиброина шелка по настоящему изобретению нерастворимы в органических растворах.

Способы получения фрагментов белка шелка, используемых в композициях по настоящему изобретению, описаны в публикациях патентной заявки США №№ 2015/00933340, 2015/0094269, 2016/0193130, 2016/0022560, 2016/0022561, 2016/0022562,



2016/0022563, и 2016/0222579, 2016/0281294 и патентах США №№ 9187538, 9522107, 9517191, 9522108, 9511012 и 9545369, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Однако, пример способа показан на фиг. 1, представляющей собой блок-схему, на которой показаны различные варианты осуществления для получения чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка (SPF) по настоящему изобретению. Следует понимать, что не все проиллюстрированные стадии обязательно требуются для получения всех растворов шелка по настоящему изобретению. Как показано на фиг. 1, на стадии А в качестве источника шелка можно использовать коконы (термически обработанные или термически необработанные), волокна шелка, порошок шелка или паутинный шелк. Если начинают с сырых коконов шелкопряда *Bombyx mori*, коконы можно нарезать на небольшие куски, например, куски приблизительно равного размера, стадия В1. Затем сырой шелк экстрагируют и промывают для удаления любого серицина, стадия С1а. Это приводит к получению, по существу, несодержащего серицин сырого шелка. В варианте осуществления воду нагревают до температуры от 84°C до 100°C (в идеале кипящей), а затем в кипящую воду добавляют Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (карбонат натрия) до полного растворения Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. К кипящей воде/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100°C) добавляют сырой шелк и погружают его на приблизительно 15-90 минут, при этом кипячение в течение большего времени приводит к получению меньших фрагментов белка шелка. В варианте осуществления объем воды равен приблизительно 0,4-кратной массе сырого шелка, и объем Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> равен приблизительно 0,848-кратной массе сырого шелка. В варианте осуществления объем воды равен 0,1-кратной массе сырого шелка, и объем Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> поддерживают на уровне 2,12 г/л. Это показано на фиг. 6 и фиг. 7: массу шелка (ось x) варьировали в одном объеме экстракционного раствора (т.е. одинаковом объеме воды и концентрации Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), достигая удаления серицина (по существу так, чтобы он не содержал серицин), о чем свидетельствует общая потеря массы шелка от 26 до 31 процентов (ось y). Затем дренируют раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в воде и удаляют избыток воды/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> из волокон фиброина шелка (например, отделяют экстракт фиброина вручную, центрифугируют с использованием устройства и т.д.). Получаемый экстракт фиброина шелка промывают теплой или горячей водой для удаления какого-либо оставшегося абсорбированного серицина или загрязнения, как правило, при диапазоне температур от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, изменяя объем воды по меньшей мере однократно (можно повторять столько раз, сколько необходимо). Получаемый экстракт фиброина шелка, по существу, представляет собой фиброин шелка без серицина. В варианте осуществления получаемый экстракт фиброина шелка промывают водой при температуре приблизительно 60°C. В варианте осуществления объем промывочной воды для каждого цикла равен 0,1-0,2 л на массу сырого шелка. Предпочтительным может являться встряхивание, переворачивание или циркуляция промывочной воды для максимизации эффекта промывки. После промывки удаляют избыток воды из экстрагированных волокон фиброина шелка (например, экстракт фиброина отделяют вручную или с использованием устройства). Альтернативно, в целях

экстракции серицина можно использовать способы, известные специалисту в этой области, например, с использованием давления, температуры или других реагентов или их комбинаций. Альтернативно, шелкоотделительную железу (белок шелка на 100% несодержащий серицин) можно удалять напрямую из гусеницы. Это будет приводить к получению жидкого белка шелка без какого-либо изменения структуры белка, не содержащего серицин.

Затем экстрагированным волокнам фиброина позволяют полностью высохнуть. После сушки экстрагированный фиброин шелка растворяют с использованием растворителя, добавляемого к фиброину шелка при температуре от температуры окружающей среды до температуры кипения, стадия C1b. В варианте осуществления растворитель является раствором бромида лития (LiBr) (температура кипения LiBr составляет 140°C). Альтернативно, экстрагированные волокна фиброина являются не сухими, а влажными, и их помещают в растворитель; затем концентрацию растворителя можно варьировать для достижения концентраций, схожих с ситуацией, когда сухой шелк добавляют в растворитель. Конечная концентрация растворителя LiBr может находиться в диапазоне от 0,1 М до 9,3 М. Фиг. 8 является таблицей, в которой приведены молекулярные массы шелка, растворенные в разных концентрациях бромида лития (LiBr), и для разных объемов экстракции и растворения. Полного растворения экстрагированных волокон фиброина можно достигать, варьируя время обработки и температуру вместе с концентрацией растворителя. Можно использовать другие растворители, включающие, в качестве неограничивающих примеров, раствор фосфорной кислоты, нитрата кальция, хлорида кальция или другие концентрированные водные растворы неорганических солей. Для обеспечения растворения волокна шелка необходимо полностью погружать в уже нагретый раствор растворителя, а затем держать при температуре в диапазоне от приблизительно 60°C до приблизительно 140°C в течение 1-168 часов. В варианте осуществления волокна шелка необходимо полностью погружать в раствор растворителя, а затем помещать в сушильный шкаф с температурой приблизительно 100°C на приблизительно 1 час.

Температура, при которой экстракт фиброина шелка добавляют в раствор LiBr (или наоборот), имеет эффект в отношении времени, необходимого для полного растворения фиброина, и получаемых молекулярной массы и полидисперсности конечного раствора смеси SPF. В варианте осуществления концентрация раствора растворителя шелка составляет 20% масс./об. или менее. Кроме того, для облегчения растворения при разных температурах и концентрациях можно использовать встряхивание во время внесения или растворения. Температура раствора LiBr позволит контролировать молекулярную массу и полидисперсность полученной смеси фрагментов белка шелка. В варианте осуществления при более высокой температуре шелк будет растворяться быстрее, что обеспечивает улучшенную масштабируемость способа и массовое производство раствора шелка. В варианте осуществления использование раствора LiBr, нагретого до температуры 80-140°C, снижает время пребывания в печи, необходимое для достижения полного

растворения. Разное время и температура растворителя 60°C или выше позволяют изменять и контролировать MW и полидисперсность растворов смесей SPF, полученных из нативного белка фиброина шелка с исходной молекулярной массой.

Альтернативно, целые коконы можно помещать непосредственно в растворитель, такой как LiBr, пропуская экстракцию, стадия B2. В этом случае необходима последующая фильтрация частиц гусениц шелкопрядов от шелка и удаление раствора растворителя и серицина способами, известными в этой области для разделения гидрофобных и гидрофильных белков, такими как разделение и/или хроматография на колонках, ионообменная хроматография, химическое осаждение с использованием соли и/или pH и/или ферментативное расщепление, и фильтрация или экстракция, все способы являются общепринятыми примерами и не ограничены стандартными способами разделения белков, стадия C2. Альтернативно, термически необработанные коконы с удаленными шелкопрядами можно помещать в растворитель, такой как LiBr, пропуская экстракцию. Описанные выше способы можно использовать для отделения серицина с тем преимуществом, что термически необработанные коконы будут содержать значительно меньше остатков шелкопрядов.

Для удаления растворителя из получаемого раствора растворенного фрагмента белка фиброина можно использовать диализ, диализуя раствор против объема воды, стадия E1. Для удаления любого дебриса (т.е. останков шелкопрядов) из шелка и раствора LiBr перед диализом используют предварительную фильтрацию, стадия D. в одном из примеров используют фильтр 3 мкм или 5 мкм со скоростью потока 200-300 мл/мин для фильтрации от 0,1% до 1,0% раствора шелк-LiBr перед диализом и, при желании, потенциальным концентрированием. В способе, представленном в настоящем описании, как описано выше, используют время и/или температуру для снижения концентрации с 9,3 М LiBr до диапазона 0,1-9,3 М для облегчения фильтрации и последующего диализа, в частности, с учетом получения масштабируемого способа. Альтернативно, без использования дополнительного времени или температуры раствор 9,3 М LiBr-фрагмент белка шелка можно разводить водой для облегчения фильтрации дебриса и диализа. Результатом растворения в течение желаемого времени и при желаемой температуре является прозрачный, несодержащий дисперсные частицы, стабильный при хранении раствор фрагмента белка шелка-LiBr комнатной температуры с известными MW и полидисперсностью. Предпочтительно регулярно менять воду для диализа до удаления растворителя (например, менять воду через 1 час, 4 часа, а затем каждые 12 часов всего 6 раз). Общее количество замен объема воды можно варьировать с учетом получаемой концентрации растворителя, используемого для растворения и фрагментации белка шелка. После диализа конечный раствор шелка можно дополнительно фильтровать для удаления любого оставшегося дебриса (т.е. останков шелкопрядов).

Альтернативно, для удаления растворителя из получаемого раствора растворенного фиброина можно использовать тангенциальную поточную фильтрацию (TFF), являющуюся быстрым и эффективным способом разделения и очистки биомолекул,

стадия E2. С помощью TFF можно получать очень чистый водный раствор фрагмента белка шелка, и она делает возможной масштабируемость способа для получения больших объемов раствора контролируемым и воспроизводимым образом. Раствор шелка и LiBr можно разводить перед TFF (с 20% до 0,1% шелка в воде или LiBr). С помощью предварительной фильтрации, как описано выше, перед TFF можно поддерживать эффективность фильтра и потенциально избегать образования пограничных слоев геля шелка на поверхности фильтра в результате наличия частиц дебриса. Предварительную фильтрацию перед TFF также можно использовать для удаления любого оставшегося дебриса (т.е. остатков шелкопрядов) из раствора шелка и LiBr, которые могут вызывать спонтанное или длительное желирование получаемого исключительно водного раствора, стадия D. TFF, циркуляционную или однопроходную, можно использовать для получения растворов вода-фрагмент белка шелка в диапазоне от 0,1% шелка до 30,0% шелка (более предпочтительно - 0,1-6,0% шелка). В зависимости от желаемой концентрации, молекулярной массы и полидисперсности смеси фрагментов белка шелка в растворе могут потребоваться мембраны для TFF с разными пороговыми значениями. Мембраны в диапазоне от 1-100 кДа могут потребоваться для растворов шелка с разной молекулярной массой, полученных, например, посредством варьирования времени экстракции кипячением или времени и температуры в растворителе (например, LiBr). В варианте осуществления для очистки раствора смеси фрагментов белка шелка и для достижения конечного желаемого соотношения шелка и воды используют мембрану для TFF 5 или 10 кДа. Кроме того, для концентрирования раствора после удаления растворителя (например, LiBr) (с получением желаемой концентрации в диапазоне от 0,1% до 30% шелк) можно использовать однопроходную TFF, TFF и другие известные в этой области способы, такие как использование испарителя с падающей пленкой. Их можно использовать в качестве альтернативы стандартным, известным в этой области способам концентрирования NFIP для получения водного раствора. Также можно использовать мембрану с более крупными порами для фильтрации небольших фрагментов белка шелка и получения раствора шелка с большей молекулярной массой и более близкими значениями полидисперсности и/или без них. Фиг. 5 является таблицей, в которой приведены молекулярные массы для некоторых вариантов осуществления растворов белка шелка по настоящему изобретению. Условия обработки раствора белка шелка являлись следующими: экстракция при 100°C в течение 20 мин, промывка при комнатной температуре, LiBr в печи при 60°C в течение 4-6 часов. Условия обработки при TFF для водорастворимых пленок являлись следующими: экстракция при 100°C в течение 60 мин, промывка при 60°C, LiBr 100°C в печи при 100°C в течение 60 мин. На фиг. 12-23 дополнительно показаны манипуляции со временем экстракции, условиями растворения LiBr и TFF и молекулярные массы и полидисперсностей полученных примеров. Эти примеры не являются ограничивающими, а предназначены для демонстрации потенциала определяющих параметров для растворов фрагментов шелка с конкретной молекулярной массой.

Анализ LiBr и детекцию  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  осуществляли с использованием системы ВЭЖХ,

оборудованной испарительным детектором светорассеяния (ELSD). Вычисление осуществляли с помощью линейной регрессии получаемых площадей пиков аналита, график которых строили относительно концентрации. Для подготовки и анализа образцов использовали несколько образцов из ряда составов по настоящему изобретению. Как правило, четыре образца разных составов взвешивали непосредственно в мерную колбу 10 мл. Образцы суспендировали в 5 мл 20 мМ формиата аммония (рН 3,0) и держали при 2-8°C в течение 2 часов с периодическим встряхиванием для экстракции аналитов из пленки. Через 2 часа раствор разводили 20 мМ формиата аммония (рН 3,0). Раствор образца из мерной колбы переносили в сосуды для ВЭЖХ и впрыскивали в систему ВЭЖХ-ELSD для анализа карбоната натрия и бромида лития.

Обнаруживали, что аналитический способ, разработанный для количественного анализа  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{LiBr}$  в составах белка шелка, является линейным в диапазоне 10-165 мкг/мл, с RSD для точности впрыска 2% и 1% для площади и 0,38% и 0,19% для времени удержания в случае карбоната натрия и бромида лития, соответственно. Аналитический способ можно использовать для количественного определения карбоната натрия и бромида лития в составах белка шелка.

Конечный раствор фрагмента белка шелка представляет собой чистые фрагменты белка шелка и воду с уровнями дебриса из макрочастиц и/или технологических загрязнений, включающих  $\text{LiBr}$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , от м.д. до неопределимых. Фиг. 3 и фиг. 4 являются таблицами, в которых приведены концентрации  $\text{LiBr}$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в растворах по настоящему изобретению. На фиг. 3 условия обработки включали экстракцию при 100°C в течение 60 мин, промывку при 60°C,  $\text{LiBr}$  при 100°C в печи при 100°C в течение 60 мин. Варьировали условия TFF, включая разность давлений и количество объемов диафильтрации. На фиг. 4 условия обработки включали кипячение при 100°C в течение 60 мин, промывку при 60°C,  $\text{LiBr}$  в печи при 60°C в течение 4-6 часов.

Растворы фрагмент шелка-вода, лиофилизированную смесь фрагментов белка шелк, или любые другие композиции, включающие SPF, можно стерилизовать стандартными способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, фильтрацию, нагревание, облучение или стерилизацию электронным пучком. Ожидают, что смесь фрагментов белка шелка, из-за меньшей длины белковых полимеров, будет лучше переносить стерилизацию, чем растворы интактного белка шелка, описанные в этой области. Кроме того, изделия из шелка, полученные из смесей SPF, представленных в настоящем описании, можно стерилизовать в соответствии с предполагаемым использованием. Например, дермальный филлер с SPF, нагруженный молекулой, предназначенной для использования в медицине в отношении открытых ран/рассечений, можно стерилизовать стандартными способами, такими как облучение или стерилизация электронным пучком.

Фиг. 2 представляет собой блок-схему, на которой показаны различные параметры, которые можно модифицировать во время получения раствора фрагмента белка шелка по настоящему изобретению на стадиях экстракции и растворения. Можно изменять

выбранные параметры способа для достижения индивидуальных характеристик конечного раствора в зависимости от предполагаемого использования, например, молекулярной массы и полидисперсности. Следует понимать, что не все проиллюстрированные стадии необходимы для получения всех растворов шелка по настоящему изобретению.

В варианте осуществления способ получения раствора фрагмента белка шелка по настоящему изобретению включает получение кусков коконов шелкопряда *Bombyx mori*; экстракцию кусков при приблизительно 100°C в растворе воды и Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в течение приблизительно 60 минут, где объем воды равен приблизительно 0,4-кратной массе сырого шелка, и количество Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> равно приблизительно 0,848-кратной массе кусков для получения экстракта фиброина шелка; тройную промывку экстракта фиброина шелка при приблизительно 60°C в течение приблизительно 20 минут на промывку в объеме промывочной воды, где объем промывочной воды для каждого цикла равен приблизительно 0,2 л на массу кусков; удаление избытка воды из экстракта фиброина шелка; сушку экстракта фиброина шелка; растворение сухого экстракта фиброина шелка в растворе LiBr, где раствор LiBr сначала нагревают до приблизительно 100°C для получения раствора шелка и LiBr и держат при этой температуре; помещение раствора шелка и LiBr в сушильный шкаф при приблизительно 100°C на приблизительно 60 минут для достижения полного растворения и дальнейшей фрагментации нативной структуры белка шелка в смесь с желаемой молекулярной массой и полидисперсностью; фильтрацию раствора для удаления любого оставшегося дебриса шелкопрядов; разведения раствора водой для получения 1% раствора шелка и удаления растворителя из раствора с использованием тангенциальной поточной фильтрации (TFF). В варианте осуществления для очистки раствора шелка и получения конечного желаемого соотношения шелка и воды используют мембрану с отсечкой 10 кДа. Затем TFF можно использовать для дальнейшего концентрирования чистого раствора шелка до концентрации 2% шелка в воде.

Каждую стадию способа от сырых коконов до диализа можно масштабировать для повышения эффективности производства. В настоящее время целые коконы приобретают в виде сырья, но также используют предварительно очищенные коконы или термически необработанные коконы, в случае которых после удаления гусеницы остается минимальный дебрис. Нарезание и очистку коконов осуществляют вручную, однако для масштабируемости этот способ можно делать менее трудозатратным, например, с использованием автоматизированного устройства в комбинации со сжатым воздухом для удаления гусеницы и любых твердых частиц, или с использованием режущей мельницы для нарезки коконов на меньшие куски. Стадию экстракции, в настоящее время осуществляемую в небольших партиях, можно проводить в более крупных сосудах, например, промышленной стиральной машине, где можно поддерживать температуры от 60°C до 100°C. Стадию промывки также можно осуществлять в промышленной стиральной машине, устраняя циклы промывки вручную. Растворение шелка в растворе LiBr можно осуществлять в ином сосуде, чем конвекционная печь, например, в реакторе с

мешалкой. Диализ шелка с помощью серии замен воды является ручным и времязатратным способом, который можно ускорять, изменяя некоторые параметры, например, разбавляя раствор шелка перед диализом. Способ диализа можно масштабировать для производства с использованием полуавтоматизированного оборудования, например, системы тангенциальной поточной фильтрации.

Варьирование параметров экстракции (т.е. времени и температуры), LiBr (т.е. температуры раствора LiBr при добавлении к экстракту фиброина шелка или наоборот) и растворения (т.е. времени и температуры) приводит к получению растворов растворителя и шелка с разными вязкостями, гомогенностью и цветом. Все из повышения температуры экстракции, увеличения времени экстракции, использования более высокой температуры раствора LiBr при всплывании и во время растворения шелка и повышения времени и температуры (например, в печи, как приведено в настоящем описании, или альтернативном источнике тепла) приводило к получению менее вязких и более гомогенных растворов растворителя и шелка. Хотя почти все параметры приводили к получению устойчивого раствора шелка, способы, позволяющие достигать полного растворения за менее чем 4-6 часов, являются предпочтительными для масштабируемости способа.

Молекулярную массу фрагментов белка шелка можно контролировать в соответствии с конкретными параметрами, используемыми на стадии экстракции, включая время экстракции и температуру; конкретными параметрами, используемыми на стадии растворения, включая температуру LiBr в момент погружения шелка в бромид лития и время, в течение которого раствор держат при конкретных температурах; и конкретными параметрами, используемыми на стадии фильтрации. Контролируя технологические параметры описываемыми способами, можно получать растворы смесей SPF с полидисперсностью, равной 2,5 или менее при различных молекулярных массах в диапазоне от 1 кДа до 250 кДа, от 5 кДа до 200 кДа, от 5 кДа до 150 кДа, от 10 кДа до 150 кДа, или от 10 кДа до 80 кДа. Изменяя параметры способа для получения растворов шелка с разными молекулярными массами, можно воздействовать на диапазон конечных продуктов смесей фрагментов с желаемой полидисперсностью 2,5 или менее с учетом требований к желаемым характеристикам. Например, пленка шелка с меньшей молекулярной массой, содержащей лекарственное средство, может иметь более высокую скорость высвобождения по сравнению с препаратом SPF с более высокой молекулярной массой. Кроме того, можно получать растворы смесей SPF с полидисперсностью более 2,5. Кроме того, для получения комбинированных растворов можно смешивать два раствора с разными средними молекулярными массами и полидисперсностями. Альтернативно, жидкую шелкоотделительную железу (белок шелка, на 100% не содержащую серицин), удаленную непосредственно из гусеницы, можно использовать в комбинации с любым из растворов смесей SPF по настоящему изобретению. Молекулярную массу композиции белковых фрагментов чистого фиброина шелка определяли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с

рефрактометрическим детектором (RID). Полидисперсность вычисляли с использованием программного обеспечения Cirtus GPC Online GPC/SEC версии 3.3 (Agilent).

Параметры варьировали во время переработки сырых шелковых коконов в раствор шелка. Изменение этих параметров влияло на MW получаемого раствора шелка. Параметры, на которые воздействовали, включали (i) время и температуру экстракции, (ii) температуру LiBr, (iii) температуру при растворении в печи и (iv) время растворения. Молекулярную массу определяли с использованием масс-спектрометрии, как показано на фиг. 9-25.

Эксперименты осуществляли для определения эффекта варьирования времени экстракции. Фиг. 9-15 являются графиками, на которых показаны эти результаты, и в таблицах 2-8 обобщены результаты. Ниже приведены краткие итоги:

- Время экстракции серицина 30 минут приводило к достижению большей MW, чем при времени экстракции серицина 60 минут
- MW снижалась в печи с течением времени
- Температура LiBr и печи 140°C приводила к тому, что нижний предел доверительного интервала соответствовал MW менее 9500 Да
- При 30-минутной экстракции в моменты времени 1 час и 4 часа обнаруживали нерасщепленный шелк
- При 30-минутной экстракции в момент времени 1 час достигали значимо высокой молекулярной массы, при этом нижний предел доверительного интервала составлял 35000 Да
- Диапазон достигнутой MW в случае верхнего предела доверительного интервала составлял от 18000 до 216000 Да (что важно для получения растворов с определенным верхним пределом)

**Таблица 2.** Эффект времени экстракции (30 мин и 60 мин) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, 100°C бромида лития (LiBr) и растворения в печи при 100°C (время в печи/растворения варьировали).

Время кипячения	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
30	1	57247	12780	35093	93387	1,63
60	1	31520	1387	11633	85407	2,71
30	4	40973	2632	14268	117658	2,87
60	4	25082	1248	10520	59803	2,38
30	6	25604	1405	10252	63943	2,50
60	6	20980	1262	10073	43695	2,08

**Таблица 3.** Эффект времени экстракции (30 мин и 60 мин) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, кипящего



бромид лития (LiBr) и растворения в печи при 60°C в течение 4 ч.							
Образец	Время кипячения	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный		PD	
				интервал			
30 мин, 4 ч.	30	49656	4580	17306	142478	2,87	
60 мин, 4 ч.	60	30042	1536	11183	80705	2,69	
<b>Таблица 4.</b> Эффект времени экстракции (30 мин и 60 мин) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, 60°C бромида лития (LiBr) и растворения в печи при 60°C (время в печи/растворения варьировали).							
Образец	Время кипяч ения	Время в печи	Средняя Mw	Стандартно е отклонение	Доверительный		PD
					интервал		
30 мин, 1 ч.	30	1	58436		22201	153809	2,63
60 мин, 1 ч.	60	1	31700		11931	84224	2,66
30 мин, 4 ч.	30	4	61956,5	13337	21463	178847	2,89
60 мин, 4 ч.	60	4	25578,5	2446	9979	65564	2,56
<b>Таблица 5.</b> Эффект времени экстракции (30 мин и 60 мин) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, 80°C бромида лития (LiBr) и растворения в печи при 80°C в течение 6 ч.							
Образец	Время кипячения	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный		PD	
				интервал			
30 мин, 6 ч.	30	63510		18693	215775	3,40	
60 мин, 6 ч.	60	25164	238	9637	65706	2,61	
<b>Таблица 6.</b> Эффект времени экстракции (30 мин и 60 мин) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, 80°C бромида лития (LiBr) и растворения в печи при 60°C (время в печи/растворения варьировали).							
Образец	Время кипяч ения	Время в печи	Средняя Mw	Стандартно е отклонение	Доверительный		PD
					интервал		
30 мин, 4 ч.	30	4	59202	14028	19073	183760	3,10
60 мин, 4 ч.	60	4	26312,5	637	10266	67442	2,56
30 мин, 6 ч.	30	6	46824		18076	121293	2,59
60 мин, 6 ч.	60	6	26353		10168	68302	2,59

**Таблица 7.** Эффект времени экстракции (30 мин и 60 мин) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, 100°C бромида лития (LiBr) и растворения в печи при 60°C (время в печи/растворения варьировали).

Образец	Время кипячения	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
30 мин, 4 ч.	30	4	47853		19758	115900	2,42
60 мин, 4 ч.	60	4	25082	1248	10520	59804	2,38
30 мин, 6 ч.	30	6	55421	8992	19153	160366	2,89
60 мин, 6 ч.	60	6	20980	1262	10073	43694	2,08

**Таблица 8.** Эффект времени экстракции (30 мин и 60 мин) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, 140°C бромида лития (LiBr) и растворения в печи при 140°C (время в печи/растворения варьировали).

Образец	Время кипячения	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
30 мин, 4 ч.	30	4	9024,5	1102	4493	18127	2,00865
60 мин, 4 ч.	60	4	15548		6954	34762	2,2358
30 мин, 6 ч.	30	6	13021		5987	28319	2,1749
60 мин, 6 ч.	60	6	10888		5364	22100	2,0298

Эксперименты осуществляли для определения эффекта варьирования температуры экстракции. Фиг. 16 является графиком, на котором показаны эти результаты, и в таблице 9 результаты обобщены. Ниже приведены краткие итоги:

- Экстракция серицина при 90°C приводила к достижению более высокой MW, чем экстракция серицина при 100°C

- При 90°C и 100°C наблюдали снижение MW в печи с течением времени

**Таблица 9.** Эффект температуры экстракции (90°C и 100°C) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях 60 мин. Температуры

экстракции, 100°C бромида лития (LiBr) и растворение в печи при 100°C (время в печи/растворения варьировали).							
Образец	Время кипячения	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение e	Доверительный интервал		PD
90°C, 4 ч.	60	4	37308	4204	13368	104119	2,79
100°C, 4 ч.	60	4	25082	1248	10520	59804	2,38
90°C, 6 ч.	60	6	34224	1135	12717	92100	2,69
100°C, 6 ч.	60	6	20980	1262	10073	43694	2,08

Эксперименты осуществляли для определения эффекта варьирования температуры бромида лития (LiBr) при добавлении к шелку. Фиг. 17-18 являются графиками, на которых показаны эти результаты, и в таблицах 10-11 обобщены результаты. Ниже приведены краткие итоги:

- Отсутствие влияния на MW или доверительный интервал (все CI ~10500-6500 Да)
- Исследования показали, что, когда добавляют LiBr и он начинает растворяться, температура раствора LiBr-шелк быстро падает ниже исходной температуры LiBr, т.к. основная часть массы представляет собой шелк при комнатной температуре.

<b>Таблица 10.</b> Эффект температуры бромида лития (LiBr) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях времени экстракции 60 мин, температуры экстракции 100°C и растворения в печи при 60°C (время в печи/растворения варьировали).							
Образец	Температура LiBr (°C)	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
60°C LiBr, 1 ч.	60	1	31700		11931	84223	2,66
100°C LiBr, 1 ч.	100	1	27907	200	10735	72552	2,60
RT LiBr, 4 ч.	RT	4	29217	1082	10789	79119	2,71
60°C LiBr, 4 ч.	60	4	25578	2445	9978	65564	2,56
80°C LiBr, 4 ч.	80	4	26312	637	10265	67441	2,56

4 ч.							
100°C LiBr, 4 ч.	100	4	27681	1729	11279	67931	2,45
Кипящий LiBr, 4 ч.	Кипение	4	30042	1535	11183	80704	2,69
RT LiBr, 6 ч.	RT	6	26543	1893	10783	65332	2,46
80°C LiBr, 6 ч.	80	6	26353		10167	68301	2,59
100°C LiBr, 6 ч.	100	6	27150	916	11020	66889	2,46
<b>Таблица 11.</b> Эффект температуры бромида лития (LiBr) в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях времени экстракции 30 мин, температура экстракции 100°C и растворение в печи при 60°C (время в печи/растворения варьировали).							
Образец	Температура LiBr (°C)	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
60°C LiBr, 4 ч.	60	4	61956	13336	21463	178847	2,89
80°C LiBr, 4 ч.	80	4	59202	14027	19073	183760	3,10
100°C LiBr, 4 ч.	100	4	47853		19757	115899	2,42
80°C LiBr, 6 ч.	80	6	46824		18075	121292	2,59
100°C LiBr, 6 ч.	100	6	55421	8991	19152	160366	2,89

Эксперименты осуществляли для определения эффекта температуры печи/растворения. Фиг. 19-23 являются графиками, на которых показаны эти результаты, и в таблицах 12-16 результаты обобщены. Ниже приведены краткие итоги:

- Температура печи имеет меньший эффект в отношении шелка, экстрагируемого в течение 60 мин, чем экстрагируемого в течение 30 мин. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что 30-минутный шелк меньше деградирует во время экстракции и, таким образом, температура печи имеет больший эффект в отношении менее деградировавшей части шелка с большей MW.

- В случае температуры печи 60°C и 140°C экстрагируемый в течение 30 мин шелк демонстрировал очень достоверный эффект, связанный с более низкой MW при более высокой температуре печи, в то время как шелк, экстрагируемый в течение 60 мин, имел гораздо меньший эффект

- Температура печи 140°C приводила к получению нижнего предела доверительного интервала ~6000 Да

**Таблица 12.** Эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 30 мин и 100°C бромида лития (LiBr) (время в печи/растворения варьировали).

Время кипячения	Температура печи(°C)	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
30	60	4	47853		19758	115900	2,42
30	100	4	40973	2632	14268	117658	2,87
30	60	6	55421	8992	19153	160366	2,89
30	100	6	25604	1405	10252	63943	2,50

**Таблица 13.** Эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 60 мин и 100°C бромида лития (LiBr) (время в печи/растворения варьировали).

Время кипячения	Температура печи(°C)	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
60	60	1	27908	200	10735	72552	2,60
60	100	1	31520	1387	11633	85407	2,71
60	60	4	27681	1730	11279	72552	2,62
60	100	4	25082	1248	10520	59803	2,38
60	60	6	27150	916	11020	66889	2,46
60	100	6	20980	1262	10073	43695	2,08

**Таблица 14.** Эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 60 мин и 140°C бромида лития (LiBr) (время в печи/растворения варьировали).

Время кипячения	Температура	Время в	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD

	печи (°C)	печи					
60	60	4	30042	1536	11183	80705	2,69
60	140	4	15548		7255	33322	2,14

**Таблица 15.** Эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 30 мин и 140°C бромида лития (LiBr) (время в печи/растворения варьировали).

Время кипячения	Температура печи (°C)	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
30	60	4	49656	4580	17306	142478	2,87
30	140	4	9025	1102	4493	18127	2,01
30	60	6	59383	11640	17641	199889	3,37
30	140	6	13021		5987	28319	2,17

**Таблица 16.** Эффект температуры печи/растворения в отношении молекулярной массы шелка, обрабатываемого в условиях температуры экстракции 100°C, времени экстракции 60 мин и 80°C бромида лития (LiBr) (время в печи/растворения варьировали).

Время кипячения	Температура печи (°C)	Время в печи	Средняя Mw	Стандартное отклонение	Доверительный интервал		PD
60	60	4	26313	637	10266	67442	2,56
60	80	4	30308	4293	12279	74806	2,47
60	60	6	26353		10168	68302	2,59
60	80	6	25164	238	9637	65706	2,61

В варианте осуществления способы, представленные в настоящем описании, приводят к получению раствора с характеристиками, которые можно контролировать при производстве, включая, в качестве неограничивающих примеров: MW - можно варьировать, изменяя время и температуру экстракции и/или растворения (например, температуру LiBr), давление и фильтрацию (например, эксклюзионную хроматографию); структура - удаление или расщепление тяжелой или легкой цепи белкового полимера

фиброина; чистота - температура промывки горячей водой для улучшенного удаления серицина или пропускная способность фильтра для улучшенного удаления твердых частиц, неблагоприятно влияющих на стабильность при хранении раствора смеси фрагментов белка шелка; цвет - цвет раствора можно контролировать, например, с использованием температуры или времени обработки LiBr; вязкость; прозрачность и стабильность раствора. Получаемый pH раствора, как правило, составляет приблизительно 7, и его можно изменять с использованием кислоты или основания, при необходимости, в соответствии с требованиями для хранения.

Описанные выше растворы смеси SPF можно использовать для получения тканевых филлеров, содержащих SPF, как представлено в настоящем описании.

Способ получения водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, имеющих среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, включает стадии: обесклеивания источника шелка посредством добавления источника шелка в кипящий (100°C) водный раствор карбоната натрия на время от приблизительно 30 минут до приблизительно 60 минут; удаления серицина из раствора для получения экстракта фиброина шелка, содержащего неопределимые уровни серицина; дренирования раствора из экстракта фиброина шелка; растворения экстракта фиброина шелка в растворе бромида лития, имеющего начальную температуру после помещения экстракта фиброина шелка в раствор бромида лития в диапазоне от приблизительно 60°C до приблизительно 140°C; поддержания раствора фиброина шелка-бромида лития в печи, имеющей температуру приблизительно 140°C в течение по меньшей мере 1 часа; удаления бромида лития из экстракта фиброина шелка; и получения водного раствора фрагментов белка шелка, содержащего: фрагменты, имеющие среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, и где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка имеет полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. Способ может дополнительно включать сушку экстракта фиброина шелка перед стадией растворения. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный бромид лития менее 300 м.д., что измеряют с использованием анализа бромида лития посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный карбонат натрия менее 100 м.д., что измеряют с использованием анализа карбоната натрия посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Способ может дополнительно включать добавление терапевтического средства в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление молекулы, выбранной из антиоксиданта или фермента, в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление витамина в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Витамин может являться витамином С или его производным. Водный раствор

чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка можно лиофилизировать. Способ может дополнительно включать добавление альфа-гидроксикислот в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Альфа-гидроксикислота может быть выбрана из группы, состоящей из гликолевой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты и лимонной кислоты. Способ может дополнительно включать добавление гиалуроновой кислоты или ее солевой формы в концентрации от приблизительно 0,5% до приблизительно 10,0% в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление по меньшей мере одного из оксида цинка или диоксида титана. Пленку можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, полученных этим способом. Пленка может содержать от приблизительно 1,0% масс. до приблизительно 50,0% масс. витамина С или его производного. Пленка может иметь содержание воды в диапазоне от приблизительно 2,0% масс. до приблизительно 20,0% масс. Пленка может содержать от приблизительно 30,0% масс. до приблизительно 99,5% масс. чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Гель можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, полученных этим способом. Гель может содержать от приблизительно 0,5% масс. до приблизительно 20,0% масс. витамина С или его производного. Гель может иметь содержание шелка по меньшей мере 2% и содержание витамина по меньшей мере 20%.

Способ получения водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, имеющих среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, включает стадии: обесклеивания источника шелка посредством добавления источника шелка в кипящий (100°C) водный раствор карбоната натрия на время от приблизительно 30 минут до приблизительно 60 минут; удаления серицина из раствора для получения экстракта фиброина шелка, содержащего недетектируемые уровни серицина; дренирования раствора из экстракта фиброина шелка; растворения экстракта фиброина шелка в растворе бромида лития, имеющем начальную температуру после помещения экстракта фиброина шелка в раствор бромида лития в диапазоне от приблизительно 60°C до приблизительно 140°C; поддержания раствора фиброина шелка-бромида лития в печи, имеющей температуру приблизительно 140°C, в течение по меньшей мере 1 часа; удаления бромида лития из экстракта фиброина шелка; и получения водного раствора фрагментов белка шелка, содержащего: фрагменты, имеющие среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, и где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка имеет полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. Способ может дополнительно включать сушку экстракта фиброина шелка перед стадией растворения. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный бромид лития менее 300 м.д., что измеряют с использованием анализа бромида лития посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Водный раствор чистых белковых



фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный карбонат натрия менее 100 м.д., что измеряют с использованием анализа карбоната натрия посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Способ может дополнительно включать добавление терапевтического средства в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление молекулы, выбранной из антиоксиданта или фермента, в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление витамина в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Витамин может являться витамином С или его производным. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка можно лиофилизировать. Способ может дополнительно включать добавление альфа-гидроксикислоты в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Альфа-гидроксикислота может быть выбрана из группы, состоящей из гликолевой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты и лимонной кислоты. Способ может дополнительно включать добавление гиалуроновой кислоты или ее солевой формы в концентрации от приблизительно 0,5% до приблизительно 10,0% в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление по меньшей мере одного из оксида цинка или диоксида титана. Пленку можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, получаемых этим способом. Пленка может содержать от приблизительно 1,0% масс. до приблизительно 50,0% масс. витамина С или его производного. Пленка может иметь содержание воды в диапазоне от приблизительно 2,0% масс. до приблизительно 20,0% масс. Пленка может содержать от приблизительно 30,0% масс. до приблизительно 99,5% масс. чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Гель можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, получаемых этим способом. Гель может содержать от приблизительно 0,5% масс. до приблизительно 20,0% масс. витамина С или его производного. Гель может иметь содержание шелка по меньшей мере 2% и содержание витамина по меньшей мере 20%.

Способ получения водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, имеющих среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, включает стадии: обесклеивания источника шелка посредством добавления источника шелка в кипящий (100°C) водный раствор карбоната натрия на время от приблизительно 30 минут до приблизительно 60 минут; удаления серицина из раствора для получения экстракта фиброина шелка, содержащего недетектируемые уровни серицина; дренирования раствора из экстракта фиброина шелка; растворения экстракта фиброина шелка в растворе бромида лития, имеющего начальную температуру после помещения экстракта фиброина шелка в раствор бромида лития в диапазоне от приблизительно 60°C до приблизительно 140°C; поддержания раствора фиброина шелка-бромида лития в печи, имеющей температуру приблизительно 140°C, в течение по меньшей мере 1 часа; удаления бромида лития из

экстракта фиброина шелка; и получения водного раствора фрагментов белка шелка, содержащего: фрагменты, имеющие среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, и где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка имеет полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. Способ может дополнительно включать сушку экстракта фиброина шелка перед стадией растворения. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный бромид лития менее 300 м.д., что измеряют с использованием анализа бромида лития посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный карбонат натрия менее 100 м.д., что измеряют с использованием анализа карбоната натрия посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Способ может дополнительно включать добавление терапевтического средства в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление молекулы, выбранной из антиоксиданта или фермента, в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление витамина в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Витамин может являться витамином С или его производным. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка можно лиофилизировать. Способ может дополнительно включать добавление альфа-гидроксикислоты в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Альфа-гидроксикислота может быть выбрана из группы, состоящей из гликолевой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты и лимонной кислоты. Способ может дополнительно включать добавление гиалуроновой кислоты или ее солевой формы в концентрации от приблизительно 0,5% до приблизительно 10,0% в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление по меньшей мере одного из оксида цинка или диоксида титана. Пленку можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, получаемых этим способом. Пленка может содержать от приблизительно 1,0% масс. до приблизительно 50,0% масс. витамина С или его производного. Пленка может иметь содержание воды в диапазоне от приблизительно 2,0% масс. до приблизительно 20,0% масс. Пленка может содержать от приблизительно 30,0% масс. до приблизительно 99,5% масс. чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Гель можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, получаемых этим способом. Гель может содержать от приблизительно 0,5% масс. до приблизительно 20,0% масс. витамина С или его производного. Гель может иметь содержание шелка по меньшей мере 2% и содержание витамина по меньшей мере 20%.

Способ получения водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, имеющих среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа, включает стадии: добавления

источника шелка в кипящий (100°C) водный раствор карбоната натрия на время от приблизительно 30 минут до приблизительно 60 минут так, чтобы достигать обесклеивания; удаления серицина из раствора для получения экстракта фиброина шелка, содержащего недетектируемые уровни серицина; дренирования раствора из экстракта фиброина шелка; растворения экстракта фиброина шелка в растворе бромида лития, имеющем начальную температуру после помещения экстракта фиброина шелка в раствор бромида лития в диапазоне от приблизительно 80°C до приблизительно 140°C; поддержания раствора фиброина шелка-бромида лития в сушильном шкафу, имеющем температуру в диапазоне от приблизительно 60°C до приблизительно 100°C, в течение по меньшей мере 1 часа; удаления бромида лития из экстракта фиброина шелка; и получения водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка содержит остаточный бромид лития от приблизительно 10 м.д. до приблизительно 300 м.д., где водный раствор фрагментов белка шелка содержит остаточный карбонат натрия от приблизительно 10 м.д. до приблизительно 100 м.д., где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка содержит фрагменты, имеющие среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа, и где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка имеет полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. Способ может дополнительно включать сушку экстракта фиброина шелка перед стадией растворения. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный бромид лития менее 300 м.д., что измеряют с использованием анализа бромида лития посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный карбонат натрия менее 100 м.д., что измеряют с использованием анализа карбоната натрия посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Способ может дополнительно включать добавление терапевтического средства в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление молекулы, выбранной из антиоксиданта или фермента, в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление витамина в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Витамин может являться витамином С или его производным. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка можно лиофилизировать. Способ может дополнительно включать добавление альфа-гидроксикислоты в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Альфа-гидроксикислота может быть выбрана из группы, состоящей из гликолевой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты и лимонной кислоты. Способ может дополнительно включать добавление гиалуроновой кислоты или ее солевой формы в концентрации от приблизительно 0,5% до приблизительно 10,0% в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно

включать добавление по меньшей мере одного из оксида цинка или диоксида титана.

Гель можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, получаемых этим способом. Гель может содержать от приблизительно 0,5% масс. до приблизительно 20,0% масс. витамина С или его производного. Гель может иметь содержание шелка по меньшей мере 2% и содержание витамина по меньшей мере 20%.

В аспектах, проиллюстрированных в настоящем описании, описан способ получения водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, имеющих среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа, включающий стадии: добавления источника шелка в кипящий (100°C) водный раствор карбоната натрия на время приблизительно 30 минут так, чтобы достигать обесклеивания; удаления серицина из раствора для получения экстракта фиброина шелка, содержащего недетектируемые уровни серицина; дренирования раствора из экстракта фиброина шелка; растворения экстракта фиброина шелка в растворе бромида лития, имеющего начальную температуру после помещения экстракта фиброина шелка в раствор бромида лития в диапазоне от приблизительно 80°C до приблизительно 140°C; поддержания раствора фиброина шелка-бромида лития в сушильном шкафу, имеющем температуру в диапазоне от приблизительно 60°C до приблизительно 100°C, в течение по меньшей мере 1 часа; удаления бромида лития из экстракта фиброина шелка; и получения водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка содержит остаточный бромид лития от приблизительно 10 м.д. до приблизительно 300 м.д., остаточный карбонат натрия от приблизительно 10 м.д. до приблизительно 100 м.д., фрагменты, имеющие среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 40 кДа до приблизительно 65 кДа, и где водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка имеет полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0. Способ может дополнительно включать сушку экстракта фиброина шелка перед стадией растворения. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный бромид лития менее 300 м.д., что измеряют с использованием анализа бромида лития посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка может содержать остаточный карбонат натрия менее 100 м.д., что измеряют с использованием анализа карбоната натрия посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Способ может дополнительно включать добавление терапевтического средства в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление молекулы, выбранной из антиоксиданта или фермента, в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление витамина в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Витамин может

являться витамином С или его производным. Водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка можно лиофилизировать. Способ может дополнительно включать добавление альфа-гидроксикислоты в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Альфа-гидроксикислота может быть выбрана из группы, состоящей из гликолевой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты и лимонной кислоты. Способ может дополнительно включать добавление гиалуроновой кислоты или ее солевой формы в концентрации от приблизительно 0,5% до приблизительно 10,0% в водный раствор чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка. Способ может дополнительно включать добавление по меньшей мере одного из оксида цинка или диоксида титана.

Гель можно получать из водного раствора чистых белковых фрагментов на основе фиброина шелка, получаемых этим способом. Гель может содержать от приблизительно 0,5% масс. до приблизительно 20,0% масс. витамина С или его производного. Гель может иметь содержание шелка по меньшей мере 2% и содержание витамина по меньшей мере 20%.

#### Гиалуроновая кислота и гели гиалуроновой кислоты

Биодеградируемый полимерный компонент по настоящему изобретению представляет собой гиалуронат, также известный как гиалуроновая кислота (НА). НА состоит из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Этот водорастворимый полимер в природе обнаруживают почти во всех тканях, особенно, во внеклеточном матриксе, глазах и синовиальной жидкости суставов. НА коммерчески доступна в чистой форме. Филлеры с небольшими гелевыми частицами НА можно использовать для стимуляции природной продукции коллагена, которая, как предполагают, вызвана механическим растяжением дермы и активацией дермальных фибробластов.

Концентрация НА в получаемых дермальных филлерах по изобретению вносит вклад в жесткость и долговечность дермального филлера. В некоторых вариантах осуществления повышенная концентрация НА в получаемых дермальных филлерах, представленных в настоящем описании, может повышать жесткость и/или долговечность получаемого дермального филлера по сравнению с дермальным филлером, имеющим сравнительно меньшую концентрацию НА.

В некоторых вариантах осуществления НА, включенная в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеет молекулярную массу 100000 дальтон или более, 150000 дальтон или более, 1 миллион дальтон или более или 2 миллиона дальтон или более. В некоторых вариантах осуществления НА, включенная в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеет молекулярную массу 100000 дальтон или менее, 150000 дальтон или менее, 1 миллион дальтон или менее или 2 миллиона дальтон или менее. В некоторых вариантах осуществления НА, включенная в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеет высокую молекулярную массу (например, молекулярная масса НА составляет от приблизительно 1 МДа до приблизительно 4 МДа).

В некоторых вариантах осуществления НА включенная в тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеет низкую молекулярную массу (например, молекулярная масса НА составляет менее приблизительно 1 МДа).

В некоторых вариантах осуществления источником НА может являться гиалуронатная соль, такая как, например, гиалуронат натрия. В некоторых вариантах осуществления НА является перекрестно-сшитой. Перекрестно-сшитую НА можно составлять в различных формах, таких как мембраны, гели, полугели, губки или микросферы. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитая НА находится в форме жидкого геля, т.е. принимает форму контейнера. Вязкость геля или полугеля НА можно изменять посредством добавления неконъюгированной НА и/или гиалуроната. Вязкость также можно настраивать, варьируя степень перекрестной сшивки SPF-SPF, SPF-НА и/или НА-НА, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 4% до приблизительно 12% НА может быть перекрестно-сшитой в виде НА-НА или НА-SPF.

В варианте осуществления композиции SPF, представленные в настоящем описании, можно комбинировать с НА для получения композиции тканевого филлера. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 99%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 98%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 97%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 96%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 95%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 94%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 93%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 92%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 91%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 90%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 85%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 80%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 75%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 70%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 65%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 60%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 55%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 50%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее 45%. В варианте осуществления процент НА по массе в композиции тканевого филлера составляет менее















3%, или от приблизительно 1% до приблизительно 4%, или от приблизительно 1% до приблизительно 5%, или от приблизительно 1% до приблизительно 6%, или от приблизительно 1% до приблизительно 7%, или от приблизительно 1% до приблизительно 8%, или от приблизительно 1% до приблизительно 9%, или от приблизительно 1% до приблизительно 10%, или от приблизительно 1% до приблизительно 11%, или от приблизительно 1% до приблизительно 12%, или от приблизительно 1% до приблизительно 13%, или от приблизительно 1% до приблизительно 14%, или от приблизительно 1% до приблизительно 15%, или от приблизительно 1% до приблизительно 16%, или от приблизительно 1% до приблизительно 17%, или от приблизительно 1% до приблизительно 18%, или от приблизительно 1% до приблизительно 19%, или от приблизительно 1% до приблизительно 20%, или от приблизительно 1% до приблизительно 21%, или от приблизительно 1% до приблизительно 22%, или от приблизительно 1% до приблизительно 23%, или от приблизительно 1% до приблизительно 24%, или от приблизительно 1% до приблизительно 25%, или от приблизительно 1% до приблизительно 30%, или от приблизительно 1% до приблизительно 40%, или от приблизительно 1% до приблизительно 50%, или от приблизительно 1% до приблизительно 60%, или от приблизительно 1% до приблизительно 70%, или от приблизительно 1% до приблизительно 80%, или от приблизительно 1% до приблизительно 95%; или от приблизительно 10% до приблизительно 20%, или от приблизительно 10% до приблизительно 25%, или от приблизительно 10% до приблизительно 30%, или от приблизительно 10% до приблизительно 35%, или от приблизительно 10% до приблизительно 40%, или от приблизительно 10% до приблизительно 45%, или от приблизительно 10% до приблизительно 50%, или от приблизительно 10% до приблизительно 55%, или от приблизительно 10% до приблизительно 60%, или от приблизительно 10% до приблизительно 65%, или от приблизительно 10% до приблизительно 70%, или от приблизительно 10% до приблизительно 75%, или от приблизительно 10% до приблизительно 80%, или от приблизительно 10% до приблизительно 85%, или от приблизительно 10% до приблизительно 90%, или от приблизительно 10% до приблизительно 95%.

В некоторых вариантах осуществления НА, представленную в настоящем описании, можно получать в коммерческих источниках, или ее могут продуцировать бактерии *Streptococcus equi*.

Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании и включающие НА, можно охарактеризовывать по видам их биологической активности *in vitro* и видам биологической активности *in vivo*. Например, можно осуществлять анализы *in vitro* части тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, на клеточную токсичность, резистентность к ферментативной деградации, возможность прохождения через шприц (например, вязкость раствора, скорость инъекирования, диаметр шприца/иглы) и/или морфологический анализ частиц. См., например, Park, et al., *J. Eur. Acad. Dermatol.*

Venerol. (2014) 28:565-568. Анализы *in vivo* можно осуществлять для определения исходных морфологических профилей, общего остаточного филлера, гистологической оценки, и они могут включать исследование образования гранулем или кожные побочные реакции. См., например, Park, et al., J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. (2014) 28:565-568; и Ramot, et al., Toxicology Pathology (2015) 43: 267-271.

### Желирование

В варианте осуществления можно получать гели шелка с использованием средства для желирования. В некоторых вариантах осуществления средство для желирования может представлять собой кислоту, электричество, смешивание и/или обработку ультразвуком.

В варианте осуществления при получении геля шелка в раствор шелка, представленный в настоящем описании, можно добавлять кислоту для облегчения желирования. В варианте осуществления при получении геля шелка, включающего нейтральную или основную молекулу и/или терапевтическое средство, для облегчения желирования можно добавлять кислоту. В варианте осуществления при получении геля шелка при повышении pH (когда гель делают более основным) повышают стабильность геля при хранении. В варианте осуществления при получении геля шелка повышение pH (когда гель делают более основным) позволяет нагружать большее количество кислой молекулы на гель.

В варианте осуществления при получении геля шелка для облегчения желирования через раствор шелка, представленный в настоящем описании, можно пропускать электричество.

В варианте осуществления при получении геля шелка для облегчения желирования можно использовать перемешивание раствора шелка, представленного в настоящем описании.

В варианте осуществления при получении геля шелка для облегчения желирования можно использовать обработку раствора шелка, представленного в настоящем описании, ультразвуком.

В варианте осуществления в гель шелка можно добавлять природные добавки для дополнительной стабилизации добавок. Например, можно использовать микроэлементы, такие как селен, или магний, или L-метионин. Кроме того, для дополнительного повышения стабильности можно добавлять светонепроницаемый контейнер.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать усилители желирования для ускорения желирования SPF. В некоторых вариантах осуществления раствор SPF можно смешивать с чистым спиртом или водным раствором спирта в разных объемных соотношениях с сопутствующим смешиванием посредством перемешивания или других форм встряхивания. В некоторых вариантах осуществления затем в этот спиртовой раствор-усилитель можно добавлять количество амфифильного пептида в качестве дополнительного усилителя конечного желирования. Степень ускорения можно повышать или снижать, при необходимости, посредством добавления большего или

меньшего количества компонента-усилителя в систему.

В некоторых вариантах осуществления скорость желирования можно повышать, повышая концентрацию SPF в растворе, используемом для получения геля. С этой целью можно использовать различные способы, включая, в качестве неограничивающих примеров: диализ промежуточного раствора SPF против буфера, включающего гигроскопические молекулы, такие как полиэтиленгликоль, стадию лиофилизации и/или стадию выпаривания. Повышенную температуру также можно использовать в качестве усилителя желирования. Кроме того, для усиления желирования можно использовать манипуляции с рН промежуточного раствора шелка способами, включающими, в качестве неограничивающих примеров, прямое титрование и газовый обмен. Для повышения скорости желирования также можно использовать включение избранных ионов, включая кальций и калий.

В некоторых вариантах осуществления желирования можно способствовать с использованием зародышеобразователей, включая органические и неорганические вещества, растворимые и нерастворимые в промежуточном продукте SPF. Зародышеобразователи могут включать, в качестве неограничивающих примеров, пептидные последовательности, связывающие молекулы шелка, уже желированный шелк и плохо растворимые богатые  $\beta$ -листами структуры. В некоторых вариантах осуществления дополнительным средством усиления желирования является использование механического возбуждения, достигаемого с помощью устройства ножничного типа, ультразвукового устройства или механического миксера.

Время, необходимое для полного желирования раствора шелка, может варьироваться от секунд до часов или дней, в зависимости от значений указанных выше параметров, а также исходного состояния агрегации и организации в растворе SPF. Объемная доля добавляемого усилителя может варьироваться от приблизительно 0% до приблизительно 99% общего объема системы (т.е. любой компонент можно добавлять к значительному избытку другого компонента или в любой относительной концентрации в этом диапазоне). Концентрация используемого раствора SPF может находиться в диапазоне от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 20% (масс./об.) и в любом другом подходящем диапазоне. Усилитель можно добавлять в раствор SPF или раствор SPF можно добавлять к усилителю. Полученный гидрогель SPF можно дополнительно химически или физически перекрестно сшивать для достижения измененных механических свойств.

В некоторых вариантах осуществления раствор усилителя добавляют в раствор SPF или наоборот, при этом раствор SPF имеет концентрацию SPF приблизительно 1% (масс./об.), приблизительно 2% (масс./об.), приблизительно 3% (масс./об.), приблизительно 4% (масс./об.), приблизительно 5% (масс./об.), приблизительно 6% (масс./об.), приблизительно 7% (масс./об.), приблизительно 8% (масс./об.), приблизительно 9% (масс./об.), приблизительно 10% (масс./об.), приблизительно 12% (масс./об.), приблизительно 15% (масс./об.), приблизительно 18% (масс./об.),

приблизительно 20% (масс./об.), приблизительно 25% (масс./об.) или приблизительно 30% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления раствор усилителя добавляют в раствор SPF, или наоборот, при этом раствор SPF имеет концентрацию SPF по меньшей мере 1% (масс./об.), по меньшей мере 2% (масс./об.), по меньшей мере 3% (масс./об.), по меньшей мере 4% (масс./об.), по меньшей мере 5% (масс./об.), по меньшей мере 6% (масс./об.), по меньшей мере 7% (масс./об.), по меньшей мере 8% (масс./об.), по меньшей мере 9% (масс./об.), по меньшей мере 10% (масс./об.), по меньшей мере 12% (масс./об.), по меньшей мере 15% (масс./об.), по меньшей мере 18% (масс./об.), по меньшей мере 20% (масс./об.), по меньшей мере 25% (масс./об.) или по меньшей мере 30% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления раствор усилителя добавляют в раствор SPF, или наоборот, при этом раствор SPF имеет концентрацию SPF от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 5% (масс./об.), от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 10% (масс./об.), от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 15% (масс./об.), от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 20% (масс./об.), от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 25% (масс./об.), от приблизительно 1% (масс./об.) до приблизительно 30% (масс./об.), от приблизительно 5% (масс./об.) до приблизительно 10% (масс./об.), от приблизительно 5% (масс./об.) до приблизительно 15% (масс./об.), от приблизительно 5% (масс./об.) до приблизительно 20% (масс./об.), от приблизительно 5% (масс./об.) до приблизительно 25% (масс./об.), от приблизительно 5% (масс./об.) до приблизительно 30% (масс./об.), приблизительно 10% (масс./об.) до приблизительно 15% (масс./об.), от приблизительно 10% (масс./об.) до приблизительно 20% (масс./об.), от приблизительно 10% (масс./об.) до приблизительно 25% (масс./об.) или от приблизительно 10% (масс./об.) до приблизительно 30% (масс./об.).

#### Гели и гидрогели - модификация и перекрестная сшивка

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к композициям, содержащим один или более гидрогелей, содержащих один или более перекрестно-сшитый полимеров матрицы. В рамках изобретения термин "перекрестно-сшитый" относится к межмолекулярным связям, соединяющим отдельные полимерные молекулы, макромолекулы и/или мономерные цепи в более стабильную структуру, подобную гелю. В связи с этим, перекрестно-сшитый полимер матрицы имеет по меньшей мере одну межмолекулярную связь, соединяющую по меньшей мере одну отдельную полимерную молекулу с другой, где первая отдельная полимерная молекула может иметь схожую или иную химическую природу относительно других молекул. Полимеры матрицы, представленные в настоящем описании, можно перекрестно сшивать с использованием диальдегидных и дисульфидных сшивающих средств, включая, в качестве неограничивающих примеров, многофункциональные перекрестно-сшивающие средства на основе PEG, дивинилсульфоны, диглицидиловые простые эфиры и бис-эпоксиды. Неограничивающие примеры сшивающих средств для SPF и/или HA включают дивинилсульфон (DVS), диглицидиловый простой эфир 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучение, глутаральдегид, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокс)этилен (EGDGE), 1,2,7,8-



диэпоксиктан (DEO), бискарбодимид (BCD), тетраглицидиловый простой эфир пентаэритрита (PETGE), дигидразид адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS), гексаметилендиамин (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексан или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство для НА может включать BDDE или DVS. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство для НА и/или SPF может являться BDDE, DVS, УФ-излучением, глутаральдегидом или карбодимидом, как представлено в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут содержать остаточное перекрестно-сшивающее средство. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут содержать лишь незначительные количества перекрестно-сшивающего средства, такие как, например, не более приблизительно 2 м.д., или не более приблизительно 1,9 м.д., или не более приблизительно 1,8 м.д., или не более приблизительно 1,7 м.д., или не более приблизительно 1,6 м.д., или не более приблизительно 1,5 м.д., или не более приблизительно 1,4 м.д., или не более приблизительно 1,3 м.д., или не более приблизительно 1,2 м.д., или не более приблизительно 1,1 м.д., или не более приблизительно 1,0 м.д., или не более приблизительно 0,9 м.д., или не более приблизительно 0,8 м.д., или не более приблизительно 0,7 м.д., или не более приблизительно 0,6 м.д., или не более приблизительно 0,5 м.д., или не более приблизительно 0,4 м.д., или не более приблизительно 0,3 м.д., или не более приблизительно 0,2 м.д., или не более приблизительно 0,1 м.д. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут содержать незначительные количества BDDE, но в концентрации не более приблизительно 2 м.д., или не более приблизительно 1,9 м.д., или не более приблизительно 1,8 м.д., или не более приблизительно 1,7 м.д., или не более приблизительно 1,6 м.д., или не более приблизительно 1,5 м.д., или не более приблизительно 1,4 м.д., или не более приблизительно 1,3 м.д., или не более приблизительно 1,2 м.д., или не более приблизительно 1,1 м.д., или не более приблизительно 1,0 м.д., или не более приблизительно 0,9 м.д., или не более приблизительно 0,8 м.д., или не более приблизительно 0,7 м.д., или не более приблизительно 0,6 м.д., или не более приблизительно 0,5 м.д., или не более приблизительно 0,4 м.д., или не более приблизительно 0,3 м.д., или не более приблизительно 0,2 м.д., или не более приблизительно 0,1 м.д. Как будет понятно специалисту в этой области, количество остаточного перекрестно-сшивающего средства, присутствующего в конкретном образце тканевого филлера, можно определять посредством газовой хроматографии-масс-спектрометрии.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать матрицу, которая может включать часть матрицы SPF и часть матрицы НА, где часть матрицы SPF включает смесь перекрестно-сшитых и

не-перекрестно-сшитых SPF, и часть матрицы HA включает смесь перекрестно-сшитой и не-перекрестно-сшитой HA.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению включают линкер-модифицированную HA. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению включают линкер-модифицированные SPF. Бифункциональные кросслинкеры могут реагировать с обоими концами, соединяя две разные молекулы HA, две разные молекулы SPF или молекулу HA с молекулой SPF. В некоторых вариантах осуществления кросслинкер связывается с молекулой HA только на одном конце, оставляя другой конец свешиваться боковой группой. В некоторых вариантах осуществления кросслинкер связывается с молекулой SPF только на одном конце, оставляя другой конец свешиваться боковой группой.

В рамках изобретения степень модификации (MoD) можно определять следующим образом (см., например, J. Kablik et al., *Dermatol Surg*, 2009 (35): 302-312):

Общий % степени модификации = % перекрестной сшивки + % боковых групп

MoD ее также можно определять следующим образом (см., например, L. Kenne et al., *Carbohydrate Polymers*, 2013 (91): 410-418):

$$MoD = \frac{p_{\text{связанных кросслинкеров}}}{p_{\text{дисахаридов HA}} + p_{\text{повторяющихся единиц SPF}}}$$

где  $p_{\text{связанных кросслинкеров}}$  является количеством связанных молекул кросслинкеров,  $p_{\text{дисахаридов HA}}$  является количеством дисахаридов в HA, и  $p_{\text{повторяющихся единиц SPF}}$  является количеством повторяющихся единиц в SPF. Эти количества можно определять посредством ЯМР с использованием характерных химических сдвигов кросслинкера, HA и SPF.

В некоторых вариантах осуществления MoD составляет от приблизительно 1% до 25%, от приблизительно 2% до приблизительно 20% или от приблизительно 3,5% до приблизительно 17,5%. В некоторых вариантах осуществления MoD составляет приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,9%, приблизительно 2,0%, приблизительно 2,1%, приблизительно 2,2%, приблизительно 2,3%, приблизительно 2,4%, приблизительно 2,5%, приблизительно 2,6%, приблизительно 2,7%, приблизительно 2,8%, приблизительно 2,9%, приблизительно 3,0%, приблизительно 3,1%, приблизительно 3,2%, приблизительно 3,3%, приблизительно 3,4%, приблизительно 3,5%, приблизительно 3,6%, приблизительно 3,7%, приблизительно 3,8%, приблизительно 3,9%, приблизительно 4,0%, приблизительно 4,1%, приблизительно 4,2%, приблизительно 4,3%, приблизительно 4,4%, приблизительно 4,5%, приблизительно 4,6%, приблизительно 4,7%, приблизительно 4,8%, приблизительно 4,9%, приблизительно 5,0%, приблизительно 5,1%, приблизительно 5,2%, приблизительно 5,3%, приблизительно 5,4%, приблизительно 5,5%, приблизительно 5,6%, приблизительно 5,7%, приблизительно 5,8%, приблизительно 5,9%, приблизительно 6,0%, приблизительно 6,1%, приблизительно 6,2%,



включают перекрестно-сшитые SPF. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению включают перекрестно-сшитую HA. Фрагмент SPF можно перекрестно сшивать с другим фрагментом SPF или HA. Перекрестно-сшитые молекулы SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA можно получать с использованием перекрестно-сшивающих средств различной длины, включая нулевую длину.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно получать в форме гидрогеля, содержащего перекрестно-сшитую HA и/или перекрестно-сшитые SPF. Перекрестно-сшитая HA и/или перекрестно-сшитые SPF (или перекрестно-сшитые молекулы SPF-HA) могут иметь измеримую степень перекрестной сшивки. В рамках изобретения термин "степень перекрестной сшивки" относится к количеству перекрестно-сшивающих единиц (или молекул, или остатков) относительно количества мономерных единиц в полимерной макромолекуле, являвшейся перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления мономерные единицы являются аминокислотами в SPF. В некоторых вариантах осуществления мономерные единицы являются дисахаридными мономерными единицами HA. Таким образом, композиция, содержащая перекрестно-сшитый полимер матрицы со степенью перекрестной сшивки 4%, означает, что, в среднем, есть четыре перекрестно-сшивающие молекулы на каждые 100 мономерных единиц. Если все остальные параметры равны, чем больше степень перекрестной сшивки, тем тверже становится гель. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что степень перекрестной сшивки в HA и/или SPF может приводить к получению более жестких материалов или получаемых из них композиций. Например, чем выше степень перекрестной сшивки, тем дольше такие материалы будут оставаться в организме. Фактически, не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что биосовместимые материалы, включающие перекрестно-сшитые материалы, будут иметь разные скорости биорезорбции, биоабсорбции и/или биodeградации в зависимости от степени перекрестной сшивки, где степень перекрестной сшивки обратно пропорциональна скорости биорезорбции, биоабсорбции и/или биodeградации. Кроме того, более значительная перекрестная сшивка в тканевых филлерах, представленных в настоящем описании, может снижать гидрофильность и подъемную силу таких тканевых филлеров.

В неограничивающем примере перекрестно-сшитые SPF, имеющие степень перекрестной сшивки приблизительно 5%, содержат приблизительно 5 перекрестно-сшивающих молекул на каждые 100 мономерных единиц, например, аминокислот, в перекрестно-сшитых SPF.

Неограничивающие примеры степени перекрестной сшивки включают от приблизительно 1% до приблизительно 15%, или от приблизительно 2% до приблизительно 14%, или от приблизительно 1% до приблизительно 2%, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,5%, или от приблизительно 2% до приблизительно 3%, или от приблизительно 2,5% до приблизительно 3,5%, или от приблизительно 3% до приблизительно 4%, или от приблизительно 3,5% до



осуществления композиция содержит перекрестно-сшитые SPF, где степень перекрестной сшивки составляет не более 1%, не более 2%, не более 3%, не более 4%, не более 5%, не более 6%, не более 7%, не более 8%, не более 9%, не более 10%, не более 11%, не более 12%, не более 13%, не более 14% или не более 15%. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит перекрестно-сшитые SPF, где степень перекрестной сшивки составляет от приблизительно 1% до приблизительно 15%, от приблизительно 2% до приблизительно 11%, от приблизительно 3% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 5%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, от приблизительно 11% до приблизительно 15%, от приблизительно 6% до приблизительно 10%, или от приблизительно 6% до приблизительно 8%, или от приблизительно 1% до приблизительно 2%, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,5%, или от приблизительно 2% до приблизительно 3%, или от приблизительно 2,5% до приблизительно 3,5%, или от приблизительно 3% до приблизительно 4%, или от приблизительно 3,5% до приблизительно 4,5%, или от приблизительно 4% до приблизительно 5%, или от приблизительно 4,5% до приблизительно 5,5%, или от приблизительно 5% до приблизительно 6%, или от приблизительно 5,5% до приблизительно 6,5%, или от приблизительно 6% до приблизительно 7%, или приблизительно 6,5% или приблизительно 7,5%, или от приблизительно 7% до приблизительно 8%, или приблизительно 7,5% или приблизительно 8,5%, или от приблизительно 8% до приблизительно 9%, или от приблизительно 8,5% до приблизительно 9,5%, или от приблизительно 9% до приблизительно 10%, или от приблизительно 9,5% до приблизительно 10,5%, или от приблизительно 10% до приблизительно 11%, или от приблизительно 10,5% до приблизительно 11,5%, или от приблизительно 11% до приблизительно 12%, или от приблизительно 11,5% до приблизительно 12,5%, или от приблизительно 12% до приблизительно 13%, или от приблизительно 12,5% до приблизительно 13,5%, или от приблизительно 13% до приблизительно 14%, или от приблизительно 13,5% до приблизительно 14,5%, или от приблизительно 14% до приблизительно 15%.

В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению содержит перекрестно-сшитую НА, где степень перекрестной сшивки составляет по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14% или по меньшей мере 15%. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит перекрестно-сшитую НА, где степень перекрестной сшивки составляет не более 1%, не более 2%, не более 3%, не более 4%, не более 5%, не более 6%, не более 7%, не более 8%, не более 9%, не более 10%, не более 11%, не более 12%, не более 13%, не более 14%, или не более 15%. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит перекрестно-сшитую НА, где степень перекрестной сшивки составляет от приблизительно 1% до приблизительно 15%, от приблизительно 2%

до приблизительно 11%, от приблизительно 3% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 5%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, от приблизительно 11% до приблизительно 15%, от приблизительно 6% до приблизительно 10%, или от приблизительно 6% до приблизительно 8%, или от приблизительно 1% до приблизительно 2%, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,5%, или от приблизительно 2% до приблизительно 3%, или от приблизительно 2,5% до приблизительно 3,5%, или от приблизительно 3% до приблизительно 4%, или от приблизительно 3,5% до приблизительно 4,5%, или от приблизительно 4% до приблизительно 5%, или от приблизительно 4,5% до приблизительно 5,5%, или от приблизительно 5% до приблизительно 6%, или от приблизительно 5,5% до приблизительно 6,5%, или от приблизительно 6% до приблизительно 7%, или приблизительно 6,5% или приблизительно 7,5%, или от приблизительно 7% до приблизительно 8%, или приблизительно 7,5% или приблизительно 8,5%, или от приблизительно 8% до приблизительно 9%, или от приблизительно 8,5% до приблизительно 9,5%, или от приблизительно 9% до приблизительно 10%, или от приблизительно 9,5% до приблизительно 10,5%, или от приблизительно 10% до приблизительно 11%, или от приблизительно 10,5% до приблизительно 11,5%, или от приблизительно 11% до приблизительно 12%, или от приблизительно 11,5% до приблизительно 12,5%, или от приблизительно 12% до приблизительно 13%, или от приблизительно 12,5% до приблизительно 13,5%, или от приблизительно 13% до приблизительно 14%, или от приблизительно 13,5% до приблизительно 14,5%, или от приблизительно 14% до приблизительно 15%.

В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению содержит перекрестно-сшитые SPF-НА, где степень перекрестной сшивки составляет по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14% или по меньшей мере 15%. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит перекрестно-сшитые SPF-НА, где степень перекрестной сшивки составляет не более 1%, не более 2%, не более 3%, не более 4%, не более 5%, не более 6%, не более 7%, не более 8%, не более 9%, не более 10%, не более 11%, не более 12%, не более 13%, не более 14% или не более 15%. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит перекрестно-сшитые SPF-НА, где степень перекрестной сшивки составляет от приблизительно 1% до приблизительно 15%, от приблизительно 2% до приблизительно 11%, от приблизительно 3% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 5%, от приблизительно 10% до приблизительно 15%, от приблизительно 11% до приблизительно 15%, от приблизительно 6% до приблизительно 10%, или от приблизительно 6% до приблизительно 8%, или от приблизительно 1% до приблизительно 2%, от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,5%, или от приблизительно 2% до приблизительно 3%, или от приблизительно 2,5% до

приблизительно 3,5%, или от приблизительно 3% до приблизительно 4%, или от приблизительно 3,5% до приблизительно 4,5%, или от приблизительно 4% до приблизительно 5%, или от приблизительно 4,5% до приблизительно 5,5%, или от приблизительно 5% до приблизительно 6%, или от приблизительно 5,5% до приблизительно 6,5%, или от приблизительно 6% до приблизительно 7%, или приблизительно 6,5% или приблизительно 7,5%, или от приблизительно 7% до приблизительно 8%, или приблизительно 7,5% или приблизительно 8,5%, или от приблизительно 8% до приблизительно 9%, или от приблизительно 8,5% до приблизительно 9,5%, или от приблизительно 9% до приблизительно 10%, или от приблизительно 9,5% до приблизительно 10,5%, или от приблизительно 10% до приблизительно 11%, или от приблизительно 10,5% до приблизительно 11,5%, или от приблизительно 11% до приблизительно 12%, или от приблизительно 11,5% до приблизительно 12,5%, или от приблизительно 12% до приблизительно 13%, или от приблизительно 12,5% до приблизительно 13,5%, или от приблизительно 13% до приблизительно 14%, или от приблизительно 13,5% до приблизительно 14,5%, или от приблизительно 14% до приблизительно 15%.

Например, можно перекрестно сшивать 1 моль SPF с 1 моль НА, где моль НА может иметь молекулярную массу от приблизительно 1 кДа до приблизительно 2 миллионов кДа. В некоторых вариантах осуществления можно перекрестно сшивать 1 моль SPF и 1 миллион моль НА, или наоборот, где SPF могут иметь массу от 100 Да до 350 кДа, где любая процентная доля каждого моля может быть перекрестно-сшитой или свободной. Способ перекрестной сшивки SPF с другим SPF может включать одну или более стадий. На первой стадии эпоксид, такой как BDDE, добавляют к раствору SPF в избытке и позволяют реакции произойти. Эпоксиды могут реагировать с различными группами на макромолекуле SPF, такими как карбоксил, амин, спирт, тиол и т.п., что приводит к образованию таких соединений, как сложные эфиры, вторичные или третичные амины, простые эфиры, тиоэфиры и т.п. Если оба эпоксида в BDDE прореагировали с функциональными группами в одной или более макромолекулах SPF, SPF становится перекрестно-сшитым. В варианте осуществления перекрестную сшивку НА можно осуществлять с помощью реакции с BDDE в щелочных условиях для получения ковалентной связи между НА и кросслинкером, как описано в Schanté et al., *Carbohydrate Polymers* (2011) 85:469-489. Степень модификации или перекрестной сшивки можно определять посредством ЯМР известными в этой области способами (например, Edsman et al., *Dermatol. Surg.* (2012) 38: 1170-1179).

Способы соединения пептидов известны в этой области. Соединение отдельных изолированных SPF в олигомерные и/или перекрестно-сшитые пептиды SPF, как указано в настоящем описании, можно осуществлять способами химической конъюгации, известными в этой области, например, посредством создания пептидных связей, использования конденсирующих средств и хорошо известных бифункциональных перекрестно-сшивающих средств. Конъюгация может быть прямой, включающей связи,



не затрагивающие какую-либо промежуточную группу, например, прямые пептидные связи, или косвенной, где соединение содержит промежуточный остаток, такой как белок или пептид, например, альбумин плазмы, или другую спейсерную молекулу. Например, связывание можно осуществлять с помощью гетеробифункционального или гомобифункционального кросслинкера, например, карбодиимида, глутаральдегида, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP) и его производных, бис-малеимида, 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата и т.п.

Перекрестную сшивку также можно осуществлять без экзогенных кросслинкеров, используя реакционноспособные группы на молекулах, подлежащих конъюгации. Способы химической перекрестной сшивки пептидных молекул, как правило, известны в этой области, и ряд гетеро- и гомобифункциональных средств описан, например, в патентах США №№ 4355023, 4657853, 4676980, 4925921 и 4970156, и *Immuno Technology Catalogue and Handbook*, Pierce Chemical Co. (1989), каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Такую конъюгацию, включая перекрестную сшивку, следует осуществлять так, чтобы, по существу, не влиять на желаемую функцию пептидного олигомера или конъюгируемого с ним вещества, включая терапевтические средства, и веществ, способных связываться с интересующими веществами.

Специалисту в этой области будет понятно, что можно использовать альтернативные линкеры для соединения пептидов SPF, например, химические белковые кросслинкеры. Например, гомобифункциональный кросслинкер, такой как дисукцинимидил-суберимидат-дигидрохлорид; диметил-адипимидат-дигидрохлорид; 1,5-, 2,4-динитробензол, или гетеробифункциональные кросслинкеры, такие как N-гидроксисукцинимидил-2,3-дибромпропионат; 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорид; и сукцинимидил-4-[n-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилат.

Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим SPF, перекрестно-сшитые с НА. Перекрестной сшивки SPF с НА можно достигать различными способами, например, способами с использованием эпоксида, способами с использованием периодата и/или способами с использованием трезилхлорида. В некоторых вариантах осуществления SPF перекрестно сшиты с НА с использованием эпоксида, например, многофункционального эпоксида. Например, можно использовать бифункциональный эпоксид, такой как диглицидиловый простой эфир 1,4-бутандиола (BDDE). Другие многофункциональные эпоксиды включают, в качестве неограничивающих примеров, полиглицидиловый простой эфир полиглицерина (PGPGE), полиглицидиловый простой эфир пентаэритрита (PEPGE) и полиглицидиловый простой эфир диглицерина (DGPGE). Перекрестную сшивку нулевой длины между SPF и НА также осуществляют с использованием активирующего средства.

Способ перекрестной сшивки SPF с другими макромолекулами, например, НА, может включать одну или более стадий. На первой стадии эпоксид, такой как BDDE, добавляют к раствору SPF в избытке и позволяют реакции произойти. Эпоксиды могут

реагировать с различными группами на макромолекуле SPF, такой как карбоксил, амин, спирт, тиол и т.п., что приводит к получению соединений, таких как сложные эфиры, вторичные или третичные амины, простые эфиры, тиоэфиры и т.п. Если только один эпоксид прореагировал с SPF, остается свободный эпоксид, присоединенный к SPF и доступный для перекрестной сшивки с другим SPF или другой макромолекулой, например, НА, или т.п. Можно варьировать порядок добавления реагентов. Например, сначала можно добавлять BDDE к НА, а затем добавлять SPF для получения перекрестно-сшитых SPF-НА. В некоторых вариантах осуществления сначала можно смешивать SPF и НА, а затем в смесь добавляют BDDE. В некоторых вариантах осуществления добавление BDDE в смесь SPF и НА приводит к получению композиции, включающей SPF, перекрестно-сшитые с SPF, НА, перекрестно-сшитую с НА, и SPF, перекрестно-сшитые с НА.

В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитые SPF-НА можно получать с использованием трезилхлоридного способа, включающего одну или более стадий. На одной стадии перекрестно-сшитую НА и/или не-перекрестно-сшитую НА можно активировать трезилхлоридом, т.е. 2,2,2-трифтопентансульфонилхлоридом, или любым другим подходящим хлорангидридом. Трезилхлорид добавляют, например, по каплям к раствору основания/растворителя, например, раствору пиридина/ацетона, содержащему перекрестно-сшитую и/или не-перекрестно-сшитую НА. В некоторых вариантах осуществления трезилхлорид реагирует со всеми четырьмя гидроксильными группами на циклах сахаров перекрестно-сшитой и/или не-перекрестно-сшитой НА. На необязательной стадии получаемый НА-трезилат промывают. На стадии добавляют фрагменты SPF, которые будут реагировать с НА-трезилатом.

В некоторых вариантах осуществления трезилхлоридный способ можно использовать для присоединения SPF непосредственно к перекрестно-сшитой и/или не-перекрестно-сшитой НА. В других вариантах осуществления трезилхлоридный способ можно использовать для присоединения SPF к перекрестно-сшитой и/или не-перекрестно-сшитой НА с помощью спейсера, например, 6-амино-1-гексанола. В некоторых вариантах осуществления сначала спейсер можно сочетать с перекрестно-сшитой или не-перекрестно-сшитой НА посредством активации трезилом и сочетания. Для сочетания SPF со спейсером затем повторяют активацию трезилом и сочетание. Можно использовать любой подходящий спейсер, т.е. спейсеры, имеющие по меньшей мере некоторые характеристики, схожие с 6-амино-1-гексанола, т.е. первичный амин для сочетания с НА-трезилатом и реакционноспособную группу, например, гидроксильную группу, для активации и сочетания SPF.

В некоторых вариантах осуществления трезилхлорид не сшивает перекрестно НА. Однако, матрицу НА, используемую в трезилхлоридном способе, можно перекрестно сшивать для дополнительной стабильности. Перекрестную сшивку можно осуществлять, например, с использованием многофункционального эпоксида, такого как BDDE, как описано выше. Перекрестную сшивку можно осуществлять до или после сочетания

пептида.

Трезилхлоридный способ обладает преимуществами по сравнению с другими способами иммобилизации, включая эффективное сочетание в очень слабых условиях, отсутствие побочных реакций во время активации и сочетания, и пептиды RGD можно связывать непосредственно с атомами углерода основы НА.

В различных вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать гели и гидрогели на основе НА. В рамках изобретения термин "на основе НА" относится к композициям или материалам, включающим перекрестно-сшитую НА, и композициям, включающим перекрестно-сшитую НА с одним или более другими перекрестно-сшитыми полимерами. Кроме того, термин "НА" может относиться к гиалуроновой кислоте и любой из ее гиалуронатных солей, включая, в качестве неограничивающих примеров, гиалуронат натрия (NaHA), гиалуронат калия, гиалуронат магния, гиалуронат кальция и их комбинации. Использование нескольких биосовместимых полимеров конкретно не исключено из настоящего изобретения. Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, которые могут находиться в форме гелей и гидрогелей, могут включать несколько биосовместимых полимеров, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более биосовместимых полимеров в дополнение к НА и/или SPF. Подходящие биосовместимые полимеры включают полисахариды (например, НА, хитозан, хондроитинсульфат, альгинат, карбоксиметилцеллюлозу), полиэтиленгликоль, полимолочную кислоту, полигидроксиэтилметакрилат, полиметилметакрилат, иные белки, чем SPF (например, эластин и коллаген).

НА, представленная в настоящем описании, может являться межмолекулярно перекрестно-сшитой. В некоторых вариантах осуществления перекрестная сшивка стабилизирует физические свойства НА. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к образованию стабильной перекрестно-сшитой НА с использованием многофункциональных эпоксидов. В рамках изобретения термин "многофункциональный" эпоксид означает химический реагент, содержащий два или более эпоксида, таких как низшие алифатические эпоксиды или соответствующие им эпигалогидрины. Неограничивающие примеры многофункциональных эпоксидов включают диэпоксиды диглицидиловый простой эфир 1,4-бутандиола (BDDE), полиглицидиловый простой эфир полиглицерина (PGPGE), полиглицидиловый простой эфир пентаэритрита (PEPGE) и полиглицидиловый простой эфир диглицерина (DGPGE). В предпочтительном варианте осуществления диэпоксид BDDE используют в качестве перекрестно-сшивающего средства. Остатки сахара в НА перекрестно сшивают через два эпоксида BDDE. В других вариантах осуществления перекрестно-сшивающие средства включают алкилдиэпоксисоединения, такие как диэпоксид 1,3-бутадиена, 1,2,7,8-диэпоксиоктан, диэпоксид 1,5-гексадиена и т.п., диглицидиловые простые эфиры, такие как диглицидиловый простой эфир этиленгликоля, диглицидиловый простой эфир 1,4-бутандиола, диглицидиловый простой эфир бисфенола А и т.п., дивинилсульфон и

эпихлоргидрин. Из них, в частности, можно соответствующим образом использовать дивинилсульфон, диглицидиловый простой эфир 1,4-бутандиола и диглицидиловый простой эфир этиленгликоля. В настоящем изобретении можно использовать два или более типов перекрестно-сшивающих средств, комбинируя их соответствующим образом.

В некоторых вариантах осуществления НА перекрестно-сшита с НА. Способ перекрестной сшивки НА с НА может включать одну или более стадий. На первой стадии эпоксид, такой как BDDE, добавляют к раствору НА в избытке и позволяют реакции произойти. Эпоксиды могут реагировать с 1-4 гидроксильными группами на циклах сахаров НА с образованием 1-4 простых эфирных связей. Альтернативно, или в дополнение к реакции с гидроксильными группами, эпоксид может реагировать с карбоновой кислотой полисахарида с образованием сложноэфирной связи. Если эпоксиды BDDE прореагировали с функциональными группами а циклах сахаров одной или более макромолекул НА, НА становится перекрестно-сшитой.

В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее средство может являться перекрестно-сшивающим средством нулевой длины, таким как химическая связь, получаемая с использованием активирующего средства, такого как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) или BCDI. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшивающее активирующее средство нулевой длины реагирует с НА в присутствии N-гидроксисукцинимид (NHS), сульфо-NHS (или сульфонил-NHS) или 4-диметиламинопиридина (DMAP). В некоторых вариантах осуществления гели и гидрогели, представленные в настоящем описании, получают посредством реакции по меньшей мере одного перекрестно-сшиваемого биосовместимого полимера, такого как НА и/или белок, например, белок SPF, или любого другого дополнительного белка по меньшей мере с одним перекрестно-сшивающим активирующим средством.

В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитые SPF-SPF, перекрестно-сшитые SPF-НА и/или перекрестно-сшитая НА-НА могут иметь разное время удержания после введения, например, после инъекции в виде интрадермального, субдермального или, как правило, дермального филлера. В некоторых вариантах осуществления на время удержания можно влиять в способе с использованием периодата натрия в зависимости от количества реакционноспособных групп в SPF, доступных для присоединения к другой макромолекуле SPF или НА. Примером реакционноспособной группы в SPF, которую можно присоединять к НА, является первичный амин. SPF, содержащие две реакционноспособные группы, такие как два первичных амина, сами могут перекрестно сшивать НА в периодатном способе, таким образом, образуя более стабильный конъюгат. В других вариантах осуществления, в которых в SPF есть только одна реакционноспособная группа, такая как единственный первичный амин, например, на аминоконце, перекрестная сшивка SPF-НА снижена, что приводит к получению более биodeградируемой матрицы.

В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитая BDDE НА может

иметь разное время удержания после введения, например, после инъекции в виде интрадермального, субдермального или, как правило, дермального филлера. В некоторых вариантах осуществления перекрестно-сшитая BDDE HA может находиться где-либо в ткани кожи в течение от одного до по меньшей мере тридцати дней в зависимости от степени перекрестной сшивки. Переменное время удержания перекрестно-сшитой HA можно настраивать, встраивая гидролизуемые связи во время перекрестной сшивки эпоксидом. В некоторых вариантах осуществления материалы, перекрестно-сшитые эпоксидом при более низком pH, имеют большее количество образующихся сложноэфирных связей и, таким образом, быстрее гидролизуются.

В одном из вариантов осуществления перекрестно-сшивающее средство является перекрестно-сшивающим активирующим средством нулевой длины. Как правило, перекрестно-сшивающие активирующие средства нулевой длины позволяют сочетать полимеры без добавления каких-либо дополнительных атомов спейсерной группы, и, таким образом, перекрестно-сшивающие активирующие средства нулевой длины не включают в матрицу перекрестно-сшитого полимера. Подходящие сшивающие средства нулевой длины включают карбодиимиды, такие как, например, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) и BCDI. Нерастворимые в воде карбодиимиды включают дициклогексилкарбодиимид (DCC) и диизопропилкарбодиимид (DIC), которые также можно использовать.

Карбодиимид-опосредованное сочетание между карбоксилатами и спиртовыми или амино-функциональными группами легко происходит при температуре окружающей среды, нейтральном pH и в водных условиях. Нейтральный pH, например, может составлять от приблизительно 6,0 и приблизительно 8,0, например, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5, например, приблизительно 7,0. Как правило, в воде 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDC) можно использовать для опосредования этерификации между карбоксилатами и спиртами или амидирования между карбоксилатами и аминами. Таким образом, перекрестно-сшитую HA получают, используя реакционноспособные группы, присутствующие на HA (например, карбоксилат и спирт). Кроме того, используя преимущество высокой реакционной способности аминогрупп на белках, например, белках SPF, достигают амидирования между боковыми цепями лизина в белках и карбоксилатными группами HA с получением HA-белковых перекрестно-сшитых гидрогелей. Перекрестно-сшивающие средства и непрореагировавшие полимеры можно удалять с помощью диализа.

В некоторых вариантах осуществления EDC используют в комбинации с N-гидроксисукцинимидом (NHS) или сульфонил-NHS (сульфо-NHS), в совокупности обозначаемыми в настоящем описании как "NHS". NHS стабилизирует реакционноспособные промежуточные соединения, образованные EDC; таким образом, добавление NHS может повышать эффективность EDC в отношении реакции сочетания. Альтернативно, для катализа реакции сочетания можно использовать 4-диметиламинопиридин (DMAP).

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры на основе НА по изобретению включают композиции на основе перекрестно-сшитой НА и композиции на основе по меньшей мере частично перекрестно-сшитой НА. В рамках изобретения термин "не-перекрестно-сшитая НА" относится к истинно не-перекрестно-сшитым (например, "свободным") цепям НА, а также слегка перекрестно-сшитым цепям и их фрагментам, как правило, находящимся в растворимой жидкой форме.

В некоторых вариантах осуществления композиции гидрогеля по изобретению включают по меньшей мере некоторую перекрестную сшивку между НА и SPF.

Неограничивающие примеры вариантов осуществления

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, гиалуроновую кислоту (НА), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. НА является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-НА и НА-НА; перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, гиалуроновую кислоту (НА), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. НА является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-НА и НА-НА; перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, гиалуроновую кислоту (НА), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. НА является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-НА и НА-НА; перекрестная сшивка происходит в результате использования

кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему низкомолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему среднемолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA;

перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему низкомолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, среднемолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%; где массовое соотношение между низкомолекулярными SPF и среднемолекулярными SPF составляет приблизительно 3:1.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему высокомолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка происходит в результате использования кросслинкера на основе эпоксида, например, BDDE, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до



100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0 и среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа, гиалуроновую кислоту (HA), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. HA является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-HA и HA-HA; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему низкомолекулярные фрагменты белка шелка (SPF),

имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (НА), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. НА является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-НА и НА-НА; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему среднемолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (НА), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. НА является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-НА и НА-НА; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему низкомолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, среднемолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (НА), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. НА является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-НА и НА-НА; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью перекрестной сшивки до 15%; где массовое соотношение между низкомолекулярными SPF и среднемолекулярными SPF составляет приблизительно 3:1.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к биосовместимому дермальному филлеру, включающему высокомолекулярные фрагменты белка шелка (SPF), имеющие полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0, гиалуроновую кислоту (НА), воду и от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,5% лидокаина, например, приблизительно 0,3% лидокаина; где часть до 100% масс./масс. SPF является перекрестно-сшитой, и часть до 100% масс./масс. НА является перекрестно-сшитой, перекрестная сшивка представляет собой одно или более из SPF-SPF, SPF-НА и НА-НА; перекрестная сшивка, включая перекрестную сшивку нулевой длины, происходит в результате использования активирующего средства, например, BCDI, и со степенью

перекрестной сшивки до 15%.

#### Дополнительные средства

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, включают активное средство, такое как лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления активное средство может являться одним или более из ингибиторов ферментов, анестезирующих средств, лекарственных нейротоксинов, антиоксидантов, противомикробных средств, противовоспалительных средств, вазодилататоров, блокаторов ультрафиолета (УФ), красителей (например, красителя, чернил или пигмента для татуировки), отражающего средства, гормонов, иммуносупрессоров и их комбинаций. Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать активное средство, выбранное из группы, состоящей из ингибиторов ферментов, анестезирующих средств, лекарственных нейротоксинов (например, ботулинического токсина и клостридиального токсина), антиоксидантов, противомикробных средств (например, антибиотиков), вазодилататоров, красителей (например, чернил или пигмента для татуировки), отражающих средств, противовоспалительных средств, блокаторов ультрафиолета (УФ), красителей, гормонов, иммуносупрессоров и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессор является рапамицином или рапамицин-подобным соединением.

В некоторых вариантах осуществления активное средство может являться антибиотиком, выбранным из группы, состоящей из пенициллина (например, пенициллина V, амоксициллина), эритромицина (например, стеарата эритромицина), линкозамида (например, клиндамицина), цефалоспорины (например, цефалексина) и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления активное средство может являться вазодилататором, выбранным из группы, состоящей из нитроглицерина, лабеталолола, тиазида, изосорбид-динитрата, тетранитрата пентаэритрита, дигиталиса, гидралазина, диазоксида, амринона, L-аргинина, сульфата баметана, фумарата бенциклана, гемисукцината бенфуродила, бензилникотината, гидрохлорида буфломедила, гидрохлорида буфенина, гидрохлорида буталамина, цитрата цетидила, циклониката, малеат цинепазиды, цикланделата, дихлорацетата диизопропиламмония, этилникотината, гепрониката, гексилникотината, тартрата ифенпродила, никотината инозитола, гидрохлорида изоксуприна, каллидиногеназы, метилникотината, оксалата нафтидрофурила, цитрата никаметата, ницеритрола, никобоксила, никофуранозы, никотинилового спирта, тартрата никотинилового спирта, оксида азота, нонивамида, окспентифиллина, папаверина, папаверолина, пентифиллина, пероксинитрита, пинацидила, пипратекола, пропентофиллина, раубазина, сулоктидила, теасуприна, гидрохлорид тимоксамина, никотината токоферола, толазолина, никотината ксантинола, диазоксида, гидралазина, миноксидила и нитропруссиды натрия и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в

настоящем описании, могут включать активное средство в концентрации по массе по меньшей мере 0,01%, или по меньшей мере 0,02%, или по меньшей мере 0,03%, или по меньшей мере 0,04%, или по меньшей мере 0,05%, или по меньшей мере 0,06%, или по меньшей мере 0,07%, или по меньшей мере 0,08%, или по меньшей мере 0,09%, или по меньшей мере 0,1%, или по меньшей мере 0,2%, или по меньшей мере 0,3%, или по меньшей мере 0,4%, или по меньшей мере 0,5%, или по меньшей мере 0,6%, или по меньшей мере 0,7%, или по меньшей мере 0,8%, или по меньшей мере 0,9%, или по меньшей мере 1,0%, или по меньшей мере 1,5%, или по меньшей мере 2,0%, или по меньшей мере 2,5%, или по меньшей мере 3,0%, или по меньшей мере 3,5%, или по меньшей мере 4,0%, или по меньшей мере 4,5%, или по меньшей мере 5,0%, или по меньшей мере 5,5%, или по меньшей мере 6,0%, или по меньшей мере 6,5%, или по меньшей мере 7,0%, или по меньшей мере 7,5%, или по меньшей мере 8,0%, или по меньшей мере 8,5%, или по меньшей мере 9,0%, или по меньшей мере 9,5%, или по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 15%, или по меньшей мере 20%, или по меньшей мере 25%, или по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 35%, или по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 45%, или по меньшей мере 50%.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать активное средство в концентрации по массе не более 0,01%, или не более 0,02%, или не более 0,03%, или не более 0,04%, или не более 0,05%, или не более 0,06%, или не более 0,07%, или не более 0,08%, или не более 0,09%, или не более 0,1%, или не более 0,2%, или не более 0,3%, или не более 0,4%, или не более 0,5%, или не более 0,6%, или не более 0,7%, или не более 0,8%, или не более 0,9%, или не более 1,0%, или не более 1,5%, или не более 2,0%, или не более 2,5%, или не более 3,0%, или не более 3,5%, или не более 4,0%, или не более 4,5%, или не более 5,0%, или не более 5,5%, или не более 6,0%, или не более 6,5%, или не более 7,0%, или не более 7,5%, или не более 8,0%, или не более 8,5%, или не более 9,0%, или не более 9,5%, или не более 10%, или не более 15%, или не более 20%, или не более 25%, или не более 30%, или не более 35%, или не более 40%, или не более 45%, или не более 50%.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать активное средство в концентрации по массе от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1%, или от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,15%, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,2%, или от приблизительно 0,15% до приблизительно 0,25%, или от приблизительно 0,2% до приблизительно 0,3%, или от приблизительно 0,25% до приблизительно 0,35%, или от приблизительно 0,3% до приблизительно 0,4%, или от приблизительно 0,35% до приблизительно 0,45%, или от приблизительно 0,4% до приблизительно 0,5%, или от приблизительно 0,45% до приблизительно 0,55%, или от приблизительно 0,5% до приблизительно 0,6%, или от приблизительно 0,55% до приблизительно 0,65%, или от приблизительно 0,6% до приблизительно 0,7%, или от приблизительно 0,65% до приблизительно 0,75%, или от приблизительно 0,7% до приблизительно 0,8%, или от



приблизительно 31%, или приблизительно 32%, или приблизительно 33%, или приблизительно 34%, или приблизительно 35%, или приблизительно 36%, или приблизительно 37%, или приблизительно 38%, или приблизительно 39%, или приблизительно 40%, или приблизительно 41%, или приблизительно 42%, или приблизительно 43%, или приблизительно 44%, или приблизительно 45%, или приблизительно 46%, или приблизительно 47%, или приблизительно 48%, или приблизительно 49%, или приблизительно 50%.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, включают ингибирующее фиброз средство. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут дополнительно включать соединение, имеющее ингибиторный эффект в отношении патологических процессов в очаге лечения или вокруг него. В некоторых аспектах активное средство можно выбирать из одного из следующих классов соединений: противовоспалительных средств (например, дексаметазона, кортизона, флудрокортизона, преднизона, преднизолона, б $\alpha$ -метилпреднизолона, триамцинолона, бетаметазона и аспирина).

В некоторых вариантах осуществления с активным средством можно использовать, в качестве неограничивающих примеров, антиоксиданты и ферменты. В варианте осуществления активное средство может включать, в качестве неограничивающих примеров, селен, производные убихинона, антиоксиданты на основе тиола, сахарид-содержащие антиоксиданты, полифенолы, растительные экстракты, кофейную кислоту, апигенин, пикногенол, ресвератрол, фолиевую кислоту, витамин В12, витамин В6, витамин В3, витамин Е, витамин С и их производные, витамин D, витамин А, астаксантин, лютеин, ликопин, незаменимые жирные кислоты (омега-3 и -6), железо, цинк, магний, флавоноиды (флавоноиды сои, куркумин, силимарин, пикногенол), факторы роста, экстракт алоэ, гиалуроновую кислоту, белки внеклеточного матрикса, клетки, нуклеиновые кислоты, биомаркеры, биологические реагенты, оксид цинка, бензоила пероксид, ретиноиды, титан, аллергены в известной дозе (для сенсibilизационного лечения), эфирные масла, включая, в качестве неограничивающих примеров, лимонграссовое или розмариновое масло, и ароматизаторы. Если рассматривать активные средства в более широком смысле, активные средства могут включать терапевтические средства, такие как низкомолекулярные соединения, лекарственные средства, белки, пептиды и нуклеиновые кислоты.

В определенных вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать одно или более анестезирующих средств в количестве, эффективном для улучшения или уменьшения боли или дискомфорта в месте инъекции тканевого филлера. Местное анестезирующее средство можно выбирать из группы амбукаина, амоланона, амилокаина, беноксината, бензокаина, бетоксикаина, бифенамина, бупивакаина, бутакаина, бутамбена, бутаниликаина, бутетамина, бутоксикаина, картикаина, хлорпрокаина, кокаэтилена, кокаина, циклометикаина,

дибукаина, диметизохина, диметокаина, диперодона, дицикломина, эгонидина, эгонина, этилхлорида, этидокаина, бета-эукаина, эупроцина, феналкомина, формокаина, гексилкаина, гидрокситетракаина, изобутил-р-аминобензоата, лейцинокаина мезилата, левоксадрол, лидокаина, мепивакаина, меприлкаина, метабутоксикаина, метилхлорида, миртекаина, наепаина, октакаина, ортокаина, оксетазаин, паретоксикаина, фенакаина, фенола, пиперокаина, пиридокаина, полидоканола, прамоксина, прилокаина, прокаина, пропанокаина, пропаракаина, пропипокаина, пропоксикаина, псевдококаина, пиррокаина, ропивакаина, салицилового спирта, тетракаина, толикаина, тримекаина, золамина и их солей.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать лидокаин или другое указанное выше анестезирующее средство в концентрации по массе по меньшей мере 0,01%, или по меньшей мере 0,02%, или по меньшей мере 0,03%, или по меньшей мере 0,04%, или по меньшей мере 0,05%, или по меньшей мере 0,06%, или по меньшей мере 0,07%, или по меньшей мере 0,08%, или по меньшей мере 0,09%, или по меньшей мере 0,1%, или по меньшей мере 0,2%, или по меньшей мере 0,3%, или по меньшей мере 0,4%, или по меньшей мере 0,5%, или по меньшей мере 0,6%, или по меньшей мере 0,7%, или по меньшей мере 0,8%, или по меньшей мере 0,9%, или по меньшей мере 1,0%, или по меньшей мере 1,5%, или по меньшей мере 2,0%, или по меньшей мере 2,5%, или по меньшей мере 3,0%, или по меньшей мере 3,5%, или по меньшей мере 4,0%, или по меньшей мере 4,5%, или по меньшей мере 5,0%, или по меньшей мере 5,5%, или по меньшей мере 6,0%, или по меньшей мере 6,5%, или по меньшей мере 7,0%, или по меньшей мере 7,5%, или по меньшей мере 8,0%, или по меньшей мере 8,5%, или по меньшей мере 9,0%, или по меньшей мере 9,5%, или по меньшей мере 10%.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать лидокаин или другое указанное выше анестезирующее средство в концентрации по массе не более 0,01%, или не более 0,02%, или не более 0,03%, или не более 0,04%, или не более 0,05%, или не более 0,06%, или не более 0,07%, или не более 0,08%, или не более 0,09%, или не более 0,1%, или не более 0,2%, или не более 0,3%, или не более 0,4%, или не более 0,5%, или не более 0,6%, или не более 0,7%, или не более 0,8%, или не более 0,9%, или не более 1,0%, или не более 1,5%, или не более 2,0%, или не более 2,5%, или не более 3,0%, или не более 3,5%, или не более 4,0%, или не более 4,5%, или не более 5,0%, или не более 5,5%, или не более 6,0%, или не более 6,5%, или не более 7,0%, или не более 7,5%, или не более 8,0%, или не более 8,5%, или не более 9,0%, или не более 9,5%, или не более 10%.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать лидокаин или другое указанное выше анестезирующее средство в концентрации по массе приблизительно 0,01%, или приблизительно 0,02%, или приблизительно 0,03%, или приблизительно 0,04%, или приблизительно 0,05%, или приблизительно 0,06%, или приблизительно 0,07%, или

приблизительно 0,08%, или приблизительно 0,09%, или приблизительно 0,1%, или приблизительно 0,2%, или приблизительно 0,3%, или приблизительно 0,4%, или приблизительно 0,5%, или приблизительно 0,6%, или приблизительно 0,7%, или приблизительно 0,8%, или приблизительно 0,9%, или приблизительно 1,0%, или приблизительно 1,5%, или приблизительно 2,0%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 3,0%, или приблизительно 3,5%, или приблизительно 4,0%, или приблизительно 4,5%, или приблизительно 5,0%, или приблизительно 5,5%, или приблизительно 6,0%, или приблизительно 6,5%, или приблизительно 7,0%, или приблизительно 7,5%, или приблизительно 8,0%, или приблизительно 8,5%, или приблизительно 9,0%, или приблизительно 9,5%, или приблизительно 10%.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать лидокаин или другое указанное выше анестезирующее средство в концентрации по массе от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,02%, или от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,04%, или от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,06%, или от приблизительно 0,06% до приблизительно 0,07%, или от приблизительно 0,08% до приблизительно 0,09%, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,2%, или от приблизительно 0,3% до приблизительно 0,4%, или от приблизительно 0,5% до приблизительно 0,6%, или от приблизительно 0,7% до приблизительно 0,8%, или от приблизительно 0,9% до приблизительно 1,0%, или от приблизительно 1% до приблизительно 1,5%, или от приблизительно 1,5% до приблизительно 2,0%, или от приблизительно 2,0% до приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,5% до приблизительно 3,0%, или от приблизительно 3,0% до приблизительно 3,5%, или от приблизительно 3,5% до приблизительно 4,0%, или от приблизительно 4,0% до приблизительно 4,5%, или от приблизительно 4,5% до приблизительно 5,0%, или от приблизительно 5,0% до приблизительно 5,5%, или от приблизительно 5,5% до приблизительно 6,0%, или от приблизительно 6,0% до приблизительно 6,5%, или от приблизительно 6,5% до приблизительно 7,0%, или от приблизительно 7,5% до приблизительно 8,0%, или от приблизительно 8,0% до приблизительно 8,5%, или от приблизительно 8,5% до приблизительно 9,0%, или от приблизительно 9,5% до приблизительно 10%.

В одном из вариантов осуществления анестезирующее средство является лидокаином, например, в форме лидокаина HCl. Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут содержать лидокаин или другое анестезирующее средство в концентрации от приблизительно 0,1% до приблизительно 5% по массе композиции, например, от приблизительно 0,2% до приблизительно 1,0% по массе тканевого филлера. В одном из вариантов осуществления тканевой филлер имеет концентрацию лидокаина приблизительно 0,3% по массе (% масс./масс.) тканевого филлера. Концентрация лидокаина в тканевых филлерах, представленных в настоящем описании, может являться терапевтически эффективным, что означает, что концентрация является достаточной для получения терапевтической пользы, такой как, например, улучшение или уменьшение



боли или дискомфорта в месте инъекции тканевого филлера.

### Оптические свойства

Когда свет попадает на материал, он может взаимодействовать с ним несколькими способами. Эти взаимодействия зависят от природы света, т.е. его длины волны, частоты, энергии и т.д., и природы материала. Свет взаимодействует с объектом посредством некоторой комбинации отражения и пропускания с преломлением. Оптически прозрачный материал позволяет большей части падающего света проходить через него, при этом отражается немного света. Материалы, не пропускающие свет, называют оптически непрозрачными или просто непрозрачными.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевому филлеру, представленному в настоящем описании, имеющему прозрачность и/или просвечиваемость. Прозрачность (также называемая светопроницаемостью) является физическим свойством, состоящим в допущении прохождения света через материал, в то время как просвечиваемость (также называемая полупрозрачностью) позволяет свету проходить через материал диффузно. Противоположным свойством является непрозрачность. Через прозрачные материалы можно видеть четко, в то время как через полупрозрачные нельзя видеть четко. Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут проявлять или не проявлять оптические свойства, такие как прозрачность и/или просвечиваемость. В некоторых вариантах осуществления, включающих способы заполнения поверхностных мелких морщин, преимуществом может являться использование непрозрачного гидрогеля. Факторы, используемые для контроля оптических свойств тканевых филлеров, включают, в качестве неограничивающих примеров, концентрацию SPF, степень кристалличности и/или гомогенность гидрогеля.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, являются непрозрачными.

В варианте осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, является оптически прозрачным. В аспектах этого варианта осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, пропускает, например, приблизительно 75% света, приблизительно 80% света, приблизительно 85% света, приблизительно 90% света, приблизительно 95% света, или приблизительно 100% света. В других аспектах этого варианта изобретения тканевой филлер, представленный в настоящем описании пропускает, например, по меньшей мере 75% света, по меньшей мере 80% света, по меньшей мере 85% света, по меньшей мере 90% света, или по меньшей мере 95% света. В других аспектах этого варианта осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, пропускает, например, от приблизительно 75% до приблизительно 100% света, от приблизительно 80% до приблизительно 100% света, от приблизительно 85% до приблизительно 100% света, от приблизительно 90% до приблизительно 100% света или от приблизительно 95% до приблизительно 100% света.

В другом варианте осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, является оптически непрозрачным. В аспектах этого варианта осуществления



приблизительно 40%, от приблизительно 10% до приблизительно 45%, от приблизительно 10% до приблизительно 50%, от приблизительно 10% до приблизительно 55%, от приблизительно 10% до приблизительно 60%, от приблизительно 10% до приблизительно 65%, от приблизительно 10% до приблизительно 70%, от приблизительно 10% до приблизительно 75%, от приблизительно 25% до приблизительно 35%, от приблизительно 25% до приблизительно 40%, от приблизительно 25% до приблизительно 45%, от приблизительно 25% до приблизительно 50%, от приблизительно 25% до приблизительно 55%, от приблизительно 25% до приблизительно 60%, от приблизительно 25% до приблизительно 65%, от приблизительно 25% до приблизительно 70% или от приблизительно 25% до приблизительно 75% света.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, является оптически полупрозрачным. В аспектах этих вариантов осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, диффузно пропускает, например, приблизительно 75% света, приблизительно 80% света, приблизительно 85% света, приблизительно 90% света, приблизительно 95% света, или приблизительно 100% света. В других аспектах этих вариантов изобретения тканевой филлер диффузно пропускает, например, по меньшей мере 0,1% света, по меньшей мере 1% света, по меньшей мере 5% света, по меньшей мере 10% света, по меньшей мере 15% света, по меньшей мере 20% света, по меньшей мере 25% света, по меньшей мере 30% света, по меньшей мере 35% света, по меньшей мере 40% света, по меньшей мере 45% света, по меньшей мере 50% света, по меньшей мере 55% света, по меньшей мере 60% света, по меньшей мере 65% света, по меньшей мере 70% света, 75% света, по меньшей мере 80% света, по меньшей мере 85% света, по меньшей мере 90% света, или по меньшей мере 95% света. В других аспектах этих вариантов изобретения тканевой филлер диффузно пропускает, например, не более 0,1% света, не более 1% света, не более 5% света, не более 10% света, не более 15% света, не более 20% света, не более 25% света, не более 30% света, не более 35% света, не более 40% света, не более 45% света, не более 50% света, не более 55% света, не более 60% света, не более 65% света, не более 70% света, 75% света, не более 80% света, не более 85% света, не более 90% света, не более 95% света или не более 100% света. В других аспектах этих вариантов осуществления тканевой филлер диффузно пропускает, например, от приблизительно 0,1% до приблизительно 100% света, от приблизительно 1% до приблизительно 100% света, от приблизительно 5% до приблизительно 100% света, от приблизительно 10% до приблизительно 100% света, от приблизительно 15% до приблизительно 100% света, от приблизительно 20% до приблизительно 100% света, от приблизительно 25% до приблизительно 100% света, от приблизительно 30% до приблизительно 100% света, от приблизительно 35% до приблизительно 100% света, от приблизительно 45% до приблизительно 100% света, от приблизительно 50% до приблизительно 100% света, от приблизительно 55% до приблизительно 100% света, от приблизительно 60% до приблизительно 100% света, от приблизительно 65% до приблизительно 100% света, от

приблизительно 70% до приблизительно 100% света, от приблизительно 75% до приблизительно 100% света, от приблизительно 80% до приблизительно 100% света, от приблизительно 85% до приблизительно 100% света, от приблизительно 90% до приблизительно 100% света или от приблизительно 95% до приблизительно 100% света.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно описывать с помощью его коэффициента ослабления, определяемого как описание способности материала рассеивать или поглощать свет.

Тканевой филлер и свойства кожи могут влиять на появление побочного эффекта Тиндаля в коже после введения некоторых тканевых филлеров, известных в этой области. Филлеры с высокой жесткостью и эластичностью можно использовать для коррекции областей на лице, таких как носогубные складки, щеки и подбородок без опасений в отношении изменения цвета лица, т.к. материалы инъецируют в средние и глубокие области дермы. Однако, если филлеры используют для более поверхностного нанесения, например, для коррекции мелких морщин, или ошибочно вводят слишком поверхностно в верхние области дермы, зачастую наблюдают синеватое окрашивание кожи. Это явление, как считают, являющееся результатом эффекта Тиндаля, оставляет почти постоянное изменение цвета в участках введения. В некоторых вариантах осуществления эффект исчезает после введения ферментов, например, гиалуронидазы, для деградации материала филлера. Таким образом, эффект Тиндаля более распространен у пациентов, у которых лечению подвергали поверхностные мелкие морщины. Длительное проявление эффекта Тиндаля, как правило, при условии, что филлер остается в коже, является нежелательным побочным эффектом и вызывает опасения у пациентов.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, позволяют уменьшать эффект Тиндаля благодаря их гомогенности и являющейся ее результатом непрозрачности.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, не приводят к эффекту Тиндаля или не приводят к какому-либо визуально заметному синему окрашиванию, являющемуся результатом эффекта Тиндаля. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевым филлерам и способам эстетического улучшения внешности, включающим введение в область дермы пациента, по существу, оптически прозрачной композиции дермального филлера, не проявляющей эффект Тиндаля или проявляющей незначительный эффект Тиндаля. Возникновение синего окрашивания на коже в месте инъекции тканевого филлера (эффект Тиндаля) является значительным нежелательным явлением, возникающим у некоторых пациентов, которым вводят дермальный филлер. Эффект Тиндаля более распространен у пациентов, у которых лечению подвергали поверхностные мелкие морщины. Разработаны варианты осуществления настоящего изобретения, относящиеся к долговременным, полупрозрачным филлерам, которые можно инъецировать поверхностно для лечения мелких и неглубоких морщин даже в областях относительно тонкой кожи без какого-либо синего окрашивания в результате эффекта Тиндаля. Мелкими или поверхностными

морщинами, как правило, считают морщины или складки кожи, как правило, обнаруживаемые в областях лица (морщины на лбу, у внешнего угла глаза, у красной каймы губ/около рта), где кожа является наиболее тонкой, т.к. где кожа имеет толщину дермы менее 1 мм. На лбу средняя толщина дермы составляет приблизительно 0,95 мм для нормальной кожи и приблизительно 0,81 мм для морщинистой кожи. Дерма вокруг внешнего угла глаза является даже более тонкой (например, приблизительно 0,61 мм для нормальной кожи и приблизительно 0,41 мм для морщинистой кожи). Средний внешний диаметр иглы калибра 30 или 32 (игл, как правило, используемых для введения геля в мелкие морщины) составляет приблизительно 0,30 и приблизительно 0,24 мм.

В варианте осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, является оптически непрозрачным. В аспектах этого варианта осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, пропускает, например, приблизительно 5% света, приблизительно 10% света, приблизительно 15% света, приблизительно 20% света, приблизительно 25% света, приблизительно 30% света, приблизительно 35% света, приблизительно 40% света, приблизительно 45% света, приблизительно 50% света, приблизительно 55% света, приблизительно 60% света, приблизительно 65% света или приблизительно 70% света. В других аспектах этого варианта изобретения тканевой филлер, представленный в настоящем описании, пропускает, например, не более 5% света, не более 10% света, не более 15% света, не более 20% света, не более 25% света, не более 30% света, не более 35% света, не более 40% света, не более 45% света, не более 50% света, не более 55% света, не более 60% света, не более 65% света, не более 70% света или не более 75% света. В других аспектах этого варианта изобретения тканевой филлер, представленный в настоящем описании, пропускает, например, от приблизительно 5% до приблизительно 15%, от приблизительно 5% до приблизительно 20%, от приблизительно 5% до приблизительно 25%, от приблизительно 5% до приблизительно 30%, от приблизительно 5% до приблизительно 35%, от приблизительно 5% до приблизительно 40%, от приблизительно 5% до приблизительно 45%, от приблизительно 5% до приблизительно 50%, от приблизительно 5% до приблизительно 55%, от приблизительно 5% до приблизительно 60%, от приблизительно 5% до приблизительно 65%, от приблизительно 5% до приблизительно 70%, от приблизительно 5% до приблизительно 75%, от приблизительно 15% до приблизительно 20%, от приблизительно 15% до приблизительно 25%, от приблизительно 15% до приблизительно 30%, от приблизительно 15% до приблизительно 35%, от приблизительно 15% до приблизительно 40%, от приблизительно 15% до приблизительно 45%, от приблизительно 15% до приблизительно 50%, от приблизительно 15% до приблизительно 55%, от приблизительно 15% до приблизительно 60%, от приблизительно 15% до приблизительно 65%, от приблизительно 15% до приблизительно 70%, от приблизительно 15% до приблизительно 75%, от приблизительно 25% до приблизительно 35%, от приблизительно 25% до приблизительно 40%, от приблизительно 25% до приблизительно 45%, от приблизительно 25% до приблизительно 50%, от приблизительно

25% до приблизительно 55%, от приблизительно 25% до приблизительно 60%, от приблизительно 25% до приблизительно 65%, от приблизительно 25% до приблизительно 70% или от приблизительно 25% до приблизительно 75% света.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, демонстрирует снижение эффекта Тиндаля, например, на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 100%. В других аспектах этих вариантов изобретения тканевой филлер, представленный в настоящем описании, демонстрирует снижение эффекта Тиндаля, например, на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100%. В других аспектах этих вариантов изобретения тканевой филлер, представленный в настоящем описании, демонстрирует снижение эффекта Тиндаля на, например, от приблизительно 20% до приблизительно 100%, от приблизительно 50% до приблизительно 100%, от приблизительно 70% до приблизительно 100%, от приблизительно 15% до приблизительно 35%, от приблизительно 20% до приблизительно 40%, от приблизительно 25% до приблизительно 45%, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, от приблизительно 35% до приблизительно 55%, от приблизительно 40% до приблизительно 60%, от приблизительно 45% до приблизительно 65%, от приблизительно 50% до приблизительно 70%, от приблизительно 55% до приблизительно 75%, от приблизительно 60% до приблизительно 80%, от приблизительно 65% до приблизительно 85%, от приблизительно 70% до приблизительно 90%, от приблизительно 75% до приблизительно 95% или от приблизительно 80% до приблизительно 100%.

#### Содержание воды

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут включать воду. Например, некоторые тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут являться гелями, такими как гидрогели, и могут включать воду, абсорбированную, заключенную или иным образом содержащуюся в них.

В варианте осуществления процент содержания воды по массе в тканевых филлерах по настоящему изобретению составляет от 1% до 95%. В варианте осуществления процент содержания воды по массе в тканевых филлерах, представленных в настоящем описании, составляет по меньшей мере 1%, или по меньшей мере 2%, или по



более 36%, или не более 37%, или не более 38%, или не более 39%, или не более 40%, или не более 41%, или не более 42%, или не более 43%, или не более 44%, или не более 45%, или не более 46%, или не более 47%, или не более 48%, или не более 49%, или не более 50%, или не более 51%, или не более 52%, или не более 53%, или не более 54%, или не более 55%, или не более 56%, или не более 57%, или не более 58%, или не более 59%, или не более 60%, или не более 61%, или не более 62%, или не более 63%, или не более 64%, или не более 65%, или не более 66%, или не более 67%, или не более 68%, или не более 69%, или не более 70%, или не более 71%, или не более 72%, или не более 73%, или не более 74%, или не более 75%, или не более 76%, или не более 77%, или не более 78%, или не более 79%, или не более 80%, или не более 81%, или не более 82%, или не более 83%, или не более 84%, или не более 85%, или не более 86%, или не более 87%, или не более 88%, или не более 89%, или не более 90%, или не более 91%, или не более 92%, или не более 93%, или не более 94%, или не более 95%.

В варианте осуществления процент содержания воды по массе в тканевых филлерах, представленных в настоящем описании, составляет от 1% до 2%, или от 2% до 3%, или от 3% до 4%, или от 4% до 5%, или от 5% до 6%, или от 6% до 7%, или от 7% до 8%, или от 8% до 9%, или от 9% до 10%, или от 10% до 11%, или от 11% до 12%, или от 12% до 13%, или от 13% до 14%, или от 14% до 15%, или от 15% до 16%, или от 16% или 17%, или от 17% до 18%, или от 18% до 19%, или от 19% до 20%, или от 20% до 21%, или от 21% до 22%, или от 22% до 23%, или от 23% до 24%, или от 24% до 25%, или от 25% до 26%, или от 26% до 27%, или от 27% до 28%, или от 28% до 29%, или от 30% до 31%, или от 31% до 32%, или от 32% до 33%, или от 33% до 34%, или от 34% до 35%, или от 35% до 36%, или от 36% до 37%, или от 37% до 38%, или от 38% до 39%, или от 39% до 40%, или от 40% до 41%, или от 41% до 42%, или от 42% до 43%, или от 43% до 44%, или от 44% до 45%, или от 45% до 46%, или от 46% до 47%, или от 47% до 48%, или от 48% до 49%, или от 49% до 50%, или от 50% до 51%, или от 51% до 52%, или от 52% до 53%, или от 53% до 54%, или от 54% до 55%, или от 55% до 56%, или от 56% до 57%, или от 57% до 58%, или от 58% до 59%, или от 59% до 60%, или от 60% до 61%, или от 61% до 62%, или от 62% до 63%, или от 63% до 64%, или от 64% до 65%, или от 65% до 66%, или от 66% до 67%, или от 67% до 68%, или от 68% до 69%, или от 69% до 70%, или от 70% до 71%, или от 71% до 72%, или от 72% до 73%, или от 73% до 74%, или от 74% до 75%, или от 75% до 76%, или от 76% до 77%, или от 77% до 78%, или от 78% до 79%, или от 79% до 80%, или от 80% до 81%, или от 81% до 82%, или от 82% до 83%, или от 83% до 84%, или от 84% до 85%, или от 85% до 86%, или от 86% до 87%, или от 87% до 88%, или от 88% до 89%, или от 89% до 90%, или от 90% до 91%, или от 91% до 92%, или от 92% до 93%, или от 93% до 94%, или от 94% до 95%, или от 95% до 96%, или от 96% до 97%, или от 97% до 98%.

В варианте осуществления процент содержания воды по массе в тканевых филлерах, представленных в настоящем описании, составляет приблизительно 1%, или приблизительно 2%, или приблизительно 3%, или приблизительно 4%, или



приблизительно 5%, или приблизительно 6%, или приблизительно 7%, или  
 приблизительно 8%, или приблизительно 9%, или приблизительно 10%, или  
 приблизительно 11%, или приблизительно 12%, или приблизительно 13%, или  
 приблизительно 14%, или приблизительно 15%, или приблизительно 16%, или  
 приблизительно 17%, или приблизительно 18%, или приблизительно 19%, или  
 приблизительно 20%, или приблизительно 21%, или приблизительно 22%, или  
 приблизительно 23%, или приблизительно 24%, или приблизительно 25%, или  
 приблизительно 26%, или приблизительно 27%, или приблизительно 28%, или  
 приблизительно 29%, или приблизительно 30%, или приблизительно 31%, или  
 приблизительно 32%, или приблизительно 33%, или приблизительно 34%, или  
 приблизительно 35%, или приблизительно 36%, или приблизительно 37%, или  
 приблизительно 38%, или приблизительно 39%, или приблизительно 40%, или  
 приблизительно 41%, или приблизительно 42%, или приблизительно 43%, или  
 приблизительно 44%, или приблизительно 45%, или приблизительно 46%, или  
 приблизительно 47%, или приблизительно 48%, или приблизительно 49%, или  
 приблизительно 50%, или приблизительно 51%, или приблизительно 52%, или  
 приблизительно 53%, или приблизительно 54%, или приблизительно 55%, или  
 приблизительно 56%, или приблизительно 57%, или приблизительно 58%, или  
 приблизительно 59%, или приблизительно 60%, или приблизительно 61%, или  
 приблизительно 62%, или приблизительно 63%, или приблизительно 64%, или  
 приблизительно 65%, или приблизительно 66%, или приблизительно 67%, или  
 приблизительно 68%, или приблизительно 69%, или приблизительно 70%, или  
 приблизительно 71%, или приблизительно 72%, или приблизительно 73%, или  
 приблизительно 74%, или приблизительно 75%, или приблизительно 76%, или  
 приблизительно 77%, или приблизительно 78%, или приблизительно 79%, или  
 приблизительно 80%, или приблизительно 81%, или приблизительно 82%, или  
 приблизительно 83%, или приблизительно 84%, или приблизительно 85%, или  
 приблизительно 86%, или приблизительно 87%, или приблизительно 88%, или  
 приблизительно 89%, или приблизительно 90%, или приблизительно 91%, или  
 приблизительно 92%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94%, или  
 приблизительно 95%.

#### Механические свойства

Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, или их компоненты можно предоставлять в ряде физических состояний в зависимости от выбранной терапии и способа введения. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению являются жидкостями. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению являются вязкими жидкостями. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению являются твердыми веществами. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению являются упругими твердыми веществами.

При исследовании тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, можно оценивать ряд реологических свойств, как показано в таблице 17:

**Таблица 17**

<b>Реологические термины, используемые для описания тканевых филлеров</b>	
Упругость	Способность тканевого филлера восстановиться в исходную форму после деформации
Модуль упругости	Мера накопленной энергии в вязкоупругом материале, обозначаемая символом $G'$
Вязкость	Характеристика текучести тканевого филлера (плотность геля)
Модуль вязкости	Мера рассеянной энергии в вязкоупругом материале обозначаемая как $G''$
Комплексный модуль	Общее сопротивление деформации тканевого филлера, определяемое с помощью векторной суммы $G'$ и $G''$ ( $G^*$ )
Комплексная вязкость	Вязкость, вычисленная из качания частоты, обозначаемая как $n^*$
Вязкоупругий	Определение тканевых филлеров, обладающих упругими и вязкими свойствами
Сила сдвига	Внешняя сила, прилагаемая параллельно тканевому филлеру при помещении между двумя пластинами, сдвигаемыми в противоположных направлениях
Истончение сдвига	Снижение вязкости тканевого филлера с повышением скорости деформации

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению являются вязкоупругими материалами, проявляющими механические свойства упругих и вязких материалов. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению можно описывать как гели. В этой области известны способы анализа механических или реологических свойств (например, вязкоупругих свойств) материала, такие как, например, описываемые в публикации патентной заявки США № 2006/0105022 и Stocks, et al., J. Drugs. Dermatol. (2011) 10:974-980, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Вязкоупругость материала можно охарактеризовывать с использованием динамомеханического анализа, например, прилагая колебательное напряжение к образцу и измеряя получаемое натяжение. Упругие материалы, как правило, демонстрируют синфазный стресс и натяжение, т.е. использование стресса приводит к незамедлительному натяжению. В вязких материалах натяжение является сдвинутым по фазе при использовании стресса на 90 градусов. В вязкоупругих материалах разность фаз между натяжением и стрессом составляет более 0,

но менее 90 градусов. В некоторых вариантах осуществления вязкоупругость материалов SPF по изобретению можно охарактеризовывать с помощью комплексного динамического модуля  $G$ , включающего динамический модуль упругости  $G'$  (также обозначаемый как модуль упругости) и модуль потерь  $G''$  (также обозначаемый как модуль вязкости):

$$G = G' + iG''$$

где  $i^2 = -1$ ,  $G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta$  и  $G'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta$ ,  $\sigma_0$  представляет собой амплитуду стресса,  $\varepsilon_0$  представляет собой амплитуду натяжения, и  $\delta$  представляет собой сдвиг фаз.

Модуль упругости  $G'$  и модуль потерь  $G''$  измеряют, подвергая образец геля SPF колебательному напряжению во вращательном или сдвиговом реометре. Образец помещают между двух пластин, одна из которых зафиксирована, а другая может вращаться, или подвергают колебаниям с заданной частотой. Значения модуля упругости  $G'$  и модуля потерь  $G''$  зависят от частоты. Диапазоны частот, используемых в измерении модуля упругости  $G'$  и модуля потерь  $G''$ , как правило, в качестве неограничивающих примеров, составляют от 0,1 до 10 Гц. В некоторых вариантах осуществления модуль упругости  $G'$  и модуль потерь  $G''$  измеряют при частоте колебаний 1 Гц.

В некоторых вариантах осуществления реологические свойства тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, например,  $G'$  и  $G''$ , можно измерять с использованием колебательного реометра с плоскопараллельным зазором. Пластины разных диаметров, например, 25 мм, можно использовать при различной высоте зазора между пластинами, например, 1 мм. Измерения можно осуществлять при различных температурах. В некоторых вариантах осуществления измерения осуществляют при постоянной температуре 25°C. В некоторых вариантах осуществления измерение включает качание частоты между двумя значениями частот, например от 1 до 10 Гц, при конкретном значении натяжения, например, при постоянном натяжении 2%. В некоторых вариантах осуществления измерения включают логарифмическое повышение частоты с последующим качанием натяжения, которое может составлять, например, от 1 до 300% при постоянной частоте, например, 5 Гц, с логарифмическим повышением натяжения. В некоторых вариантах осуществления динамический модуль упругости  $G'$  и модуль потерь  $G''$  можно получать из качания натяжения при конкретном процентном значении натяжения, например, при натяжении 1%.

В некоторых вариантах осуществления комплексный модуль (т.е. сумма  $G'$  и  $iG''$ ) представляет собой всеобъемлющую меру общего сопротивления деформации конкретного тканевого филлера, представленного в настоящем описании. Комплексный модуль можно тестировать с использованием реометра, где конкретный тканевой филлер (например, гель) можно зажимать между двумя параллельными круглыми пластинами и обеспечивать переменную деформацию сдвига посредством вращения одной пластины с разными частотами.

В некоторых вариантах осуществления характеристики конкретного тканевого

филлера можно исследовать с помощью процента упругости этого тканевого филлера, где процент упругости равен  $100 \times G' / (G' + G'')$ .

В некоторых вариантах осуществления характеристики конкретного тканевого филлера можно исследовать с помощью коэффициента восстановления этого тканевого филлера:

$$\text{Коэффициент восстановления} = \frac{\text{Значение вязкости, получаемое во время повышения частоты при качании}}{\text{Значение вязкости, получаемое во время снижения частоты при качании}}$$

где коэффициент восстановления приблизительно 1 означает, что конкретный тканевой филлер (например, гель) сохраняет свою структуру несмотря на прилагаемую силу; коэффициент восстановления более 1 означает, что конкретный тканевой филлер (например, гель) претерпевает распад кристаллической структуры; и гель с коэффициентом восстановления менее 1 имел повышенные прочностные характеристики.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что повышенный  $G'$  приводит к относительному повышению способности материала сопротивляться изменениям формы, и материал можно описать как более жесткий, твердый или более упругий, чем материал (например, гелевый тканевой филлер) с более низким  $G'$ . Таким образом, повышенный  $G'$  может приводить к соответствующему повышению способности материала обеспечивать структурную поддержку и/или увеличение объема.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что повышенный  $G''$  приводит к получению более вязкого материала (например, геля) по сравнению с материалом, имеющим более низкий  $G''$ . Кроме того, в случае материалов с более высоким  $G''$  наблюдают более значительные потери энергии в виде рассеянного тепла. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  повышается с повышением степени перекрестной сшивки. В некоторых вариантах осуществления  $G''$  повышается с повышением степени перекрестной сшивки. В некоторых вариантах осуществления  $G'$  и  $G''$  повышаются с повышением степени перекрестной сшивки. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G'$  от приблизительно менее 50 Па до приблизительно более 15000 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G'$  от приблизительно 50 Па до приблизительно 500000 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G'$  от приблизительно 100 Па до приблизительно 500000 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G'$  от приблизительно 75 Па до приблизительно 150 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G'$  от приблизительно 100 Па до приблизительно 250 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G'$  от приблизительно 150 Па до приблизительно 275 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G'$  от приблизительно 150 Па до приблизительно 500 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по































изобретению имеют  $G''$  приблизительно 170 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G''$  приблизительно 175 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G''$  приблизительно 180 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G''$  приблизительно 185 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G''$  приблизительно 190 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G''$  приблизительно 195 Па. В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры по изобретению имеют  $G''$  приблизительно 200 Па.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, демонстрирует динамическую вязкость. Вязкость представляет собой сопротивление жидкости сдвигу или течению, вызванным напряжением сдвига или напряжением растяжения. Вязкость соответствует внутреннему сопротивлению жидкости течению, вызванному межмолекулярным трением, возникающим, когда слои жидкости пытаются скользить друг относительно друга, и ее можно рассматривать в качестве меры трения жидкости. Чем менее вязкой является жидкость, тем легче она движется (тем больше текучесть).

Вязкость можно определять двумя способами: динамическая вязкость ( $\mu$ ; иногда обозначают как  $\eta$ ) или кинематическая вязкость ( $\nu$ ). Динамическая вязкость, также известная как абсолютная или комплексная вязкость, представляет собой тангенциальную силу на единицу площади, необходимую для движения одной горизонтальной плоскости относительно другой за единицу скорости при поддержании единичного расстояния от жидкости. Физической единицей в системе Си для динамической вязкости является паскаль-секунда (Па·с), идентичная  $\text{Н} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}$ . Динамическую вязкость можно выражать как  $\tau = \mu \, dv_x/dz$ , где  $\tau$  = напряжение сдвига,  $\mu$  = динамическая вязкость, и  $dv_x/dz$  является градиентом скорости во времени. Например, если жидкость с вязкостью один Па·с помещают между двумя пластинами, и одну пластину толкают вбок с напряжением сдвига в один паскаль, она сдвигается на расстояние, равное толщине слоя между пластинами за одну секунду. Кинематическая вязкость ( $\nu$ ) представляет собой соотношение динамической вязкости и плотности, величины, в которую не вовлечена сила и определяемую следующим образом:  $\nu = \mu/\rho$ , где  $\mu$  является динамической вязкостью, и  $\rho$  является плотностью ( $\text{кг}/\text{м}^3$ ). Кинематическую вязкость, как правило, измеряют с помощью стеклянного капиллярного вискозиметра в единицах системы Си  $\text{м}^2/\text{с}$ . Вязкость жидкости зависит от температуры, и, таким образом, динамическую и кинематическую вязкость регистрируют по отношению к температуре.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, демонстрирует динамическую вязкость, например, по меньшей мере 10 Па·с, по меньшей мере 20 Па·с, по меньшей мере 30 Па·с, по меньшей мере 40 Па·с, по меньшей мере 50 Па·с, по меньшей мере 60 Па·с, по меньшей мере 70 Па·с, по меньшей мере 80 Па·с, по меньшей мере 90 Па·с, по меньшей мере 100 Па·с, по меньшей мере 125

Па·с, по меньшей мере 150 Па·с, по меньшей мере 175 Па·с, по меньшей мере 200 Па·с, по меньшей мере 225 Па·с, по меньшей мере 250 Па·с, по меньшей мере 275 Па·с, по меньшей мере 300 Па·с, по меньшей мере 400 Па·с, по меньшей мере 500 Па·с, по меньшей мере 600 Па·с, по меньшей мере 700 Па·с, по меньшей мере 750 Па·с, по меньшей мере 800 Па·с, по меньшей мере 900 Па·с, по меньшей мере 1000 Па·с, по меньшей мере 1100 Па·с, или по меньшей мере 1200 Па·м. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, демонстрирует динамическую вязкость например, не более 10 Па·с, не более 20 Па·с, не более 30 Па·с, не более 40 Па·с, не более 50 Па·с, не более 60 Па·с, не более 70 Па·с, не более 80 Па·с, не более 90 Па·с, не более 100 Па·с, не более 125 Па·с, не более 150 Па·с, не более 175 Па·с, не более 200 Па·с, не более 225 Па·с, не более 250 Па·с, не более 275 Па·с, не более 300 Па·с, не более 400 Па·с, не более 500 Па·с, не более 600 Па·с, не более 700 Па·с, не более 750 Па·с, не более 800 Па·с, не более 900 Па·с или не более 1000 Па·с. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, демонстрирует динамическую вязкость, например, от приблизительно 10 Па·с до приблизительно 100 Па·с, от приблизительно 10 Па·с до приблизительно 150 Па·с, от приблизительно 10 Па·с до приблизительно 250 Па·с, от приблизительно 50 Па·с до приблизительно 100 Па·с, от приблизительно 50 Па·с до приблизительно 150 Па·с, от приблизительно 50 Па·с до приблизительно 250 Па·с, от приблизительно 100 Па·с до приблизительно 500 Па·с, от приблизительно 100 Па·с до приблизительно 750 Па·с, от приблизительно 100 Па·с до приблизительно 1000 Па·с, от приблизительно 100 Па·с до приблизительно 1200 Па·с, от приблизительно 300 Па·с до приблизительно 500 Па·с, от приблизительно 300 Па·с до приблизительно 750 Па·с, от приблизительно 300 Па·с до приблизительно 1000 Па·с или от приблизительно 300 Па·с до приблизительно 1200 Па·с.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут, по существу, поддерживать свой  $G'$  и/или  $G''$  *in vivo* в течение по меньшей мере 1 дня, или по меньшей мере 2 дней, или по меньшей мере 3 дней, или по меньшей мере 4 дней, или по меньшей мере 5 дней, или по меньшей мере 6 дней, или по меньшей мере 1 недели, или по меньшей мере 2 недель, или по меньшей мере 3 недель, или по меньшей мере 1 месяца, или по меньшей мере 2 месяцев, или по меньшей мере 3 месяцев, или по меньшей мере 4 месяцев, или по меньшей мере 5 месяцев, или по меньшей мере 6 месяцев, или по меньшей мере 7 месяцев, или по меньшей мере 8 месяцев, или по меньшей мере 9 месяцев, или по меньшей мере 10 месяцев, или по меньшей мере 11 месяцев, или по меньшей мере 1 года.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут, по существу, поддерживать свой  $G'$  и/или  $G''$  *in vivo* в течение не более 1 дня, или не более 2 дней, или не более 3 дней, или не более 4 дней, или не более 5 дней, или не более 6 дней, или не более 1 недели, или не более 2 недель, или не более 3 недель, или не более 1 месяца, или не более 2 месяцев, или не более 3 месяцев, или не более 4 месяцев, или не более 5 месяцев, или не более 6 месяцев, или не более 7 месяцев, или не

более 8 месяцев, или не более 9 месяцев, или не более 10 месяцев, или не более 11 месяцев, или не более 1 года.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут, по существу, поддерживать свой  $G'$  и/или  $G''$  *in vivo* в течение приблизительно 1 дня, или приблизительно 2 дней, или приблизительно 3 дней, или приблизительно 4 дней, или приблизительно 5 дней, или приблизительно 6 дней, или приблизительно 1 недели, или приблизительно 2 недель, или приблизительно 3 недель, или приблизительно 1 месяца, или приблизительно 2 месяцев, или приблизительно 3 месяцев, или приблизительно 4 месяцев, или приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 7 месяцев, или приблизительно 8 месяцев, или приблизительно 9 месяцев, или приблизительно 10 месяцев, или приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 1 года.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут, по существу, поддерживать свою упругость *in vivo* в течение по меньшей мере 1 дня, или по меньшей мере 2 дней, или по меньшей мере 3 дней, или по меньшей мере 4 дней, или по меньшей мере 5 дней, или по меньшей мере 6 дней, или по меньшей мере 1 недели, или по меньшей мере 2 недель, или по меньшей мере 3 недель, или по меньшей мере 1 месяца, или по меньшей мере 2 месяцев, или по меньшей мере 3 месяцев, или по меньшей мере 4 месяцев, или по меньшей мере 5 месяцев, или по меньшей мере 6 месяцев, или по меньшей мере 7 месяцев, или по меньшей мере 8 месяцев, или по меньшей мере 9 месяцев, или по меньшей мере 10 месяцев, или по меньшей мере 11 месяцев, или по меньшей мере 1 года.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут по существу, поддерживать свою упругость *in vivo* в течение не более 1 дня, или не более 2 дней, или не более 3 дней, или не более 4 дней, или не более 5 дней, или не более 6 дней, или не более 1 недели, или не более 2 недель, или не более 3 недель, или не более 1 месяца, или не более 2 месяцев, или не более 3 месяцев, или не более 4 месяцев, или не более 5 месяцев, или не более 6 месяцев, или не более 7 месяцев, или не более 8 месяцев, или не более 9 месяцев, или не более 10 месяцев, или не более 11 месяцев, или не более 1 года.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут, по существу, поддерживать свою упругость *in vivo* в течение приблизительно 1 дня, или приблизительно 2 дней, или приблизительно 3 дней, или приблизительно 4 дней, или приблизительно 5 дней, или приблизительно 6 дней, или приблизительно 1 недели, или приблизительно 2 недель, или приблизительно 3 недель, или приблизительно 1 месяца, или приблизительно 2 месяцев, или приблизительно 3 месяцев, или приблизительно 4 месяцев, или приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 7 месяцев, или приблизительно 8 месяцев, или приблизительно 9 месяцев, или приблизительно 10 месяцев, или приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 1 года.



или не более 2 дней, или не более 3 дней, или не более 4 дней, или не более 5 дней, или не более 6 дней, или не более 1 недели, или не более 2 недель, или не более 3 недель, или не более 1 месяца, или не более 2 месяцев, или не более 3 месяцев, или не более 4 месяцев, или не более 5 месяцев, или не более 6 месяцев, или не более 7 месяцев, или не более 8 месяцев, или не более 9 месяцев, или не более 10 месяцев, или не более 11 месяцев, или не более 1 года.

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут, по существу, поддерживать свой объем *in vivo* в течение приблизительно 1 дня, или приблизительно 2 дней, или приблизительно 3 дней, или приблизительно 4 дней, или приблизительно 5 дней, или приблизительно 6 дней, или приблизительно 1 недели, или приблизительно 2 недель, или приблизительно 3 недель, или приблизительно 1 месяца, или приблизительно 2 месяцев, или приблизительно 3 месяцев, или приблизительно 4 месяцев, или приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев, или приблизительно 7 месяцев, или приблизительно 8 месяцев, или приблизительно 9 месяцев, или приблизительно 10 месяцев, или приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 1 года.

#### Способы производства

Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно получать посредством комбинирования компонента на основе SPF с компонентом на основе НА с любыми дополнительными средствами или без них. В определенных вариантах осуществления один или оба из SPF и НА можно перекрестно сшивать перед комбинированием. В некоторых вариантах осуществления SPF и НА можно комбинировать, а затем перекрестно сшивать с использованием перекрестно-сшивающего средства, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления SPF можно перекрестно сшивать с использованием перекрестно-сшивающего средства, а затем добавлять к НА, которая может являться или не являться перекрестно-сшитой, и затем их комбинацию можно подвергать дополнительной перекрестной сшивке. В некоторых вариантах осуществления НА можно перекрестно сшивать с использованием перекрестно-сшивающего средства, а затем добавлять к SPF, которые могут являться или не являться перекрестно-сшитыми, и затем их комбинацию можно подвергать дополнительной перекрестной сшивке.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно получать посредством комбинирования компонента на основе SPF, компонента на основе НА и дополнительного средства, как описано выше в настоящем описании. В таких вариантах осуществления один или оба из SPF и НА можно перекрестно сшивать перед комбинированием. В некоторых вариантах осуществления SPF и НА можно комбинировать с дополнительным средством, и затем перекрестно сшивать с использованием перекрестно-сшивающего средства, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство можно добавлять после комбинирования SPF и НА.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, может включать SPF и HA в массовом соотношении (SPF:HA) от 0,1:1 до 0,1:10, или от 0,1:1 до 0,1:100, или 0,1:1000; от 1:1 до 1:10, или от 1:1 до 1:100, или от 1:1 до 1:1000.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, может включать SPF и HA в массовом соотношении (HA:SPF) от 0,1:1 до 0,1:10, или от 0,1:1 до 0,1:100, или 0,1:1000; от 1:1 до 1:10, или от 1:1 до 1:100, или от 1:1 до 1:1000.

В некоторых вариантах осуществления получаемую комбинацию HA/SPF (перекрестно-сшитую или не-перекрестно-сшитую) можно гомогенизировать, например, посредством механического смешивания исходно перекрестно-сшитой HA и/или SPF.

В некоторых вариантах осуществления раствор SPF можно получать и перекрестно сшивать с использованием перекрестно-сшивающего средства для получения перекрестно-сшитых SPF, к которым можно добавлять HA в перекрестно-сшитой форме, не-перекрестно-сшитой форме или их смеси. Затем получаемую смесь можно гомогенизировать и добавлять к ней любые дополнительные средства (например, лидокаин).

В некоторых вариантах осуществления раствор SPF можно получать и перекрестно сшивать с использованием перекрестно-сшивающего средства в присутствии HA для получения композиции перекрестно-сшитых SPF-HA, к которой можно добавлять или не добавлять HA в ее не-перекрестно-сшитой форме. Затем получаемую смесь можно гомогенизировать и добавлять к ней любые дополнительные средства (например, лидокаин).

В некоторых вариантах осуществления конкретные составы SPF, представленные в настоящем описании, можно комбинировать с HA или можно использовать перекрестную сшивку с использованием препаратов, приведенных в патентах США №№ 8288347 или 8450475 или публикациях патентных заявок США №№ 2006/0105022, 2016/0376382 или 2017/0315828, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, могут включать стадию стерилизации, где тканевой филлер или его часть подвергают воздействию, например, температур от 120°C до приблизительно 130°C и давления от приблизительно 12 до приблизительно 20 фунтов/дюйм<sup>2</sup> в течение от приблизительно 1 до приблизительно 15 минут.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, могут включать стадию дегазации, где растворы SPF, HA или SPF/HA, представленные в настоящем описании, используемые в получении тканевых филлеров, дегазируют.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно получать общими способами, описанными в примерах 5-20.

В описанных способах шелк можно получать в водном растворе, водно-спиртовом растворе, где спиртом может являться, например, этанол или метанол. В описанных способах можно использовать любые из перекрестно-сшивающих средств, представленных в настоящем описании, в соответствии с перекрестной сшивкой SPF с SPF, SPF с НА или НА с НА, как будет понятно специалисту в этой области.

#### Способы лечения

В варианте осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно использовать в способах лечения одного или более состояний у нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество тканевого филлера можно вводить в ткань нуждающегося в этом пациента для лечения состояния или другого дефекта ткани.

В рамках изобретения термин "лечение" относится к снижению или устранению у пациента косметического или клинического симптома состояния, такого как состояние мягких тканей, или замедление или профилактика дебюта косметического или клинического симптома состояния у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления состояние, которое лечат с помощью тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, могут включать состояние мягких тканей. Состояние мягких тканей включают, в качестве неограничивающих примеров, аугментации, реконструкции, заболевания, нарушения, дефекты или несовершенства части или области тела. В одном из аспектов состояние мягких тканей, которое лечат описываемыми тканевыми филлерами, включают, в качестве неограничивающих примеров, аугментацию лица, реконструкцию лица, заболевание лица, лицевое нарушение, лицевой дефект или несовершенство лица. В некоторых вариантах осуществления состояние мягких тканей, которое лечат тканевыми филлерами, представленными в настоящем описании, включают, в качестве неограничивающих примеров, дегидратацию кожи, недостаток эластичности кожи, огрубление кожи, недостаток натяжения кожи, растяжки на коже, бледность кожи, впадины на коже, впалые щеки, впалую височную область, тонкие губы, дефект уретры, дефект кожи, дефект молочной железы, ретроорбитальный дефект, складки на лице или морщины. В некоторых вариантах осуществления состояние мягких тканей, которое лечат тканевыми филлерами, представленными в настоящем описании, включает в качестве неограничивающих примеров, несовершенство, дефект, заболевание и/или нарушение молочной железы, такое как, например, аугментация молочной железы, реконструкция молочной железы, мастопексия, микромастия, торакальная гипоплазия, синдром Поланда, дефекты в результате осложнений имплантации, подобные сморщиванию и/или разрыву капсулы; несовершенство, дефект, заболевание или нарушение лица, такое как, например, аугментация лица, реконструкция лица, синдром Парри-Ромберга, люпус-панникулит, впадины на коже, впалые щеки, впалые височные области, тонкие губы, несовершенства или дефекты носа, ретроорбитальные несовершенства или дефекты, складки на лице, мелкие морщины и/или морщины, подобные глабеллярным морщинам, носогубным



складкам, морщинам около рта и/или морщины марионетки, и/или другие контурные деформации или несовершенства лица; несовершенство, дефект, заболевание или нарушение шеи; несовершенство, дефект, заболевание и/или нарушение кожи; несовершенства, дефекты, заболевания и/или нарушения других мягких тканей, таких как, например, аугментация или реконструкция верхней части руки, предплечья, кисти руки, плеча, спины, туловища, включая область живота, ягодицы, бедра, голени, включая икры, ступни, включая жировую подушку подошвы, глаз, гениталии или другую часть или область тела, или заболевание или нарушение, поражающее эти части или области тела; недержание мочи, энкопрез, другие формы недержания; и гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь (GERD).

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно вводить в мягкие ткани, включая, в качестве неограничивающих примеров, кожу, ткани дермы, субдермальные ткани, ткани кожи, подкожные ткани, интрадуральную ткань, мышцы, сухожилия, связки, фиброзные ткани, жир, кровеносные сосуды и артерии, нервы и синовиальные (интрадермальные) ткани.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно помещать непосредственно в рану, чтобы способствовать заживлению, обеспечивая искусственную биodeградируемую матрицу с сигналами прикрепления, миграции и пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления тканевыми филлерами, представленными в настоящем описании, можно покрывать биodeградируемую стеку или другой имплантируемый материал, или самим филлерам можно придавать форму листов или других структур или поддерживать их в гидратированной форме.

В некоторых вариантах осуществления количество композиции, используемой с любым из способов, представленных в настоящем описании, будут определять с учетом желаемого изменения и/или улучшения, желаемого уменьшения и/или устранения симптома состояния, клинического и/или косметического эффекта, желательного для индивидуума и/или лечащего врача, и части или области тела, подвергаемой лечению. Об эффективности введения композиция может свидетельствовать один или более из следующих клинических и/или косметических показателей: измененная и/или улучшенная форма мягких тканей, измененный и/или улучшенный размер мягких тканей, измененный и/или улучшенный контур мягких тканей, измененная и/или улучшенная функция ткани, поддержка врастания ткани и/или накопление нового коллагена, устойчивое приживление тканевого филлера, улучшение удовлетворенности и/или качества жизни пациента и снижение использования имплантируемого чужеродного материала. Например, в случае способов аугментации молочной железы об эффективности композиций и способов может свидетельствовать один или более из следующих клинических и/или косметических показателей: увеличение размера молочной железы, измененная форма молочной железы, измененный контур молочной железы, устойчивое приживление, снижение риска сморщивания капсулы, снижение показателя образования липонекротических цист,

улучшение удовлетворенности и/или качества жизни пациента и снижение использования имплантатов молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления об эффективности тканевых филлеров и способов лечения мягких тканей лица может свидетельствовать один или более из следующих клинических и/или косметических показателей: увеличение размера, формы и/или контура черт лица, подобные увеличению размера, формы и/или контура губы, щеки, виска или области глаз; изменение размера, формы и/или контура черт лица, подобное измененному размеру, форме и/или контуру губ, щек, виска или области глаза; уменьшение или устранение морщины, складки или мелкой морщины на коже; устойчивость к образованию морщин, складок или мелких морщин на коже; регидратация кожи; повышенная эластичность кожи; снижение или устранение огрубления кожи; повышенное и/или улучшенное натяжение кожи; уменьшение или устранение растяжек; повышение и/или улучшение тона, сияния, яркости и/или блеска кожи; повышение и/или улучшение цвета кожи, снижение или устранение бледности кожи; устойчивое приживление композиции; снижение побочных эффектов; улучшение удовлетворенности и/или качества жизни пациента.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тканевым филлерам и способам лечения, затрагивающим область кожи. В рамках изобретения термин "область кожи" относится к области кожи, содержащей дермо-эпидермальное соединение и дерму, включающую поверхностную дерму (папиллярную область) и глубокую дерму (ретикулярную область). Кожа состоит из трех основных слоев: эпидермиса, являющегося водонепроницаемым и служащим в качестве барьера для инфекции; дермы, служащей в качестве местоположения придатков кожи; и гиподермы (подкожного жирового слоя). Эпидермис не содержит кровеносные сосуды и получает питательные вещества посредством диффузии из дермы. Основным типом клеток, составляющих эпидермис, являются кератиноциты, меланоциты, клетки Лангерганса и клетки Меркеля.

Дерма является слоем кожи под эпидермисом, состоящим из соединительной ткани и смягчает прилагаемый к телу стресс и напряжение. Дерма тесно соединена с эпидермисом посредством базальной мембраны. Она также несет многие механорецепторы/нервные окончания, обеспечивающие чувство осязания и тепла. Она содержит волосяные фолликулы, потовые железы, сальные железы, апокринные железы, лимфатические сосуды и кровеносные сосуды. Кровеносные сосуды в дерме обеспечивают питание и удаление продуктов жизнедеятельности из собственных клеток, а также базального слоя эпидермиса. Дерму структурно разделяют на две области: поверхностную область, смежную с эпидермисом, названную папиллярной областью, и глубокую, более толстую область, известную как ретикулярная область.

Папиллярная область состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Она названа по пальцеобразным выступам под названием папиллы, выступающие в сторону эпидермиса. Папиллы придают дерме "бугристую" поверхность, смыкающуюся с

эпидермисом, усиливая соединение между двумя слоями кожи. Ретикулярная область залегает глубоко в папиллярной области и, как правило, является гораздо более толстой. Она состоит из плотной неупорядоченной соединительной ткани и получила свое названия из-за плотной концентрации коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон, вплетенных на всем ее протяжении. Эти белковые волокна придают коже ее свойства силы, растяжимости и эластичности. В ретикулярной области также расположены корни волос, сальные железы, потовые железы, рецепторы, ногти и кровеносные сосуды. Растяжки после беременности, например, расположены в коже.

Гиподерма находится ниже дермы. Она предназначена для прикрепления области кожи к нижележащей кости и мышце, а также снабжения ее кровеносными сосудами и нервами. Она состоит из рыхлой соединительной ткани и эластина. Основными типами клеток являются фибробласты, макрофаги и адипоциты (гиподерма содержит 50% телесного жира). Жир служит в качестве прокладочного и изоляционного материала для организма.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, вводят в область дермы индивидуума посредством инъекции в область дермы или область гиподермы. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, вводят в область дермы индивидуума посредством инъекции, например, в дермо-эпидермальное соединение, папиллярную область, ретикулярную область или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения состояния мягких тканей у индивидуума, включающим введение одного или более тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, в участок состояния мягких тканей индивидуума, где введение композиции улучшает состояние мягких тканей, таким образом, приводя к лечению состояния мягких тканей. В некоторых вариантах осуществления состояние мягких тканей является состоянием тканей молочной железы, состоянием тканей лица, состоянием шеи, состоянием кожи, состоянием верхней части руки, состоянием предплечья, состоянием кисти руки, состоянием плеча, состоянием спины, состоянием туловища, включая состояние области живота, состоянием ягодиц, состоянием бедра, состоянием голени, включая состояние икр, состоянием стопы, включая состояние жировой подушки подошвы, состоянием глаз, состоянием гениталий или состоянием, затрагивающим другую часть или область тела.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения состояния кожи, включающему введение индивидууму, страдающему состоянием кожи, одного или более тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, где введение тканевого филлера улучшает состояние кожи и, таким образом, приводит к лечению состояния кожи. В некоторых вариантах осуществления состояние кожи включает дегидратацию кожи, и способ лечения включает введение индивидууму, страдающему дегидратацией кожи, одного или более тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, где введение тканевого филлера приводит к регидратации кожи и,

таким образом, лечению дегидратации кожи. В другом аспекте этих вариантов осуществления способ лечения недостатка эластичности кожи включает введение индивидууму, страдающему недостатком эластичности кожи, тканевого филлера, представленного в настоящем описании, где введение тканевого филлера приводит к повышению эластичности кожи и, таким образом, лечению недостатка эластичности кожи. В еще одном аспекте этих вариантов осуществления способ лечения огрубления кожи включает введение индивидууму, страдающему огрублением кожи, композиции, представленной в настоящем описании, где введение композиции приводит к снижению огрубления кожи и, таким образом, лечению огрубления кожи. В некоторых вариантах осуществления способ лечения недостатка натяжения кожи включает введение индивидууму, страдающему недостатком натяжения кожи, тканевого филлера, представленного в настоящем описании, где введение тканевого филлера делает кожу более натянутой и, таким образом, позволяет лечить недостаток натяжения кожи.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения растяжек на коже, включающим введение индивидууму, страдающему растяжками на коже, одного или более тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, где введение одного или более тканевых филлеров уменьшает или устраняет растяжки на коже и, таким образом, приводит к лечению растяжек на коже. В некоторых вариантах осуществления способ лечения бледности кожи включает введение индивидууму, страдающему бледностью кожи, тканевого филлера, представленного в настоящем описании, где введение тканевого филлера улучшает тон или блеск кожи и, таким образом, приводит к лечению бледности кожи. В некоторых вариантах осуществления способ лечения морщин включает введение индивидууму, страдающему морщинами, тканевого филлера, представленного в настоящем описании, где введение тканевого филлера уменьшает или устраняет морщины и, таким образом, приводит к лечению морщин. В еще одном аспекте этих вариантов осуществления способ лечения морщин включает введение индивидууму тканевого филлера, представленного в настоящем описании, где введение тканевого филлера делает кожу устойчивой к образованию морщин и, таким образом, приводит к лечению морщин.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к введению композиции, представленной в настоящем описании, где такое введение способствует накоплению или образованию нового коллагена. Тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, могут поддерживать вращение ткани и новое накопление или образование коллагена.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что молекулярную массу SPF, используемых в получении тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, можно корректировать для получения слабого воспалительного ответа в выбранной ткани для запуска накопления или образования коллагена в результате ответов с пролиферацией и созреванием ткани, следующих после исходного воспалительного ответа. Фактически, SPF с более высокой молекулярной массой может приводить к

повышенному воспалительному ответу, в то время как SPF с более низкой молекулярной массой могут приводить к небольшому воспалительному ответу или не приводить к нему.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, имеют неожиданное свойство, состоящее в том, что возникающий в результате воспалительный ответ и, таким образом, образование коллагена посредством ответа с пролиферацией и созреванием ткани, можно корректировать, т.к. растворы SPF, используемые в настоящем описании, имеют ограниченные, а не широкие полидисперсности. В варианте осуществления введение тканевого филлера, представленного в настоящем описании, повышает накопление нового коллагена.

В некоторых вариантах осуществления введение тканевого филлера, представленного в настоящем описании, повышает накопление или образование нового коллагена на приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%, относительно того же или схожего тканевого филлера, содержащего HA, но не SPF.

В некоторых вариантах осуществления введение тканевого филлера,

представленного в настоящем описании, повышает накопление или образование нового коллагена на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 21%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 23%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 26%, по меньшей мере 27%, по меньшей мере 28%, по меньшей мере 29%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 31%, по меньшей мере 32%, по меньшей мере 33%, по меньшей мере 34%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 36%, по меньшей мере 37%, по меньшей мере 38%, по меньшей мере 39%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 41%, по меньшей мере 42%, по меньшей мере 43%, по меньшей мере 44%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 46%, по меньшей мере 47%, по меньшей мере 48%, по меньшей мере 49%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 51%, по меньшей мере 52%, по меньшей мере 53%, по меньшей мере 54%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 56%, по меньшей мере 57%, по меньшей мере 58%, по меньшей мере 59%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 61%, по меньшей мере 62%, по меньшей мере 63%, по меньшей мере 64%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 66%, по меньшей мере 67%, по меньшей мере 68%, по меньшей мере 69%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 71%, по меньшей мере 72%, по меньшей мере 73%, по меньшей мере 74%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 125%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 175%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 225%, по меньшей мере 250%, по меньшей мере 275% или по меньшей мере 300% относительно того же или схожего тканевого филлера, содержащего НА, но не SPF.

В некоторых вариантах осуществления введение тканевого филлера, представленного в настоящем описании, повышает накопление или образование нового коллагена на не более 1%, не более 2%, не более 3%, не более 4%, не более 5%, не более 6%, не более 7%, не более 8%, не более 9%, не более 10%, не более 11%, не более 12%, не более 13%, не более 14%, не более 15%, не более 16%, не более 17%, не более 18%, не более 19%, не более 20%, не более 21%, не более 22%, не более 23%, не более 24%, не более 25%, не более 26%, не более 27%, не более 28%, не более 29%, не более 30%, не более 31%, не более 32%, не более 33%, не более 34%, не более 35%, не более 36%, не более 37%, не более 38%, не более 39%, не более 40%, не более 41%, не более 42%, не

более 43%, не более 44%, не более 45%, не более 46%, не более 47%, не более 48%, не более 49%, не более 50%, не более 51%, не более 52%, не более 53%, не более 54%, не более 55%, не более 56%, не более 57%, не более 58%, не более 59%, не более 60%, не более 61%, не более 62%, не более 63%, не более 64%, не более 65%, не более 66%, не более 67%, не более 68%, не более 69%, не более 70%, не более 71%, не более 72%, не более 73%, не более 74%, не более 75%, не более 76%, не более 77%, не более 78%, не более 79%, не более 80%, не более 81%, не более 82%, не более 83%, не более 84%, не более 85%, не более 86%, не более 87%, не более 88%, не более 89%, не более 90%, не более 91%, не более 92%, не более 93%, не более 94%, не более 95%, не более 96%, не более 97%, не более 98%, не более 99%, не более 100%, не более 125%, не более 150%, не более 175%, не более 200%, не более 225%, не более 250%, не более 275% или не более 300% относительно того же или схожего тканевого филлера, содержащего НА, но не SPF.

В некоторых вариантах осуществления введение тканевого филлера, представленного в настоящем описании, повышает накопление или образование нового коллагена на от приблизительно 1% до приблизительно 10%, от приблизительно 10% до приблизительно 50%, от приблизительно 10% до приблизительно 100%, от приблизительно 50% до приблизительно 150%, от приблизительно 100% до приблизительно 200%, от приблизительно 150% до приблизительно 250%, от приблизительно 200% до приблизительно 300%, от приблизительно 350% до приблизительно 450%, от приблизительно 400% до приблизительно 500%, от приблизительно 550% до приблизительно 650%, от приблизительно 600% до приблизительно 700% относительно того же или схожего тканевого филлера, содержащего НА, но не SPF.

В некоторых вариантах осуществления количество тканевого филлера, используемого в любом из способов, представленных в настоящем описании, как правило, будет являться терапевтически эффективным количеством. В рамках изобретения термин "терапевтически эффективное количество" является синонимом "эффективного количества", "терапевтически эффективной дозы" и/или "эффективной дозы" и относится к количеству тканевого филлера, которое вызовет ожидаемый биологический, косметический или клинический ответ у нуждающегося в этом пациента. В качестве неограничивающего примера, эффективное количество является количеством, достаточным для достижения одного или более из клинических и/или косметических показателей, представленных в настоящем описании. Специалисты в этой области могут определять соответствующее эффективное количество, подлежащее введению для конкретного использования описанных способов, с использованием руководства, представленного в настоящем описании. Например, эффективное количество можно экстраполировать из любых и всех анализов *in vitro* и *in vivo*, как представлено в настоящем описании. Специалисту в этой области будет понятно, что состояние индивидуума можно подвергать мониторингу на всем протяжении лечения, и что таким образом можно корректировать вводимое эффективное количество композиции,













900 мл до 950 мл, или от 950 мл до 1000 мл, или от 1 мл до 25 мл, или от 1 мл до 50 мл, или от 1 мл до 75 мл, или от 1 мл до 100 мл, или от 10 мл до 25 мл, или от 10 мл 50 мл, или от 10 мл до 75 мл, или от 100 мл до 250 мл, или от 100 мл до 500 мл, или от 100 мл до 750 мл, или от 100 мл до 1000 мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к введению тканевого филлера, представленного в настоящем описании. В рамках изобретения термин "введение" означает любой механизм введения, посредством которого индивидууму предоставляют тканевой филлер, представленный в настоящем описании, и который потенциально приводит к клинически, терапевтически или экспериментально благоприятному результату. Конкретный механизм введения, используемый для введения тканевого филлера индивидууму, может определять специалист в этой области, принимая во внимание факторы, включающие, в качестве неограничивающих примеров, тип состояния, локализацию состояния, причину состояния, тяжесть состояния, желаемую степень облегчения, желаемую длительность облегчения, конкретный используемый тканевой филлер, скорость биодеградации, биоабсорбции, биорезорбции и т.п. конкретного используемого тканевого филлера, природу компонентов, включенных в конкретный используемый тканевой филлер, конкретный путь введения, конкретные характеристики, анамнез и факторы риска у пациента, такие как, например, возраст, масса, общее состояние здоровья и т.п. или любую их комбинацию. В аспекте этого варианта осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, вводят в область у пациента посредством инъекции, где область может находиться в коже, тканях дермы, субдермальных тканях, тканях кожи, подкожных тканях, интрадуральной ткани, мышцах, сухожилиях, связках, фиброзных тканях, жире, кровеносных сосудах и артериях, нервах или синовиальных (интрадермальных) тканях.

В некоторых вариантах осуществления путь введения тканевого филлера, вводимого пациенту, будут определять с учетом косметического и/или клинического эффекта, желательного для пациента и/или лечащего врача, и части или области тела, подвергаемой лечению. Тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно вводить любыми способами, известными специалистам в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, использование шприца с иглой, катетера, местное введение или прямую хирургическую имплантацию. Тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно вводить в область кожи, такую как, например, область дермы или область гиподермы. Кроме того, тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно вводить один раз, два раза, три раза или множество раз в зависимости от требований конкретной терапии.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно инъецировать. В рамках изобретения термин "инъецируемый" относится к тканевому материалу, имеющему свойства, необходимые для введения тканевого филлера в область кожи индивидуума с использованием инъекционного устройства с иглой, такой как, например, тонкая игла. В рамках

изобретения термин "тонкая игла" относится к игле, имеющей калибр 27 или менее. В некоторых вариантах осуществления тонкая игла может являться иглой калибром 27-30. Инъекцируемости тканевого филлера, представленного в настоящем описании, можно достигать, варьируя некоторые параметры тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, например, корректируя степень перекрестной сшивки, иным образом варьируя параметры  $G'$  и/или  $G''$ , добавляя не-перекрестно-сшитые полимеры (например, SPF или HA) и т.п.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно инъектировать через тонкую иглу. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании можно инъектировать через иглу, например, 20 калибра, или 21 калибра, или 22 калибра, или 23 калибра, или 24 калибра, или 25 калибра, или 26 калибра, или 27 калибра, или 28 калибра, или 29 калибра, или 30 калибра, или 31 калибра, или 32 калибра, или 33 калибра, или 34 калибра. В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно инъектировать через иглу 20 калибра, или 21 калибра, или 22 калибра, или 23 калибра, или 24 калибра, или 25 калибра, или 26 калибра, или 27 калибра, или 28 калибра, или 29 калибра, или 30 калибра.

В некоторых вариантах осуществления тканевой филлер, представленный в настоящем описании, можно инъектировать с помощью шприца, имеющего объем от приблизительно 0,8 до приблизительно 1,0 мл.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно вводить в пустоты в мягких тканях или вокруг них в целях, например, аугментации ткани (например, аугментации молочной железы или ягодиц). При введении тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, в такие пустоты можно использовать более крупные шприцы и иглы (например, иглы 27 калибра или более).

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно вводить в рану без использования иглы для покрытия раны или медицинского устройства вблизи раны.

В некоторых вариантах осуществления тканевые филлеры, представленные в настоящем описании, можно наносить на поверхность медицинского устройства.

Следующие примеры использованы для предоставления специалистам в этой области полного описания получения и использования описанных вариантов осуществления, и они не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением, кроме того, они не означают, что описанные ниже эксперименты являются всеми и единственными осуществленными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иначе, части являются массовыми частями, молекулярная масса является средневзвешенной молекулярной

массой, температура приведена в градусах Цельсия, и давление является атмосферным или близким к нему.

### **ПРИМЕРЫ**

#### **Пример 1: Оценка эффекта Тиндаля в гелях**

Для дополнительного подтверждения визуальных наблюдений и осуществления сравнительного анализа характеристик дермальных филлеров осуществляют количественный анализ эффекта Тиндаля. Учитывая существующее научное представление о рассеянии света и взаимодействии света с кожей для количественного анализа эффекта Тиндаля в коже используют два разных подхода на основе (а) колориметрии и (б) спектроскопии. Основываясь на этих способах, определяют три разных количественных параметра (приведены ниже) для измерения эффекта Тиндаля *in vivo*.

Визуальные баллы эффекта Тиндаля:

Шкала имеет диапазон от 1 до 5 с приращениями 0,5. Балл 1 приписывают местам инъекций с нормальным тоном кожи и без синего окрашивания. Максимальный балл 5 дают плотному и выраженному синему окрашиванию. Перед маскированным анализом тестируемых образцов трех независимых наблюдателей обучают с использованием шкалы.

Синий компонент цвета кожи - "b": хромометр используют для количественного анализа синего компонента цвета света, отражаемого участками кожи, в которые инъецировали различные филлеры. Этого достигают с использованием компонента "b" цветной шкалы L-a-b.

"% синего света" испускаемого кожей: портативный спектрофотометр используют для количественного анализа % синего света, отражаемого кожей в общем диапазоне видимого света. Его получают посредством интегрирования площади под спектром видимого света 400-490 нм и ее нормализации по общей площади под спектром (400-700 нм).

Гели по настоящему изобретению и коммерчески доступные гели инъецируют интрадермально с помощью соответствующей иглы способом линейной инъекции в бедра безшерстных крыс возрастом два месяца. Гели имплантируют поверхностно для имитации клинических способов коррекции мелких морщин. Тесты на эффект Тиндаля осуществляют через 48 ч. после имплантации геля. Перед тестами на эффект Тиндаля животных гуманно умерщвляют для улучшения контрастирования эффекта Тиндаля.

Для балльной оценки мест инъекций используют визуальную шкалу 1-5 с приращениями 0,5. В местах инъекций с баллами 1 не наблюдали нарушение окрашивания кожи, в то время в местах инъекций с баллами 5 наблюдают выраженное синие окрашивание кожи. Спектроскопический анализ также осуществляли на местах инъекций с помощью хромометра. Синий компонент цвета кожи "b" и % синего света, отражаемого кожей (400-700 нм), измеряли независимо.

#### **Пример 2: Тестирование тканевых филлеров *in vivo***

Тканевые филлеры, полученные по изложенному выше описанию, можно тестировать после интрадермальной имплантации, имплантации в мышцы и подкожной инъекции.

Например, дозу тканевого филлера можно набирать в шприц и инъектировать интрадермально, внутримышечно или подкожно с использованием шприца соответствующего размера, обеспечивающего течение тканевого филлера через иглу в место инъекции.

После исходной инъекции в сравнении с контролем (например, водой и/или реализуемым на рынке тканевым филлером на основе НА, такого как Juvederm) места инъекций можно подвергать мониторингу с интервалами в 1 неделю или 2 недели, когда пациентов наблюдают на предмет проблем с биосовместимостью, включая цитотоксичность, пирогенность, образование эндотоксинов, острую системную токсичность, субхроническую токсичность, интрадермальную реактивность, генотоксичность и сенсибилизацию кожи.

Кроме того, физические свойства тканевого филлера можно подвергать мониторингу, исследуя наличие эффекта Тиндаля или потери объема, эластичности или прочности в месте инъекции

### **Пример 3: Исследование реологии тканевого филлера**

Для измерения реологических свойств тканевых филлеров, представленных в настоящем описании, можно использовать колебательный реометр с плоскопараллельным зазором (Anton Paar Physica MCR 301). Можно использовать диаметр пластины 25 мм с высотой зазора 1 мм. Измерения можно осуществлять при постоянной температуре 25°C. Каждое измерение будет состоять из качания частоты от 1 до 10 Гц при постоянном натяжении 2% и логарифмическом повышении частоты с последующим качанием натяжения от 1 до 300% при постоянной частоте 5 Гц с логарифмическим повышением натяжения. Результатами таких анализов будут являться динамический модуль упругости  $G'$  и модуль потерь  $G''$  для каждого тестируемого тканевого филлера.

### **Пример 4: Исследование непрозрачности раствора шелка/НА**

Растворы НА и шелка получали в воде или фосфатно-солевом буфере по таблице 18.

**Таблица 18**

<b>Образец</b>	<b>Описание</b>
1	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 0,3 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
2	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 0,6 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл



	Растворитель: вода
3	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 3,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
4	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 6,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
5	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 15,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
6	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 30,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
7	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 45,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
8	MW шелка: "низкая" Концентрация шелка: 0,6 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
9	MW шелка: "низкая" Концентрация шелка: 15,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
10	MW шелка: "низкая" Концентрация шелка: 30,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
11	MW шелка: "низкая"

	Концентрация шелка: 45,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: вода
12	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 0,6 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: PBS
13	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 15,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: PBS
14	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 30,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: PBS
15	MW шелка: "средняя" Концентрация шелка: 45,0 мг/мл Концентрация НА: 22 мг/мл Растворитель: PBS

Низкая=молекулярные массы шелка от 0 до 25 кДа

Средняя=молекулярные массы шелка от 25 кДа до 60 кДа

Получаемые растворы, приведенные в указанной выше таблице, показаны на фиг. 26 и 27. Контроль на фиг. 26 и 27 (немеченый флакон на фиг. 26 и контрольный шприц на фиг. 27) являлся раствором НА (22 мг/мл) в воде. Как показано на фиг. 26 и 27, растворы шелк/НА были гомогенными и визуально непрозрачными по сравнению с НА в отдельности.

#### **Пример 5: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия а: Гиалуроновую кислоту можно растворять в растворе NaOH и добавлять в раствор шелка, как представлено в настоящем описании;

Стадия b: Добавление растворенного BDDE в NaOH к раствору шелк/НА/NaOH;

Стадия c: Перекрестная сшивка посредством смешивания при нагревании;

Стадия d: Пропускают через металлическое сито и позволяют набухать в воде;

Стадия e: Осаждение набухшего геля в этаноле;

Стадия f: Промывка этанолом, водой и раствором NaOH;

Стадия g: Конечная перекрестная сшивка в растворе этанол/NaOH в течение

приблизительно 2 часов при нагревании (50°C);

Стадия h: Нейтрализация pH раствора до 7;

Стадия i: Преципитат промывают и сушат;

Стадия j: Полученному сухому порошку позволяют набухать в гель в забуференном 0,9% растворе NaCl; и

Стадия k: Гель набирают в шприц и автоклавируют, получая конечный тканевой филлер.

#### **Пример 6: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: Гиалуроновую кислоту можно растворять в растворе NaOH;

Стадия b: Добавление шелка в растворе NaOH к раствору шелка, а затем добавление растворенного BDDE в NaOH к раствору шелк/НА/NaOH;

Стадия c: Перекрестная сшивка посредством смешивания при нагревании;

Стадия d: Пропускают через металлическое сито и позволяют набухать в воде;

Стадия e: Осаждение набухшего геля в этаноле;

Стадия f: Промывка этанолом, водой и раствором NaOH;

Стадия g: Конечная перекрестная сшивка в растворе этанол/NaOH в течение приблизительно 2 часов при нагревании (50°C);

Стадия h: Нейтрализация pH раствора до 7;

Стадия i: Преципитат промывают и сушат;

Стадия j: Полученному сухому порошку позволяют набухать в гель в забуференном 0,9% растворе NaCl; и

Стадия k: Гель набирают в шприц и автоклавируют, получая конечный тканевой филлер.

#### **Пример 7: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: Гиалуроновую кислоту можно растворять в растворе NaOH;

Стадия b: Добавление растворенного BDDE в NaOH к раствору НА/NaOH;

Стадия c: Добавление раствора шелка к раствору со стадии b и перекрестная сшивка посредством смешивания при нагревании;

Стадия d: Пропускают через металлическое сито и позволяют набухать в воде;

Стадия e: Осаждение набухшего геля в этаноле;

Стадия f: Промывка этанолом, водой и раствором NaOH;

Стадия g: Конечная перекрестная сшивка в растворе этанол/NaOH в течение приблизительно 2 часов при нагревании (50°C);

Стадия h: Нейтрализация pH раствора до 7;

Стадия i: Преципитат промывают и сушат;

Стадия j: Полученному сухому порошку позволяют набухать в гель в

забуференном 0,9% растворе NaCl; и

Стадия k: Гель набирают в шприц и автоклавируют, получая конечный тканевой филлер.

**Пример 8: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: Гиалуроновую кислоту можно растворять в растворе NaOH;

Стадия b: Добавление растворенного BDDE в NaOH в раствор НА/NaOH;

Стадия c: Перекрестная сшивка посредством смешивания при нагревании;

Стадия d: Добавляют раствор шелка в раствор перекрестно-сшитой НА/NaOH, пропускают через металлическое сито и позволяют набухать в воде;

Стадия e: Осаждение набухшего геля в этаноле;

Стадия f: Промывка этанолом, водой и раствором NaOH;

Стадия g: Конечная перекрестная сшивка в растворе этанол/NaOH в течение приблизительно 2 часов при нагревании (50°C);

Стадия h: Нейтрализация pH раствора до 7;

Стадия i: Преципитат промывают и сушат;

Стадия j: Полученному сухому порошку позволяют набухать в гель в забуференном 0,9% растворе NaCl; и

Стадия k: Гель набирают в шприц и автоклавируют, получая конечный тканевой филлер.

**Пример 9: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

А Шелк/НА тканевой филлер Как представлено в настоящем описании можно получать следующим общим способом:

Стадия a: Гиалуроновую кислоту можно растворять в растворе NaOH;

Стадия b: Добавление растворенного BDDE в NaOH к НА/NaOH раствор;

Стадия c: Перекрестная сшивка посредством смешивания при нагревании;

Стадия d: Пропускают через металлическое сито и позволяют набухать в воде;

Стадия e: Осаждение набухшего геля в этаноле;

Стадия f: Промывка этанолом, водой и раствором NaOH;

Стадия g: Добавление раствора шелка к материалу, полученному на стадии f, и конечная перекрестная сшивка в растворе этанол/NaOH в течение приблизительно 2 часов при нагревании (50°C);

Стадия h: Нейтрализация pH раствора до 7;

Стадия i: Преципитат промывают и сушат;

Стадия j: Полученному сухому порошку позволяют набухать в гель в забуференном 0,9% растворе NaCl;

Стадия k: Гель набирают в шприц и автоклавируют, получая конечный тканевой филлер.

**Пример 10: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия а: Гиалуронат натрия можно смешивать с раствором NaOH и раствором шелка, как представлено в настоящем описании;

Стадия b: BDDE можно добавлять к раствору со стадии а;

Стадия с: Продукту стадии b позволяют реагировать;

Стадия d: Добавляют аммиак в диализную смесь со стадии с и смесь наливают в чашку Петри;

Стадия e: Продукту стадии d позволяют высохнуть до состояния пленки;

Стадия f: Пленку со стадии e делят на частицы и позволяют набухать в физиологическом растворе;

Стадия g: Продукт стадии f добавляют в шприц и автоклавируют;

Стадия h (необязательная): Продукт стадии f можно подвергать второй, конечной перекрестной сшивке с раствором BDDE или другим перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании, и промывают.

#### **Пример 11: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия а: Гиалуронат натрия можно смешивать с раствором NaOH;

Стадия b: Раствор шелка можно добавлять в раствор со стадии а и можно добавлять BDDE;

Стадия с: Продукту стадии b позволяют реагировать;

Стадия d: Добавляют аммиак в диализную смесь со стадии с и смесь наливают в чашку Петри;

Стадия e: Продукту стадии d позволяют высохнуть до состояния пленки;

Стадия f: Пленку со стадии e делят на частицы и позволяют набухать в физиологическом растворе;

Стадия g: Продукт стадии f добавляют в шприц и автоклавируют;

Стадия h (необязательная): Продукт стадии f можно подвергать второй, конечной перекрестной сшивке с раствором BDDE или другим перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании, и промывают.

#### **Пример 12: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия а: Гиалуронат натрия можно смешивать с раствором NaOH;

Стадия b: BDDE можно добавлять в раствор со стадии а;

Стадия с: Продукт стадии b добавляют в раствор шелка и позволяют реагировать;

Стадия d: Добавляют аммиак в диализную смесь со стадии с и смесь наливают в чашку Петри;

Стадия e: Продукту стадии d позволяют высохнуть до состояния пленки;

Стадия f: Пленку со стадии e делят на частицы и позволяют набухать в физиологическом растворе;

Стадия g: Продукт стадии f добавляют в шприц и автоклавируют;

Стадия h (необязательная): Продукт стадии f можно подвергать второй, конечной перекрестной сшивке с раствором BDDE или другим перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании, и промывают.

#### **Пример 13: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: Гиалуронат натрия можно смешивать с раствором NaOH;

Стадия b: BDDE можно добавлять к раствору со стадии a;

Стадия c: Продукту стадии b позволяют реагировать;

Стадия d: Продукт стадии c добавляют к раствору шелка, а затем в их диализную смесь добавляют аммиак и смесь наливают в чашку Петри;

Стадия e: Продукту стадии d позволяют высохнуть до состояния пленки;

Стадия f: Пленку со стадии e делят на частицы и позволяют набухать в физиологическом растворе;

Стадия g: Продукт стадии f добавляют в шприц и автоклавируют;

Стадия h (необязательная): Продукт стадии f можно подвергать второй, конечной перекрестной сшивке с раствором BDDE или другим перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании, и промывают.

#### **Пример 14: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: Раствор шелка можно получать, как представлено в настоящем описании, в который можно добавлять BDDE в воде;

Стадия b: НА можно добавлять в раствор со стадии a;

Стадия c: Смесь со стадии b можно перемешивать (например, 5 минут) и позволять отстаиваться в течение приблизительно 1 дня;

Стадия d: Получаемому гелю со стадии c можно позволять отстаиваться в физиологическом растворе в течение 1 недели для получения итогового тканевого филлера.

#### **Пример 15: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: BDDE можно добавлять в воду;

Стадия b: Раствор шелка можно добавлять в раствор со стадии a, к которому затем можно добавлять НА;

Стадия c: Смесь со стадии b можно перемешивать (например, 5 минут) и позволять отстаиваться в течение приблизительно 1 дня;

Стадия d: Получаемому гелю со стадии с можно позволять отстаиваться в физиологическом растворе в течение 1 недели для получения итогового тканевого филлера.

#### **Пример 16: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: BDDE можно добавлять в воду;

Стадия b: НА можно добавлять в раствор со стадии a;

Стадия c: Раствор шелка можно добавлять в смесь со стадии b и получаемую смесь можно перемешивать (например, 5 минут) и позволять отстаиваться в течение приблизительно 1 дня;

Стадия d: Получаемому гелю со стадии с можно позволять отстаиваться в физиологическом растворе в течение 1 недели для получения итогового тканевого филлера.

#### **Пример 17: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: К раствору шелка, как представлено в настоящем описании, можно добавлять НА, растворенную (смешиваемую в течение приблизительно 12 часов при 400 об./мин.) в растворе NaOH;

Стадия b: Раствор со стадии a можно дегазировать;

Стадия c: Раствор со стадии b можно смешивать с перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании (например, BDDE), при 50°C в течение приблизительно 10-20 минут;

Стадия d: Перекрестно-сшитый гель смешивают с лидокаином HCl;

Стадия e: Диализ скорректированного перекрестно-сшитого раствора можно осуществлять в течение 3 дней, затем 2 дней с PBS, затем 1 дня с водой;

Стадия f: Затем фильтрованный полученный продукт лиофилизируют для получения твердого вещества;

Стадия g: Твердое вещество растворяют в PBS, а затем инкубируют;

Стадия h (необязательная): К продукту стадии g можно добавлять свободную НА;

Стадия i: Получаемый продукт стадии g или h можно стерилизовать посредством стерилизации паром.

#### **Пример 18: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/НА, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: НА можно растворять (смешивать в течение приблизительно 12 часов при 400 об./мин.) в растворе NaOH;

Стадия b: Раствор шелка можно добавлять к раствору со стадии a и полученную смесь можно дегазировать;

Стадия с: Раствор со стадии b можно смешивать с перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании (например, BDDE), при 50°C в течение приблизительно 10-20 минут;

Стадия d: Перекрестно-сшитый гель смешивают с лидокаином HCl;

Стадия e: Диализ скорректированного перекрестно-сшитого раствора можно осуществлять в течение 3 дней, затем 2 дней с PBS, затем 1 дня с водой;

Стадия f: Затем фильтрованный полученный продукт лиофилизируют для получения твердого вещества;

Стадия g: Твердое вещество растворяют в PBS, а затем инкубируют;

Стадия h (необязательная): К продукту стадии g можно добавлять свободную HA;

Стадия i: Получаемый продукт стадии g или h можно стерилизовать посредством стерилизации паром.

### **Пример 19: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/HA, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: HA можно растворять (смешивать в течение приблизительно 12 часов при 400 об./мин.) в растворе NaOH;

Стадия b: Раствор со стадии a можно дегазировать;

Стадия с: Раствор шелка можно добавлять в раствор со стадии b и получаемую смесь можно смешивать с перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании (например, BDDE), при 50°C в течение приблизительно 10-20 минут;

Стадия d: Перекрестно-сшитый гель смешивают с лидокаином HCl;

Стадия e: Диализ скорректированного перекрестно-сшитого раствора можно осуществлять в течение 3 дней, затем 2 дней с PBS, затем 1 дня с водой;

Стадия f: Затем фильтрованный полученный продукт лиофилизируют для получения твердого вещества;

Стадия g: Твердое вещество растворяют в PBS, а затем инкубируют;

Стадия h (необязательная): К продукту стадии g можно добавлять свободную HA;

Стадия i: Получаемый продукт стадии g или h можно стерилизовать посредством стерилизации паром.

### **Пример 20: Предлагаемый способ получения тканевого филлера**

Тканевой филлер шелк/HA, как представлено в настоящем описании, можно получать следующим общим способом:

Стадия a: HA можно растворять (смешивать в течение приблизительно 12 часов при 400 об./мин.) в растворе NaOH;

Стадия b: Раствор со стадии a можно дегазировать;

Стадия с: Раствор со стадии b можно смешивать с перекрестно-сшивающим средством, представленным в настоящем описании (например, BDDE), при 50°C в течение приблизительно 10-20 минут;

Стадия d: Раствор шелка можно добавлять к продукту стадии с и смесь можно



смешивать с лидокаином HCl;

Стадия e: Диализ скорректированного перекрестно-сшитого раствора можно осуществлять в течение 3 дней, затем 2 дней с PBS, затем 1 дня с водой;

Стадия f: Затем фильтрованный полученный продукт лиофилизируют для получения твердого вещества;

Стадия g: Твердое вещество растворяют в PBS, а затем инкубируют;

Стадия h (необязательная): К продукту стадии g можно добавлять свободную HA;

Стадия i: Получаемый продукт стадии g или h можно стерилизовать посредством стерилизации паром.

**Пример 21: Составы дермальных филлеров, состоящих из шелка и гиалуроновой кислоты, перекрестно-сшитых с BDDE**

Материалы: диглицидиловый простой эфир 1,4-бутандиола (BDDE; Sigma-Aldrich); гиалуронат натрия (HA; Lifecore); шелк, 6% раствор (Silk Therapeutics); гидроксид натрия, 0,1 N раствор (BDH); соляная кислота, 5 N (Ricca Chemical); фосфатно-солевой буфер (PBS; 20-кратный; VWR Life Science).

Переменные состава: Молекулярная масса шелка: раствор шелка со средней и низкой MW (6%); Молекулярная масса HA: 1,5 МДа и 2,2 МДа; концентрация шелка: 1% об./об. (0,6 мг/мл), 2% об./об. (6 мг/мл) 5% об./об. (3 мг/мл) и 20% об./об. (12 мг/мл).

Перекрестная сшивка гидрогеля: (a) добавляли 6% раствор шелка к 0,1 N гидроксида натрия; (b) в полученный ранее раствор постепенно добавляли порошок HA с помощью верхнеприводной мешалки со скоростью 200-400 об./мин. в зависимости от содержания шелка; осторожно перемешивали во избежание образования избытка пузырьков воздуха; продолжали перемешивать до полного растворения HA; (c) в указанный выше раствор добавляли 1% масс./масс. BDDE; (d) нагревали до 50°C и продолжали перемешивать при 100-200 об./мин. в течение 30 минут; (e) перекрестно-сшитому гелю позволяли охлаждаться до температуры ниже 30°C; (f) добавляли 5 N соляную кислоту для коррекции pH до 7,0-7,4.

Диализ гидрогеля: (a) гидратировали диализную кассету в течение 2 минут; вытирали избыток воды и измеряли общую массу пустой кассеты; (b) в диализную кассету добавляли приблизительно 18 г состава гидрогеля; измеряли общую массу кассеты после внесения геля; (c) суспендировали диализную кассету в 2 л 1-кратного буфера PBS и устанавливали магнитную мешалку при 200 об./мин.; регистрировали время начала диализа и заменяли буфер PBS через 4 ч., 24 ч. и 48 ч. диализа; собирали гель через 72 ч.

Характеризация: динамический модуль упругости при сдвиге ( $G'$ ) и вязкость; ферментативная деградация; остаточный BDDE; плотность перекрестной сшивки; 30-дневное исследование на животных; цитотоксичность; бактериальный эндотоксин; мутность.

Вязкоупругие свойства: для определения динамического модуля упругости ( $G'$ ) и комплексной вязкости ( $\eta$ ) составов дермального филлера использовали гибридный реометр Discovery HR-1 (TA Instruments). Образцы тестировали, меняя частоту колебаний

с 0,1 Гц на 10 Гц с 10 точками данных на десятичный интервал. Данные регистрировали и сравнивали при скорости сдвига 5 Гц. Данные  $G'$  и  $\gamma$  для составов гидрогеля (после диализа) с постоянной концентрацией НА и переменной концентрацией шелка приведены в таблице 19. В этой партии использовали молекулярную массу НА 1,5 МДа.

**Таблица 19:** Вязкоупругие свойства гидрогелей с постоянной концентрацией НА

Образец	Концентрация НА.* (мг/мл)	Концентрация шелка.* (мг/мл)	MW шелка	$G'$ при 5 Гц (Па)	$\eta$ при 5 Гц (Па·с)
C2	24	0	Не определена	46,9	2,88
A	24	9,6	Средняя	105,5	4,93
B	24	0,48	Низкая	69,7	3,62
C	24	4,8	Средняя	102,7	4,82
D	24	0,48	Средняя	66,4	3,59
E	24	2,4	Низкая	41,4	2,56
F	24	0,96	Низкая	42,7	2,67

\*: Гидрогель абсорбировал буфер PBS после диализа, что приводило к повышению объема. Концентрации НА и шелка пересчитывали с учетом коэффициента разбавления.

Данные  $G'$  и  $\gamma$  для составов гидрогелей (после диализа) с постоянной общей концентрацией 30 мг/мл НА и шелка приведены в таблице 20.

**Таблица 20:** Вязкоупругие свойства гидрогелей с постоянной общей концентрацией

Образец	Концентрация НА.* (мг/мл)	НА MW (МДа)	Концентрация шелка.* (мг/мл)	MW шелка	% Шелка	$G'$ при 5 Гц (Па)	$\eta$ при 5 Гц (Па·с)
XHA15M01 SL17122002	23,52	1,5	0,48	Низкая	1%	94,1	4,52
XHA15M05 SL17112002	21,60	1,5	2,4	Низкая	5%	29,5	2,06
XHA15M20 SL17122102	14,40	1,5	9,6	Низкая	20%	31,7	1,63
XHA15M01 SM17121802	23,52	1,5	0,48	Средняя	1%	118,1	5,55
XHA15M05 SM17111602	21,60	1,5	2,4	Средняя	5%	38,4	2,35
XHA15M20	14,40	1,5	9,6	Средняя	20%	15,6	1,06

SM17112702							
XHA2M01 SL17112190 2	23,52	2,2	0,48	Низкая	1%	176,3	7,50
XHA2M05 SL17122002	21,60	2,2	2,4	Низкая	5%	85,1	4,03
XHA2M20 SL17122002	14,40	2,2	9,6	Низкая	20%	36,0	1,76
XHA2M01 SM17121902	23,52	2,2	0,48	Средняя	1%	158,1	6,69
XHA2M05 SM17122002	21,60	2,2	2,4	Средняя	5%	106,7	4,76
XHA2M20 SM17111302	14,40	2,2	9,6	Средняя	20%	11,5	0,86

\*: Гидрогель абсорбирова буфер PBS после диализа, что приводило к повышению объема. Концентрацию HA и шелка пересчитывали с учетом коэффициента разбавления.

Обратимость гидрогеля: Гидрогели с белком шелка и без него получали и подвергали диализу. Конечные композиции представляли собой 33,3 мг/мл HA+8 мг/мл шелка в случае гидрогеля шелк-HA и 33,3 мг/мл HA в случае гидрогеля HA, соответственно. 1 г ± 100 г полученных ранее гидрогелей добавляли в стеклянный флакон 20 мл, а затем 3 мл 16 ед./мл гиалуронидазы в 1-кратном PBS. Образцы инкубировали при 37°C в течение 3 дней. Контрольные образцы также подготавливали с использованием гидрогеля HA без добавления гиалуронидазы. Профиль деградации показан на фиг. 28. Контрольные образцы без гиалуронидазы не деградировали в течение 3 дней инкубации. В первые 6 часов инкубации гидрогели абсорбировали буфер и набухали, что приводило к повышению процента по массе. Гидрогель шелк-HA и гидрогель HA полностью деградировали через 3 дня инкубации. При наличии шелка гидрогель расщеплялся быстрее, чем чистый гидрогель HA. Через 12 часов инкубации фермент расщеплял приблизительно 90% гидрогеля шелк-HA.

Остаточный кросслинкер (BDDE): Образцы, указанные в таблице 19, тестировали на остаточный BDDE с использованием GC-FID от Millennium Research Laboratories, Inc. (MRL). В отчете о тесте MRL MRL18JAN06 указано, что остаточный BDDE во всех образцах был неопределимым, что соответствует критериям приемлемости, равным 2 м.д. или менее.

Плотность перекрестной сшивки: Образцы, указанные в таблице 19, дополнительно полностью расщепляли гиалуронидазой и анализировали с использованием ЯМР для определения плотности перекрестной сшивки в терминах процента модификации. Результаты теста приведены в таблице 21 (отчет о тесте MRL MRL18JAN07).

**Таблица 21:** Процентная степень модификации (плотность перекрестной сшивки) для различных составов

ID образца	MoD (%)
XHA15M00SX17110202 (C2)	2,87
XHA15M20SM17103002 (A)	4,68
XHA15M01SL17103002 (B)	2,58
XHA15M10SM17103002 (C)	3,02
XHA15M01SM17103002 (D)	2,54
XHA15M05SL17110202 (E)	3,76

Исследование на животных: 30-дневное исследование на животных с использованием модели на морских свинках осуществляли в WuXi AppTec Minneapolis, MN для решения проблем с безопасностью продукта. В исследовании было 2 момента прерывания, 7 дней и 30 дней, для оценки ответа ткани. Исследование приведено в отчете WuXi AppTec D28195 (Проект C19879). Для интрадермальной инъекции использовали два контрольных образца (Juvederm Ultra Plus и образец C2 в таблице 19) и 6 составов (образцы A-F в таблице 19). Образцы A-F и контрольный образец C2 стерилизовали паром (протокол 201707289) в Nelson Laboratories, LLC перед инъекцией. Краткое описание исследования: в этом исследовании использовали двадцать четыре животных, двенадцать на период. Каждому животному делали шесть дорзальных интрадермальных инъекций с использованием линейного способа (инъекцирования линии вместо боллуса): один контрольный участок на одной стороне от позвоночника, второй контрольный участок на противоположной стороне (при этом стороны назначали животным поочередно) и четыре тестовых участка с не более, чем одной инъекцией указанного тестового препарата (при этом правую и левую сторону назначали животным поочередно). Животных наблюдали ежедневно на всем протяжении исследования для оценки общего состояния здоровья. Животных гуманно умерщвляли в запланированные даты прекращения. Участки имплантации и окружающую ткань у всех животных вырезали, помещали в формалин и получали парафиновые блоки, затем осуществляя гистопатологический анализ. Типичные гистологические изображения и результаты патологического исследования приведены в таблице 22. В целом, не наблюдали признаков сепсиса или иммунного ответа в любом из участков имплантации.

**Таблица 22:** Гистопатологический анализ

Образцы	7 дней	30 дней
Коммерческий контроль	Фиг. 29	Фиг. 30
	Коммерческий продукт отмечен на обоих изображениях как синий/серый материал. Наблюдали слабое ассоциированное с	Коммерческий продукт отмечен на обоих изображениях как синий/серый материал. Через 30 дней наблюдали

	материалом гранулематозное воспаление через 7 дней.	минимальную степень воспаления с очень слабым фиброзом.
Продукт А: 24 мг/мл НА 9,6 мг/мл шелка	Фиг. 31 Наблюдали очень небольшое воспаление через 7 дней. Воспаление было фокальным, и иногда его трудно было найти. Не обнаруживали имплантируемый материал.	Фиг. 32 Через 30 дней воспаление было крайне трудно найти, и оно было минимальным. Не обнаруживали имплантируемый материал.
Продукт В: 24 мг/мл НА 0,48 мг/мл шелка	Фиг. 33 В случае продукта В наблюдали фокальное слабое воспаление через 7 дней. Воспаление являлось хроническим. Это воспаление требовало тщательной оценки для идентификации, т.к. оно являлось фокальным и минимальным. Не обнаруживали имплантируемый материал.	Фиг. 34 На 30-дневном изображении видно даже меньшее воспаление. Его было даже труднее обнаружить, чем по 7-дневные имплантаты. Не обнаруживали имплантируемый материал.
В целом, не было признаков сепсиса или иммунного ответа в любом из участков имплантации.		

Бактериальный эндотоксин: Из 7 составов, использованных в исследовании на животных (указанных в таблице 19), выбирали три образца после стерилизации (образец А, образец Е и образец С2) для тестирования на бактериальные эндотоксины. Для определения уровня эндотоксина использовали кинетический турбидиметрический способ. Результаты теста приведены в таблице 23 и были ниже критериев приемлемости 20 ЕЭ/мл (отчет об исследовании Nelson Labs 1006775-S01).

**Таблица 23:** Результаты тестирования на эндотоксин

ID образца	Определенный эндотоксин
ХНА15М20SM17103002 (А)	0,498 (ЕЭ/мл)
ХНА15М00SX17110202 (С2)	<0,400 (ЕЭ/мл)
ХНА15М05SL17110202 (Е)	1,56 (ЕЭ/мл)

Биосовместимость - Цитотоксичность: Из 7 составов, использованных в исследовании на животных (указанных в таблице 19) выбирали четыре образца после стерилизации (образец А, образец В, образец D и образец Е) для теста на цитотоксичность



ХНА15М05 SM17111602	21,60	1,5	2,4	Средняя	10%	BDD Е	38,4	2,35
ХНА15М05 SM18020802P	20,45	1,5	2,27	Средняя	10%	PEG- х	67,5	3,10
ХНА15М05 SM18020902P	19,28	1,5	2,14	Средняя	10%	PEG- х	73,5	3,40

\*: Гидрогель абсорбировал буфер PBS после диализа, что приводило к повышению объема. Концентрацию НА и шелка пересчитывали с учетом коэффициента разбавления.

### Пример 23: Исследование на животных С20419

Составы и характеристика образцов для исследования на животных С20419 приведены в таблице 25:

Таблица 25: Составы и характеристика образцов для исследования на животных С20419

Образец	ID	Кросс-инкер	Концентрация НА (мг/мл)	Концентрация шелка (мг/мл)	MW НА (Да)	MW шелка	G' при 5 Гц (Па)	$\eta$ при 5 Гц (Па·с)	Сила инъекции (Н)	MoD (%)	
Группа 1	C3	BD DE	XНА700K3M00SX180510	24	0	700K/3M	Неопр.	0,2	0,1	7,41	4,87
	G		XНА700K3M05SM180510	22,8	1,2	700K/3M	Средняя	3,8	0,2	8,17	4,54
	H		XНА700K3M01SL180510	23,76	0,24	700K/3M	Низкая	0	0,1	6,95	5,42
	I		XНА700K3M05SL180510	22,8	1,2	700K/3M	Низкая	0,5	0,1	7,96	6,23
	K		XНА26M05SM180510	22,8	1,2	2,6M	Средняя	0,1	0,1	8,48	2,51
Группа	C4	PE GD	PXНА700K3M00SX18051	24	0	700K/3M	Неопр.	52,3	2,4	16,19	15,14

2		4	Е								
	L	PXHA700K3 M05SM18051 4		22,8	1,2	700К /3М	Сред няя	31,8	1,6	12,96	10,97
	M	PXHA700K3 M01SL18051 4		23,76	0,24	700К /3М	Низка я	32,2	1,5	15,96	11,02
	N	PXHA700K3 M05SL18051 4		22,8	1,2	700К /3М	Низка я	51,9	2,1	17,82	11,23
	O	PXHA26M05 SM180514	22,8	1,2	2,6М	Сред няя	18,9	1,1	10,56	17,23	
Гру ппа 3	C5	Группа 2+свободная НА				700К /3М	Не опр.	63,0	2,8	19,02	8,02
	P					700К /3М	Сред няя	28,3	1,4	11,22	9,71
	Q					700К /3М	Низка я	42,7	1,9	16,80	10
	R					700К /3М	Низка я	83,9	3,2	20,90	10,12
	S					2,6М	Сред няя	75,8	3,4	12,78	11,92

На фиг. 37-46 показаны результаты исследования. Фиг. 37 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали контрольный дермальный филлер. Фиг. 38 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер НА по изобретению (24 мг/мл НА, перекрестно-сшитый PEGDE, образец С4 - таблица 25). Фиг. 39 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (22,8 мг/мл НА, 1,2 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец L - таблица 25). Фиг. 40 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (23,76 мг/мл НА, 0,24 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец М - таблица 25). Фиг. 41 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по



изобретению (22,8 мг/мл НА, 1,2 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец N - таблица 25). Фиг. 42 представляет собой типичное изображение гистологического среза интрадермальной области морской свинки, которой инъецировали дермальный филлер шелк-НА по изобретению (22,8 мг/мл НА, 1,2 мг/мл шелка, перекрестно-сшитый PEGDE, образец O - таблица 25).

Фиг. 43-46 являются графическими представлениями результатов гистологического исследования составов из таблицы 25 через 7 дней после имплантации (баллы: 0 - норма; 1 - минимальная; 2 - слабая; 3 - умеренная и 4 - тяжелая). Фиг. 43 является графиком, на котором показаны результаты гистологического анализа на деградацию геля через 7 дней после имплантации; перекрестно-сшитые BDDE составы деградировали сильнее всего. Фиг. 44 является графиком, на котором показаны результаты гистологического анализа на миграцию геля через 7 дней после имплантации. Фиг. 45 является графиком, на котором показаны результаты гистологического анализа на воспаление через 7 дней после имплантации; не наблюдали некроза тканей, не наблюдали свертывания крови и наблюдали минимальное накопление коллагена на контрольном составе и некоторых из тестовых составов. Фиг. 46 является графиком, на котором показаны результаты гистологического анализа на макрофаги через 7 дней после имплантации.

**Пример 24: Свойства перекрестно-сшитых PEGDE гидрогелей шелк-НА: 1) динамический модуль упругости при сдвиге ( $G'$ ) и 2) степень набухания во время диализа**

Получение дермального филлера, материалы: диглицидиловый простой эфир полиэтиленгликоля (PEGDE), Mn=500, Sigma-Aldrich; гиалуронат натрия (НА), Lifecore; шелк, 6% раствор, Silk Inc.; гидроксид натрия, 0,1 Н раствор, BDH; соляная кислота, 5 Н, Ricca Chemical; фосфатно-солевой буфер (PBS), 20-кратный, VWR Life Science.

Переменные составов дермальных филлеров: Молекулярная масса шелка: раствор (6%) шелка со средней и низкой MW; молекулярная масса НА: 700 кДа и 1,5 МДа; концентрация шелка (исходная): 0-15 мг/мл.

Перекрестная сшивка гидрогеля при высокой концентрации: добавляли 6% раствор шелка к 0,1 Н гидроксиду натрия; в полученный ранее раствор постепенно добавляли 100 мг/мл НА смешанной молекулярной массы (700 кДа/1,5 МДа=90/10) при осторожном перемешивании до полного растворения НА; в указанный выше раствор добавляли PEGDE; водяную баню нагревали до 40°C и поддерживали перекрестную сшивку на водяной бане в течение 45 минут; перекрестно-сшитому гелю позволяли охлаждаться до температуры ниже 30°C; добавляли 5 Н соляную кислоту к 1-кратному PBS, разбавляли гель до 40 мг/мл и корректировали конечный pH до 7,0-7,4.

Перекрестная сшивка гидрогеля при низкой концентрации: добавляли 6% раствор шелка к 0,1 Н гидроксиду натрия; в полученный ранее раствор постепенно добавляли 25 мг/мл НА массой 1,5 МДа при осторожном перемешивании до полного растворения НА; в указанный выше раствор добавляли PEGDE; водяную баню нагревали до 40°C и

поддерживали перекрестную сшивку на водяной бане в течение 45 минут; перекрестно-сшитому гелю позволяли охлаждаться до температуры ниже 30°C; к перекрестно-сшитому гелю добавляли 5 Н соляную кислоту и корректировали конечный pH до 7,0-7,4.

Диализ гидрогеля: гидратировали диализную кассету (20 кДа MWCO) в течение 2 минут; вытирали избыток воды и измеряли общую массу пустой кассеты; в диализную кассету добавляли приблизительно 18 г гидрогеля; измеряли общую массу кассету после внесения геля; суспендировали диализную кассету в 2 л 1-кратного буфера PBS и устанавливали магнитную мешалку на 200 об./мин.; через 72 ч. диализа собирали гель.

#### Вязкоупругие свойства

Для определения динамического модуля упругости ( $G'$ ) составов гидрогелей использовали гибридный реометр Discovery HR-1 (TA Instruments). Образцы тестировали, меняя частоту колебаний с 0,1 Гц до 10 Гц с 10 точками данных на десятичный интервал. Данные регистрировали и сравнивали при скорости сдвига 5 Гц.  $G'$  составов гидрогелей до и после диализа с постоянной концентрацией HA и переменной концентрацией шелка приведены на фиг. 47А и 47В. В случае гидрогеля, перекрестно-сшитого PEGDE при высокой исходной концентрации HA, влияние концентрации шелка на  $G'$  является минимальным из-за относительно низкого соотношения шелка и общей HA. Это также может быть связано со смешанной HA, содержащей 90% низкомолекулярной HA (700 кДа), нечувствительной к изменениям концентрации шелка. В случае гидрогеля, перекрестно-сшитого PEGDE при низкой исходной концентрации HA,  $G'$  повышался с повышением добавляемого в состав шелка. Изменения концентрации шелка оказывали больше влияния на  $G'$ , когда исходная концентрация HA была низкой, а также оказывали больше влияния на высокомолекулярную HA (1,5 МДа). Не наблюдали значительного влияния молекулярной массы шелка на  $G'$  в случае обоих способов перекрестной сшивки.

Степень набухания во время диализа: не наблюдали четкой тенденции, свидетельствовавшей о том, что количество шелка, добавляемого в состав гидрогеля, имело какое-либо влияние на набухание геля во время диализа в случае обоих способов перекрестной сшивки, и не наблюдали существенных различий между среднемолекулярным и низкомолекулярным шелком (фиг. 48А и 48В).

Концентрация шелка в составах гидрогеля имела минимальное влияние на  $G'$ , если смешанная HA была перекрестно-сшита PEGDE при высокой исходной концентрации HA, но была пропорциональна  $G'$ , если только высокомолекулярную HA перекрестно сшивали при низкой исходной концентрации HA. В случае разных молекулярных масс шелка в составах геля не наблюдали значимых различий при сравнении вклада в  $G'$  и набухание, если HA перекрестно-сшита PEGDE.

#### **Пример 25: Концентрация шелка в составах дермальных филлеров шелк-HA**

Материалы: шелк, 6% раствор, Silk Inc.; фосфатно-солевой буфер (PBS), 20-кратный, VWR Life Science; гель перекрестно-сшитой гиалуроновой кислоты (HA).

Оборудование: влагоанализатор HE53, Mettler Toledo; спектрофотометр Cary 100 UV/Vis.

Калибровочная стандартная кривая: измеряют содержание сухой массы для 6% растворов среднемолекулярного и низкомолекулярного шелка для определения фактического содержания сухой массы (мг/мл) в растворах шелка; получают серию стандартных растворов шелка посредством разведения 6% раствора шелка с использованием 1-кратного PBS (например, 1 мг/мл шелка, 0,75 мг/мл шелка, 0,5 мг/мл шелка, 0,25 мг/мл шелка и 0 мг/мл шелка); измеряют поглощение каждого стандартного раствора при 275 нм в кварцевой кювете - измерения поглощения можно осуществлять со сканированием при 200-800 нм, интервалом данных 5 нм и средним временем получения 0,1 секунд; строят график поглощения при 275 нм относительно концентрации шелка (мг/мл) для получения стандартной кривой.

Измерение концентрации шелка: разводят образцы геля НА 1-кратным PBS таким образом, что поглощение при 275 нм составляет от 0 до 1,0 (например, образцы можно разводить в соотношении 1:12 геля к 1-кратному PBS, т.е. разведение составляет 1200%); проводят сканирование поглощения образца геля шелк-НА относительно референсного 1-кратного PBS в области 200-800 нм, измеряют пик поглощения при 275 нм для каждого образца геля; сигналы поглощения для образцов геля корректируют по различиям между сигналами поглощения для образца без шелка и интерцепту калибровочной кривой, считая образец без шелка имеющим концентрацию шелка 0 мг/мл; концентрацию шелка в образцах геля шелк-НА можно вычислять с помощью калибровочной кривой и коэффициента разбавления.

Калибровочные кривые получали посредством измерения поглощения при 275 нм для серии стандартных образцов с разными концентрациями шелка в диапазоне от 0 мг/мл до 1 мг/мл. Калибровочные кривые для растворов среднемолекулярного и низкомолекулярного шелка приведены на фиг. 49А и 49В. Значения  $R^2$  0,99947 для среднемолекулярного шелка и 0,99949 для низкомолекулярного шелка свидетельствуют о том, что калибровочные кривые являются линейными в рабочем диапазоне концентрации шелка 0-1 мг/мл. Эти кривые можно использовать для определения концентраций шелка в образцах геля.

Определение концентрации шелка в гидрогелях НА-шелк: поглощение при 275 нм разведенных гидрогелей шелк-НА измеряли для каждого образца, как показано на фиг. 50А и 50В. Концентрацию шелка в каждом образце вычисляли с помощью калибровочной кривой и коэффициента разбавления, что приведено в таблице 26.

**Таблица 26.** Концентрации шелка для гелей шелк-НА с неизвестной концентрацией шелка, вычисленные с помощью калибровочной кривой

Образец геля	Теоретическая концентрация шелка (мг/мл)	Вычисленная концентрация шелка (мг/мл)
ХНА15М00SX17110 201	0	0
ХНА15М01SL171030	0,6	0,49

01		
XHA15M02SL171102	1,2	1,26
01		
XHA15M05SL171102	3	3,08
01		
XHA15M01SM17103	0,6	0,57
001		
XHA15M10SM17103	6	6,21
001		
XHA15M20SM17103	12	13,83
001		

**Пример 26: Составы дермальных филлеров шелк-НА: непрозрачность геля**

Материалы: гель перекрестно-сшитой гиалуроновой кислоты (НА); фосфатно-солевой буфер (PBS), 20-кратный, VWR Life Science.

Оборудование: Спектрофотометр Cary 100 UV/Vis.

Получение образцов: в чистую кварцевую кювету впрыскивали приблизительно 2 мл геля НА таким образом, чтобы достигать минимального количества пузырьков воздуха в образце; инъекция с использованием иглы 18G может помочь снизить количество пузырьков в образце; во вторую чистую кварцевую кювету можно добавлять пустой референсный образец с 1-кратным PBS (примечание: для измерений непрозрачности можно использовать пластиковую кювету, т.к. пластиковая кювета не имеет поглощения в видимом диапазоне, 400-800 нм).

Измерение непрозрачности геля: устанавливают диапазон X-сканирования от 200 нм до 800 нм с интервалом данных 5 нм и средним временем получения 0,1 секунд; выбирают Y-режим как %T для измерения пропускаемого света (примечание: также можно измерять поглощение и %T можно вычислять из значений поглощения); осуществляют сканирование образца геля относительно референсного стандарта 1-кратного PBS; данные можно сохранять в виде файла csv и строить график спектра.

Непрозрачность геля можно измерять с использованием спектрофотометра UV/Vis для стандартного пропускаемого света. Оптически прозрачный образец будет пропускать 100% света, в то время как немного мутный образец может пропускать лишь часть этого света. На фиг. 51 показано измерение мутности гидрогеля НА с шелком и без него. Синей кривой показан % прозрачности для пропускаемого света для образца геля шелк-НА с 3 мг/мл шелка и 26 мг/мл НА. Красной кривой показан пропускаемый свет для образца без шелка и с 20 мг/мл НА, и наблюдали больше пропускания света, чем в образце с шелком. Измерения мутности позволяют предполагать, что гель шелк-НА обладает способностью рассеивать видимый свет больше, чем гель НА без шелка.

**Пример 27: Степень модификации (MoD) гидрогеля НА, определяемая**

### посредством ЯМР

Степень модификации (MoD) определяют в виде стехиометрического соотношения всех связанных молекул кросслинкера и молей повторяющихся единиц НА. В MoD включают перекрестно-сшитые и моно-связанные линкеры. MoD определяют с помощью спектра  $^1\text{H}$  ЯМР, интегрируя сигнал от N-ацетильной группы в НА при 2,1 м.д. и кросслинкера BDDE при 1,7 м.д. или кросслинкера PEGDE при 3,0-4,5 м.д.

Перед ферментативной деградацией гидрогель НА сначала подвергали диализу против раствора PBS (1-кратного, 2 л  $\times$  5) для удаления свободного кросслинкера. Использовали диализную кассету Slide-A-Lyzer (MWCO 3,5K, Thermo Scientific, Rockford, IL) и раствор PBS перемешивали при RT в течение 72 ч. После диализа отбирали 1 мл раствора гидрогеля НА и лиофилизировали с помощью лиофилизатора Labconco FreeZone (2,5 л) для получения сухого порошка.

Для подготовки образца к ЯМР 10 мг сухого порошка помещали в пробирку для ЯМР (5 мм, Wilmad-LabGlass) и добавляли 0,6 мл раствора гиалуронидазы (MP Biomedicals, Solon, OH) в оксиде дейтерия ( $\text{D}_2\text{O}$ , Alfa Aesar, Ward Hill, MA). Количество гиалуронидазы составляло 5 ед. на 1 мг НА. Пробирку для ЯМР инкубировали при 37°C в течение ночи, чтобы вся НА деградировала. Спектры ЯМР регистрировали с помощью автоматизированной системы ЯМР 400 МГц Varian MR. Время релаксационной задержки составляет 1 сек, и количество сканирований составляет 256. Все данные обрабатывали с использованием программного обеспечения MestReNova (Edition 12.0.2).

#### Пример 28: 2-стадийный способ перекрестной сшивки шелк-НА

Гидрогель шелк-НА можно получать 2-стадийным способом перекрестной сшивки для улучшения эффективности связывания шелка с НА. Для указанного состава на первой стадии весь белок шелка и небольшую часть низкомолекулярной НА добавляют в раствор NaOH с pH 10, а затем проводят реакцию с частью кросслинкера. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, полагают, что на этой стадии с кросслинкером реагирует настолько много шелка, насколько это возможно. На второй стадии добавляют раствор NaOH для разведения продукта стадии 1 и повышают pH до 13. Затем в раствор добавляют оставшуюся низкомолекулярную НА, всю высокомолекулярную НА и оставшийся кросслинкер и завершают реакцию перекрестной сшивки.

#### Пример 29: Синтез гидрогеля НА

Гидрогель НА синтезировали с использованием разной молекулярной массы НА, кросслинкера, времени реакции, температуры реакции, концентрации НА, соотношения кросслинкера, способа смешивания и способа перемешивания. В таблицах 27 и 28 приведены различные используемые условия реакции и различные полученные гидрогели.

Таблица 27

MW НА	700 кДа, 1,5 МДа, 2,2 МДа, 3 МДа или смесь с разными MW в разных соотношениях
Кросслинкер	PEG500DE и BDDE

Время реакции	30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, или 240 мин
Температура реакции	40°C или 50°C
Концентрация НА	30 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, и 140 мг/мл
Доля кросслинкера	7% масс. или 10% масс.
Способ смешивания	Предварительное смешивание НА и кросслинкера или добавление кросслинкера в раствор НА частями
Перемешивание	С использованием механической мешалки и без нее

Таблица 28

Образец	НА/кросс линкер	Доля кросслинкера (% масс.)	Концентрация НА (мг/мл)	Смешивание	Перемешивание	Время реакции (мин)	Температура °C	G' (после диализа)	MoD (%)
PXHA2 M00SX 1804254 1	2,2M/PE G500DE	10	30	Частями	Да	30	40	163	13,0 2
PXHA2 M00SX 1804254 3	2,2M/PE G500DE	10	30	Частями	Да	60	40	106	9,55
PXHA2 M00SX 1804254 5	2,2M/PE G500DE	10	30	Частями	Да	120	40	95	11,7 3
PXHA2 M00SX 1804254 7	2,2M/PE G500DE	10	30	Частями	Да	240	40	10,6	15,6
PXHA2 M00SX 1805104 1	2,2M/PE G500DE	10	30	За один раз	Нет	30	40	148,67	5,3
PXHA2	2,2M/PE	10	30	За	Нет	60	40	134,61	7,88

M00SX 1805104 3	G500DE			один раз					
PXHA2 M00SX 1805104 5	2,2M/PE G500DE	10	30	За один раз	Нет	120	40	46,53	9,44
PXHA2 M00SX 1805104 7	2,2M/PE G500DE	10	30	За один раз	Нет	240	40	28,9	11,2
BXHA7 00K00S X 1805014 1	700K/BD DE	10	30	По капля м	Да	30	40	42	0
BXHA7 00K00S X 1805014 3	700K/BD DE	10	30	По капля м	Да	60	40	38	0
BXHA7 00K00S X 1805014 5	700K/BD DE	10	30	По капля м	Да	120	40	15	0,54
PXHA2 M00SX 1805164 1	2,2M/PE G500DE	10	30	За один раз/в течени е ночи	Нет	30	40	182,91	4,62
PXHA2 M00SX 1805164	2,2M/PE G500DE	10	30	За один раз/в	Нет	60	40	129,76	8,87

3				течени е ночи					
BXHA7 00K00S X 1805294 1	700K/BD DE	10	30	Частя ми	Нет	30	40	17,99	0
BXHA7 00K00S X 1805294 3	700K/BD DE	10	30	Частя ми	Нет	60	40	33,76	0,48
BXHA2 M00SX 1805294 1	2,2M/BD DE	10	30	Частя ми	Нет	30	40	295,6	0,52
BXHA2 M00SX 1805294 3	2,2M/BD DE	10	30	Частя ми	Нет	60	40	222,28	0,66
BXHA1 5M00S X 1806085 1	1,5M/BD DE	10	90	Смеш ивали раздел ьно	Нет	30	50	261,76	3,26
BXHA1 5M00S X 1806085 3	1,5M/BD DE	10	90	Смеш ивали раздел ьно	Нет	60	50	196,8	3,4
BXHA1 5M00S X 1806085	1,5M/BD DE	10	90	Смеш ивали раздел ьно	Нет	90	50	93,6	4,84



5									
BXHA1 5M00S X 1806085 7	1,5M/BD DE	10	90	Смеш ивали раздел ьно	Нет	120	50	72,98	4,51
PXHA1 5M00S X 1806135 1	1,5M/PE GDE	10	90	Смеш ивали раздел ьно	Нет	30	50	151,65	Прет ерпе вает
PXHA1 5M00S X 1806135 1	1,5M/PE GDE	10	90	Смеш ивали раздел ьно	Нет	60	50	71,87	Прет ерпе вает
BXHA1 5M00S X 1806155 1	1,5M/BD DE	10	100	За один раз	Нет	30	50	234,69	4,6
BXHA1 5M00S X 1806155 3	1,5M/BD DE	10	100	За один раз	Нет	60	50	219,43	6,1
BXHA3 M00SX 1806195 1	3M/BDD E	10	100	За один раз	Нет	60	50	268,41	Прет ерпе вает
BXHA3 M00SX 1806195 3	3M/BDD E	7	100	За один раз	Нет	60	50	189,13	Прет ерпе вает

Все патенты, патентные заявки и опубликованные ссылки, процитированные в

настоящем описании, включены в него, таким образом, в качестве ссылок в полном объеме. Хотя способы по настоящему изобретению описаны в свете конкретных вариантов осуществления, следует понимать, что их можно дополнительно модифицировать. Кроме того, настоящая заявка должна охватывать любые варианты, применение или адаптации способов по настоящему изобретению, включая отклонения от настоящего описания, проистекающие из общеизвестной или общепринятой практики в области, к которой относятся способы по настоящему изобретению.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биосовместимый тканевой филлер, содержащий гиалуроновую кислоту (НА) и анестезирующее средство, где часть НА модифицируют с помощью одной или более линкерных молекул, содержащих одно или более из алкановой или алкильной цепи, эфирной группы и вторичного спирта, где линкерные молекулы присоединяют к НА на одном конце линкера.

2. Тканевой филлер по п.1, где модификацию осуществляют с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства.

3. Тканевой филлер по п.1 или 2, имеющий степень модификации (MoD) приблизительно 10,0%, приблизительно 10,1%, приблизительно 10,2%, приблизительно 10,3%, приблизительно 10,4%, приблизительно 10,5%, приблизительно 10,6%, приблизительно 10,7%, приблизительно 10,8%, приблизительно 10,9%, приблизительно 11,0%, приблизительно 11,1%, приблизительно 11,2%, приблизительно 11,3%, приблизительно 11,4%, приблизительно 11,5%, приблизительно 11,6%, приблизительно 11,7%, приблизительно 11,8%, приблизительно 11,9%, приблизительно 12,0%, приблизительно 12,1%, приблизительно 12,2%, приблизительно 12,3%, приблизительно 12,4%, приблизительно 12,5%, приблизительно 12,6%, приблизительно 12,7%, приблизительно 12,8%, приблизительно 12,9%, приблизительно 13,0%, приблизительно 13,1%, приблизительно 13,2%, приблизительно 13,3%, приблизительно 13,4%, приблизительно 13,5%, приблизительно 13,6%, приблизительно 13,7%, приблизительно 13,8%, приблизительно 13,9%, приблизительно 14,0%, приблизительно 14,1%, приблизительно 14,2%, приблизительно 14,3%, приблизительно 14,4%, приблизительно 14,5%, приблизительно 14,6%, приблизительно 14,7%, приблизительно 14,8%, приблизительно 14,9%, приблизительно 15,0%, приблизительно 15,1%, приблизительно 15,2%, приблизительно 15,3%, приблизительно 15,4%, приблизительно 15,5%, приблизительно 15,6%, приблизительно 15,7%, приблизительно 15,8%, приблизительно 15,9%, приблизительно 16,0%, приблизительно 16,1%, приблизительно 16,2%, приблизительно 16,3%, приблизительно 16,4%, приблизительно 16,5%, приблизительно 16,6%, приблизительно 16,7%, приблизительно 16,8%, приблизительно 16,9%, приблизительно 17,0%, приблизительно 17,1%, приблизительно 17,2%, приблизительно 17,3%, приблизительно 17,4%, приблизительно 17,5%, приблизительно 17,6%, приблизительно 17,7%, приблизительно 17,8%, приблизительно 17,9%, приблизительно 18,0%, приблизительно 18,1%, приблизительно 18,2%, приблизительно 18,3%, приблизительно 18,4%, приблизительно 18,5%, приблизительно 18,6%, приблизительно 18,7%, приблизительно 18,8%, приблизительно 18,9%, приблизительно 19,0%, приблизительно 19,1%, приблизительно 19,2%, приблизительно 19,3%, приблизительно 19,4%, приблизительно 19,5%, приблизительно 19,6%, приблизительно 19,7%, приблизительно 19,8%, приблизительно 19,9% или приблизительно 20,0%.

4. Тканевой филлер по любому из пп.1-3, где количество модифицированной НА в



приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%,  
 приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%,  
 приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%,  
 приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%,  
 приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%,  
 приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%,  
 приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%,  
 приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%,  
 приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%,  
 приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%,  
 приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%,  
 приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%,  
 приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%,  
 приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%,  
 приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%,  
 приблизительно 99% или приблизительно 100%.

7. Тканевой филлер по любому из пп.1-6, где степень перекрестной сшивки перекрестно-сшитой НА составляет от приблизительно 1% до приблизительно 15%.

8. Тканевой филлер по любому из пп.1-7, где модифицированная или перекрестно-сшитая НА содержит линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую цепь полиэтиленгликоля (PEG).

9. Тканевой филлер по любому из пп.1-8, где перекрестно-сшивающее средство и/или перекрестно-сшивающий предшественник содержит эпокси-группу.

10. Тканевой филлер по любому из пп.1-9, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства, перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера, диэпокси-линкера, полиэпокси-PEG, диэпокси-PEG, полиглицидил-PEG, диглицидил-PEG, полиакрилат-PEG, диакрилат-PEG, 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокси)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана, карбодиимида и любых их комбинаций.

11. Тканевой филлер по любому из пп.1-9, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием полифункционального эпокси-соединения, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), диглицидилового простого эфира этиленгликоля (EGDGE), диглицидилового простого эфира 1,6-гександиола, диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля,

диглицидилового простого эфира полипропиленгликоля, диглицидилового простого эфира политетраметиленгликоля, диглицидилового простого эфира неопентилгликоля, полиглицидилового простого эфира полиглицерина, полиглицидилового простого эфира диглицерина, полиглицидилового простого эфира глицерина, полиглицидилового простого эфира три-метилолпропана, полиглицидилового простого эфира пентаэритрита и полиглицидилового простого эфира сорбита.

12. Тканевой филлер по любому из пп.1-9, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диэпокси-PEG, диглицидилового простого эфира PEG, бис-глицидилового простого эфира полиоксиэтилена, PEGDE и PEGDGE.

13. Тканевой филлер по любому из пп.1-9, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, имеющего среднюю  $M_n$  приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000 или приблизительно 6000.

14. Тканевой филлер по любому из пп.1-9, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, содержащего от приблизительно 2 до приблизительно 25 групп этиленгликоля.

15. Тканевой филлер по любому из пп.1-9, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием перекрестно-сшивающего средства и/или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера из фиброина шелка, диэпокси-линкера из фиброина шелка, полиэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, диэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фиброина шелка, диглицидил-линкера из фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка и диглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка.

16. Тканевой филлер по любому из пп.1-15, дополнительно содержащий органическое соединение и/или неорганическое соединение.

17. Тканевой филлер по п.16, где неорганическое соединение содержит гидроксиапатит кальция.

18. Тканевой филлер по п.17, где гидроксиапатит кальция составляют в виде частиц, имеющих диаметр от приблизительно 1 мкм до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 1 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 2 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 3 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 4 мкм до приблизительно 15 мкм, от приблизительно 8 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 10 мкм, от приблизительно 6 мкм до приблизительно 12 мкм, от приблизительно 7 мкм до приблизительно 20 мкм, от приблизительно 9 мкм до приблизительно 18 мкм или от

приблизительно 10 мкм до приблизительно 25 мкм.

19. Тканевой филлер по п.17 или 18, где концентрация гидроксиапатита кальция составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 5%.

20. Тканевой филлер по любому из пп.17-19, где концентрация гидроксиапатита кальция составляет приблизительно 0,001%, приблизительно 0,002%, приблизительно 0,003%, приблизительно 0,004%, приблизительно 0,005%, приблизительно 0,006%, приблизительно 0,007%, приблизительно 0,008%, приблизительно 0,009%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,011%, приблизительно 0,012%, приблизительно 0,013%, приблизительно 0,014%, приблизительно 0,015%, приблизительно 0,016%, приблизительно 0,017%, приблизительно 0,018%, приблизительно 0,019% или приблизительно 0,02%.

21. Тканевой филлер по любому из пп.17-19, где концентрация гидроксиапатита кальция составляет приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,15%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,25%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,35%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,45%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,55%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,65%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,75%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,85%, приблизительно 0,9%, приблизительно 0,95%, приблизительно 1%, приблизительно 1,05%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,15%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,25%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,35%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,45%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,55%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,65%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,75%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,85%, приблизительно 1,9%, приблизительно 1,95% или приблизительно 2%.

22. Тканевой филлер по п.16, где органическое соединение содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, L-пролина, аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина.

23. Тканевой филлер по любому из пп.1-22, где НА получают из бактерий *Streptococcus* или бактерий *Bacillus subtilis*.

24. Тканевой филлер по любому из пп.1-23, где активное средство является лидокаином.

25. Тканевой филлер по любому из пп.1-24, где концентрация активного средства в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 5%.

26. Тканевой филлер по п.24, где концентрация лидокаина в тканевом филлере составляет приблизительно 0,3%.

27. Тканевой филлер по любому из пп.1-26, где тканевой филлер представляет собой гель.

28. Тканевой филлер по любому из пп.1-27, где тканевой филлер представляет

собой гидрогель.

29. Тканевой филлер по любому из пп.1-28, где тканевой филлер дополнительно содержит воду.

30. Тканевой филлер по любому из пп.1-29, где общая концентрация НА в тканевом филлере составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл.

31. Тканевой филлер по любому из пп.1-30, где общая концентрация НА в тканевом филлере составляет приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл или приблизительно 30 мг/мл.

32. Тканевой филлер по любому из пп.1-31, где концентрация модифицированной или перекрестно-сшитой НА в тканевом филлере составляет от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл.

33. Тканевой филлер по любому из пп.1-32, где концентрация модифицированной или перекрестно-сшитой НА в тканевом филлере составляет приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, приблизительно 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 22 мг/мл, приблизительно 23 мг/мл, приблизительно 24 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 26 мг/мл, приблизительно 27 мг/мл, приблизительно 28 мг/мл, приблизительно 29 мг/мл или приблизительно 30 мг/мл.

34. Тканевой филлер по любому из пп.1-33, дополнительно содержащий белок шелка или фрагменты белка шелка (SPF).

35. Тканевой филлер по п.34, где белок шелка является фиброином шелка.

36. Тканевой филлер по п.34 или 35, где белок шелка является фиброином шелка, по существу, не содержащим серицин.

37. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1 кДа до приблизительно 250 кДа.

38. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 5 кДа до приблизительно 150 кДа.

39. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 6 кДа до приблизительно 17 кДа.

40. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют среднюю средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 17 кДа до приблизительно 39 кДа.

41. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют среднюю



средневзвешенную молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 39 кДа до приблизительно 80 кДа.

42. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют низкую молекулярную массу.

43. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют среднюю молекулярную массу.

44. Тканевой филлер по любому из пп.34-36, где SPF имеют высокую молекулярную массу.

45. Тканевой филлер по любому из пп.34-44, где фрагменты белка шелка (SPF) имеют полидисперсность от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,0.

46. Тканевой филлер по любому из пп.34-45, где SPF имеют степень кристалличности до 60%.

47. Тканевой филлер по любому из пп.34-46, где часть SPF является модифицированной или перекрестно-сшитой.

48. Тканевой филлер по п.47, где количество модифицированных или перекрестно-сшитых SPF в % масс./масс. относительно общего количества SPF составляет приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17%, приблизительно 18%, приблизительно 19%, приблизительно 20%, приблизительно 21%, приблизительно 22%, приблизительно 23%, приблизительно 24%, приблизительно 25%, приблизительно 26%, приблизительно 27%, приблизительно 28%, приблизительно 29%, приблизительно 30%, приблизительно 31%, приблизительно 32%, приблизительно 33%, приблизительно 34%, приблизительно 35%, приблизительно 36%, приблизительно 37%, приблизительно 38%, приблизительно 39%, приблизительно 40%, приблизительно 41%, приблизительно 42%, приблизительно 43%, приблизительно 44%, приблизительно 45%, приблизительно 46%, приблизительно 47%, приблизительно 48%, приблизительно 49%, приблизительно 50%, приблизительно 51%, приблизительно 52%, приблизительно 53%, приблизительно 54%, приблизительно 55%, приблизительно 56%, приблизительно 57%, приблизительно 58%, приблизительно 59%, приблизительно 60%, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%,



приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%, приблизительно 11%, приблизительно 12%, приблизительно 13%, приблизительно 14% и приблизительно 15%.

53. Тканевой филлер по любому из пп.47-52, где модифицированные или перекрестно-сшитые SPF содержат линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую алкановую или алкильную цепь и/или простую эфирную группу, где линкер или перекрестно-сшивающую молекулу присоединяют к SPF на одном конце линкера или перекрестно-сшивающей молекулы.

54. Тканевой филлер по любому из пп.47-53, где модифицированные или перекрестно-сшитые SPF содержат линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую цепь полиэтиленгликоля (PEG).

55. Тканевой филлер по любому из пп.47-54, где модифицированные или перекрестно-сшитые SPF содержат линкер или перекрестно-сшивающую молекулу, содержащую вторичный спирт.

56. Тканевой филлер по любому из пп.47-55, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства, модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства.

57. Тканевой филлер по п.56, где модифицирующее или перекрестно-сшивающее средство и/или модифицирующий или перекрестно-сшивающий предшественник содержит эпокси-группу.

58. Тканевой филлер по любому из пп.47-57, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства, модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника или активирующего средства, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера, диэпокси-линкера, полиэпокси-PEG, диэпокси-PEG, полиглицидил-PEG, диглицидил-PEG, полиакрилат-PEG, диакрилат-PEG, 1,4-бис(2,3-эпоксипропокс)бутана, 1,4-бисглицидилоксибутана, дивинилсульфона (DVS), диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), УФ-излучения, глутаральдегида, 1,2-бис(2,3-эпоксипропокс)этилена (EGDGE), 1,2,7,8-диэпоксиоктана (DEO), бискарбодиимида (BCDI), тетраглицидилового простого эфира пентаэритрита (PETGE), дигидразида адипиновой кислоты (ADH), бис(сульфосукцинимидил)суберата (BS), гексаметилендиамина (HMDA), 1-(2,3-эпоксипропил)-2,3-эпоксициклогексана, карбодиимида и любых их комбинаций.

59. Тканевой филлер по любому из пп.47-57, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием полифункционального эпокси-соединения, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира 1,4-бутандиола (BDDE), диглицидилового простого эфира этиленгликоля (EGDGE), диглицидилового простого эфира 1,6-гександиола, диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диглицидилового простого эфира полипропиленгликоля, диглицидилового простого эфира политетраметиленгликоля, диглицидилового простого эфира неопентилгликоля, полиглицидилового простого эфира полиглицерина, полиглицидилового простого эфира

диглицерина, полиглицидилового простого эфира глицерина, полиглицидилового простого эфира три-метилолпропана, полиглицидилового простого эфира пентаэритрита и полиглицидилового простого эфира сорбита.

60. Тканевой филлер по любому из пп.47-57, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства и/или модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, диэпокси-PEG, диглицидилового простого эфира PEG, бис-глицидилового простого эфира полиоксиэтилена, PEGDE и PEGDGE.

61. Тканевой филлер по любому из пп.47-57, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, имеющего среднюю  $M_n$  приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000 или приблизительно 6000.

62. Тканевой филлер по любому из пп.47-57, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием диглицидилового простого эфира полиэтиленгликоля, содержащего от приблизительно 2 до приблизительно 25 групп этиленгликоля.

63. Тканевой филлер по любому из пп.47-57, где модификации или перекрестной сшивки достигают с использованием модифицирующего или перекрестно-сшивающего средства и/или модифицирующего или перекрестно-сшивающего предшественника, выбранного из группы, состоящей из полиэпокси-линкера из фиброина шелка, диэпокси-линкера из фиброина шелка, полиэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, диэпокси-линкера из фрагмента фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фиброина шелка, диглицидил-линкера из фиброина шелка, полиглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка и диглицидил-линкера из фрагмента фиброина шелка.

64. Тканевой филлер по любому из пп.47-63, где часть SPF перекрестно сшита с НА.

65. Тканевой филлер по любому из пп.47-64, где часть SPF перекрестно сшита с SPF

66. Тканевой филлер по любому из пп.47-65, где тканевой филлер представляет собой гель.

67. Тканевой филлер по любому из пп.47-66, где тканевой филлер представляет собой гидрогель.

68. Тканевой филлер по любому из пп.47-67, где тканевой филлер дополнительно содержит воду.

69. Тканевой филлер по любому из пп.47-68, где общая концентрация SPF в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл.

70. Тканевой филлер по любому из пп.47-69, где общая концентрация SPF в тканевом филлере составляет приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл,

приблизительно 2,5 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 3,5 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 4,5 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 5,5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 6,5 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 7,5 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 8,5 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 9,5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 10,5 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 11,5 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 12,5 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 13,5 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 14,5 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл.

71. Тканевой филлер по любому из пп.47-70, где концентрация модифицированных или перекрестно-сшитых SPF в тканевом филлере составляет от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 15 мг/мл.

72. Тканевой филлер по любому из пп.47-71, где концентрация модифицированных или перекрестно-сшитых SPF в тканевом филлере составляет приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,5 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 3,5 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 4,5 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 5,5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 6,5 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 7,5 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 8,5 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 9,5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 10,5 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 11,5 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 12,5 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 13,5 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 14,5 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл.

73. Тканевой филлер по любому из пп.1-72, где тканевой филлер является дермальным филлером.

74. Тканевой филлер по любому из пп.1-73, где тканевой филлер является биodeградируемым.

75. Тканевой филлер по любому из пп.1-74, где тканевой филлер является инъекируемым.

76. Тканевой филлер по любому из пп.1-75, где тканевой филлер имеет динамический модуль упругости ( $G'$ ) от приблизительно 25 Па до приблизительно 1500 Па.

77. Тканевой филлер по любому из пп.1-76, где тканевой филлер имеет динамический модуль упругости ( $G'$ ) приблизительно 25 Па, приблизительно 26 Па, приблизительно 27 Па, приблизительно 28 Па, приблизительно 29 Па, приблизительно 30 Па, приблизительно 31 Па, приблизительно 32 Па, приблизительно 33 Па, приблизительно 34 Па, приблизительно 35 Па, приблизительно 36 Па, приблизительно 37 Па, приблизительно 38 Па, приблизительно 39 Па, приблизительно 40 Па, приблизительно 41 Па, приблизительно 42 Па, приблизительно 43 Па, приблизительно 44 Па, приблизительно



84. Тканевой филлер по п.82 или 83, где комплексную вязкость измеряют посредством колебательного напряжения от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 Гц.

85. Тканевой филлер по любому из пп.82-84, где комплексную вязкость измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 1 Гц.

86. Тканевой филлер по любому из пп.82-84, где комплексную вязкость измеряют посредством колебательного напряжения приблизительно 5 Гц.

87. Способ лечения состояния у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества тканевого филлера по любому из пп.1-86.

88. Способ по п.87, где состояние является состоянием кожи.

89. Способ по п.88, где состояние кожи выбрано из группы, состоящей из дегидратации кожи, недостатка эластичности кожи, огрубления кожи, недостатка натяжения кожи, растяжек на коже, бледности кожи, впадин на коже, впалых щек, тонких губ, ретроорбитального дефекта, складок на лице и морщин.

90. Способ косметического лечения у нуждающегося в этом индивидуума, включающий введение индивидууму эффективное количество тканевого филлера по любому из пп.1-86.

91. Способ по любому из пп.87-90, где тканевой филлер вводят в область дермы индивидуума.

92. Способ по любому из пп.87-91, где способ представляет собой аугментацию, реконструкцию, лечение заболевания, лечение нарушения, коррекцию дефекта или несовершенства части или области тела.

93. Способ по любому из пп.87-92, где способ представляет собой аугментацию лица, реконструкцию лица, лечение заболевания лица, лечение лицевого нарушения, лечение лицевого дефекта или лечение несовершенства лица.

94. Способ по любому из пп.87-93, где тканевой филлер устойчив к биодеградации, биоэрозии, биоабсорбции и/или биорезорбции в течение по меньшей мере приблизительно 3 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 21 дня, приблизительно 28 дней, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев.

95. Способ по любому из пп.87-94, где введение тканевого филлера индивидууму приводит к сниженному воспалительному ответу по сравнению с воспалительным ответом, индуцируемым контрольным тканевым филлером, содержащим полисахарид и лидокаин, где контрольный тканевой филлер не включает фрагменты белка шелка (SPF).

96. Способ по любому из пп.87-95, где введение тканевого филлера индивидууму приводит к повышенной продукции коллагена по сравнению с продукцией коллагена, индуцируемой контрольным тканевым филлером, содержащим полисахарид и лидокаин, где контрольный тканевой филлер не включает фрагменты белка шелка (SPF).

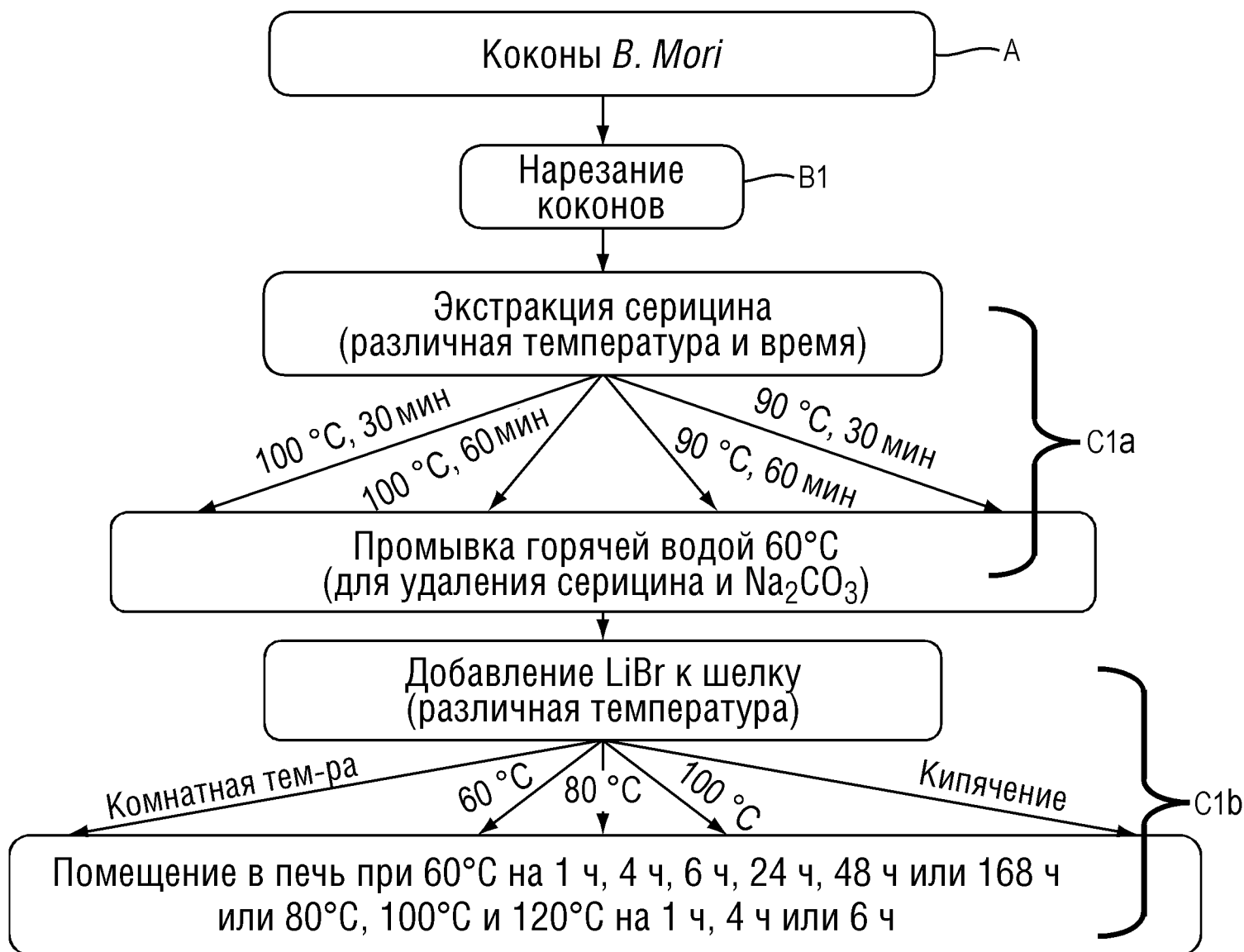
По доверенности

ФИГ.1





ФИГ.2



ФИГ.3

Концентрация бромида лития и карбоната натрия  
в растворах белка шелка

ID образца	Описание образца	Средняя концентрация Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (м.д.)	Средняя концентрация LiBr (м.д.)
A	TFF 5 кДа	32.13	90.85
B	TFF 10 кДа	42.91	107
C	TFF 10 кДа	49.06	78.55
D	STI 1(TFF-10-0019)	2.17	129.07
E	STI 2(TFF-10-0033)	2.63	196.2
F	STI 3(TFF-10-0034)	4.18	248.93

3/55

Способ: Экстракция при 100°C в течение 60 мин, промывка при 60°C, LiBr 100°C в печи при 100°C в течение 60 мин. Примечательно, что TFF можно осуществлять в течение большего периода времени и/или при разных скоростях потока (которую варьировали между A-C и D-F) для изменения м.д. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и LiBr

ФИГ.4

Содержание бромида лития и карбоната натрия в растворах белка шелкам

ID образца	Объем раствора, эквивалентный (X) пленок	Масса образца (мг)	Концентрация	
			Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	LiBr
1	6	0.171	ND	ND
2	8	0.228	ND	ND
3	10	0.285	ND	ND
4	12	0.342	ND	ND
5	Чистый	-	ND	ND

4/55

\*ND=Не определено

Способ: кипячение при 100°C в течение 60 мин, LiBr в печи при 60°C в течение 4-6 часов

ФИГ.5

Содержание бромида лития и карбоната натрия в растворах  
белка шелкам

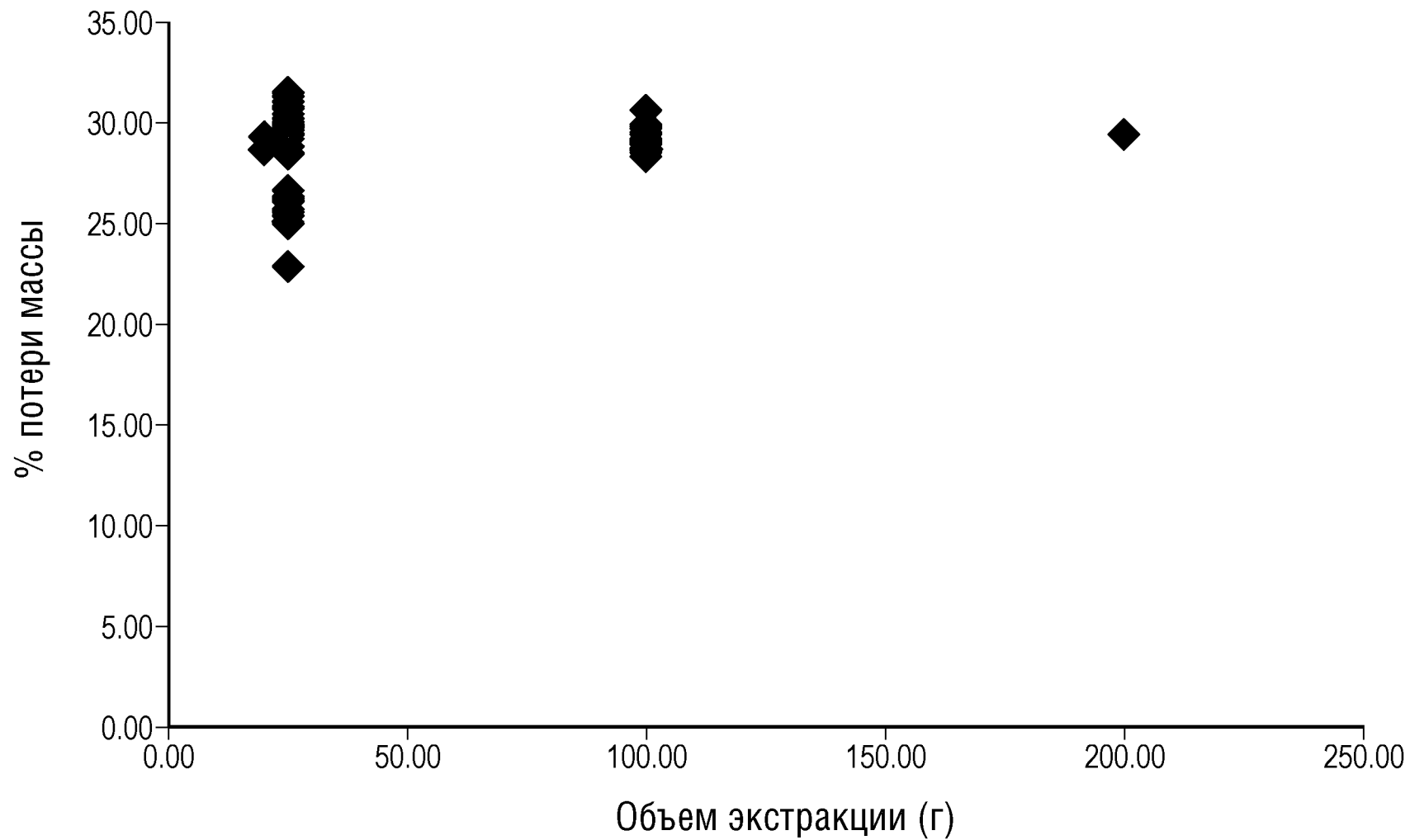
ID образца	Описание образца	Mn	Mw	Полидисперсность (PD) (Mn/Mw)
A	TFF 5 кДа	14,497	33,874	2.3366
B	TFF 10 кДа	14,542	33,455	2.3006
C	TFF 10 кДа	14,972	34,026	2.2726
D	Раствор белка шелка в воде	12,055	26,531	2.2008

Способ:

TFF: Экстракция при 100°C в течение 60 мин, промывка при 60°C, LiBr 100°C в печи при 100°C в течение 60 мин.

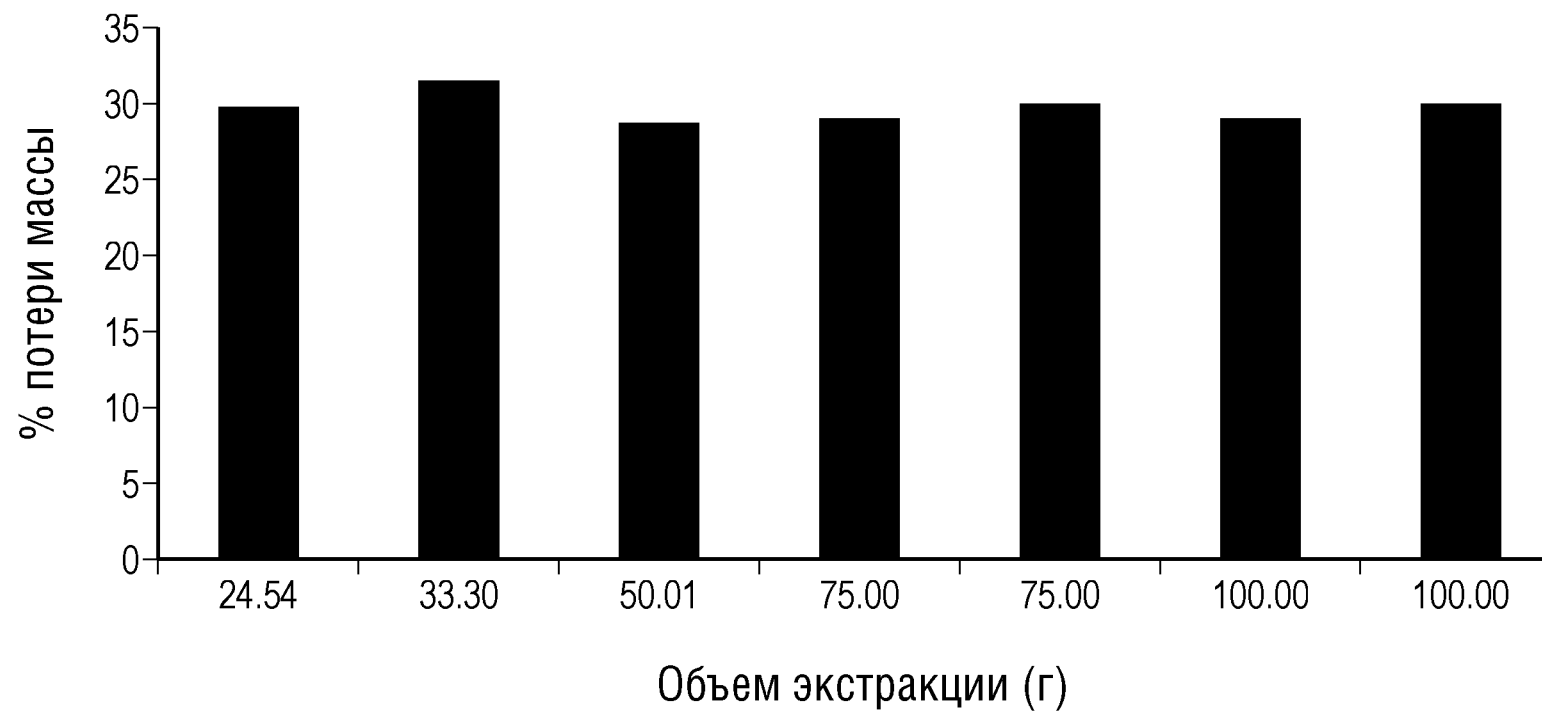
Белок шелка: Экстракция при 100°C в течение 20 мин, промывка при RT, LiBr в печи при 60°C в течение 4-6 часов

ФИГ.6



ФИГ.7

### Объем экстракции относительно % потери массы



7/55

ФИГ.8

Образец	LiBr (M)	Средняя MW	PD
STI 1(TFF-10-0019)	9.3	15727	2.033
STI 2(TFF-10-0033)	9.3	24587	2.3669
STI 3(TFF-10-0034)	9.3	25273	2.338
STI 9.3 M средн.		21862	2.25
STI 1(TFF-10-0031)	~7.5	29645	3.0868
STI 2(TFF-10-0030)	~7.5	26856	2.9748
STI 7.5M средн.		28250.5	3.0308

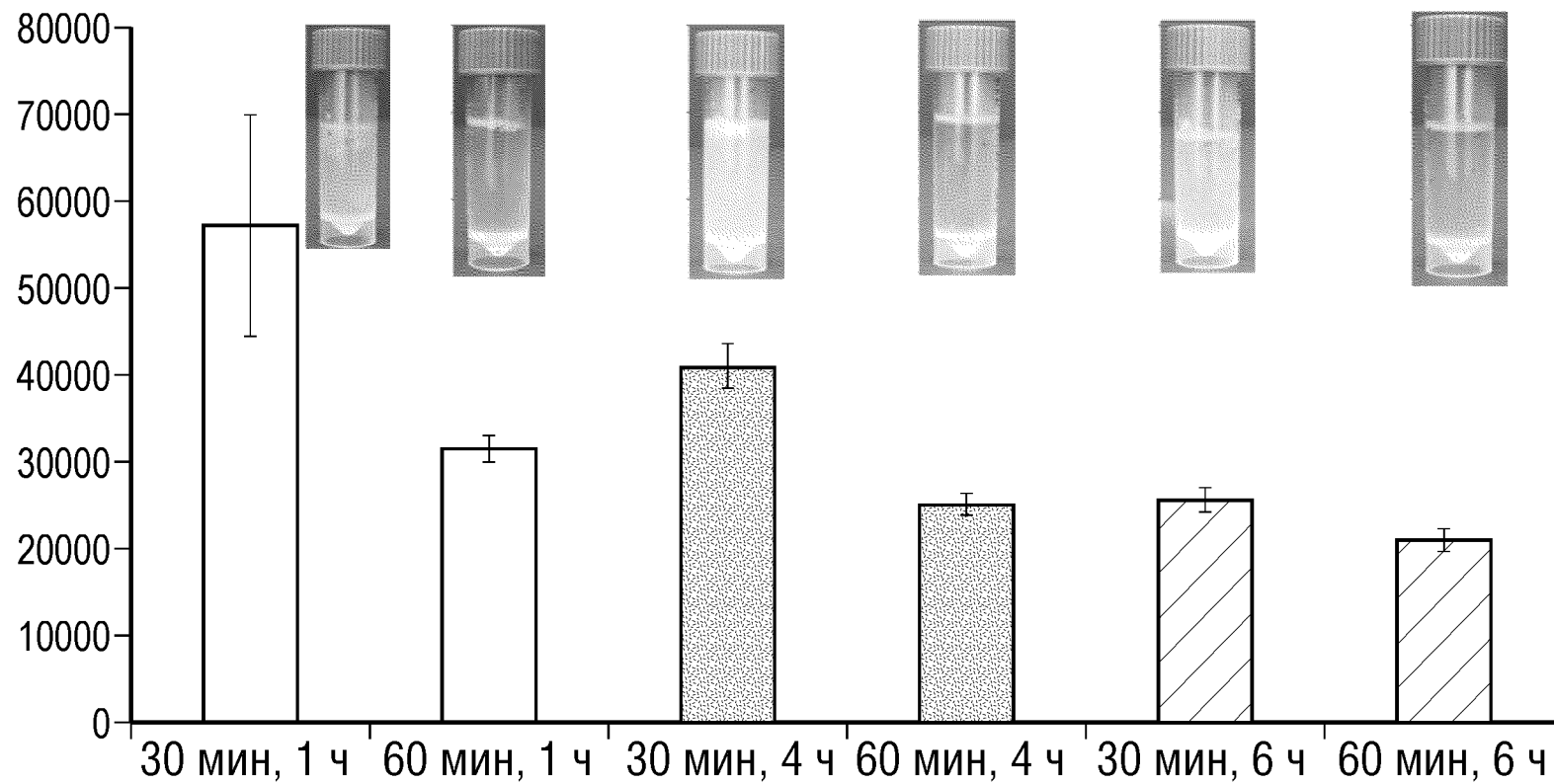
\* TFF-10-0019 из экстракции 225 г/разведения 35 г

\* TFF-10-0034 из экстракции 100 г/разведения 17-35 г

\* TFF-10-0033 из экстракции 100 г/разведения 100 г

ФИГ.9

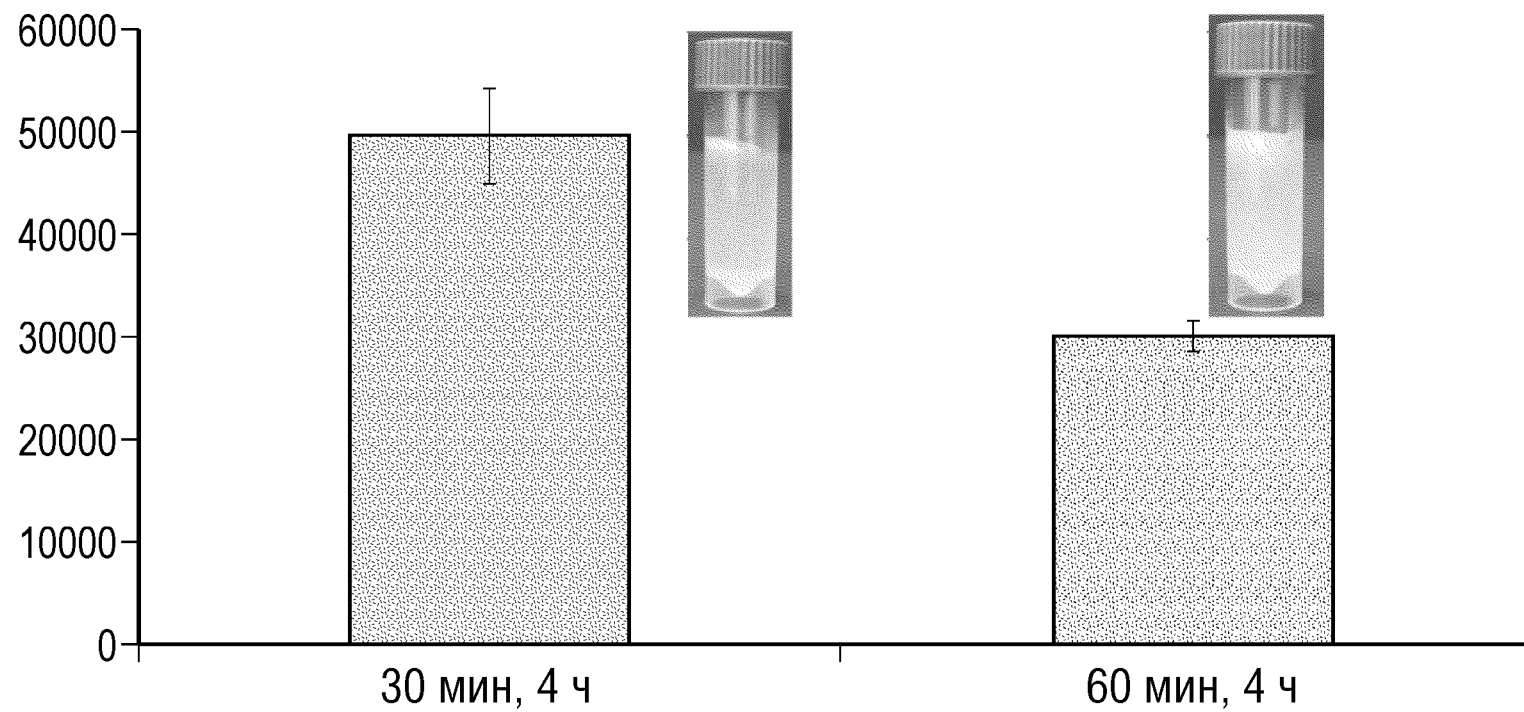
30 мин относительно 60 мин: кипячение при 100°C, LiBr 100°C, печь 100°C





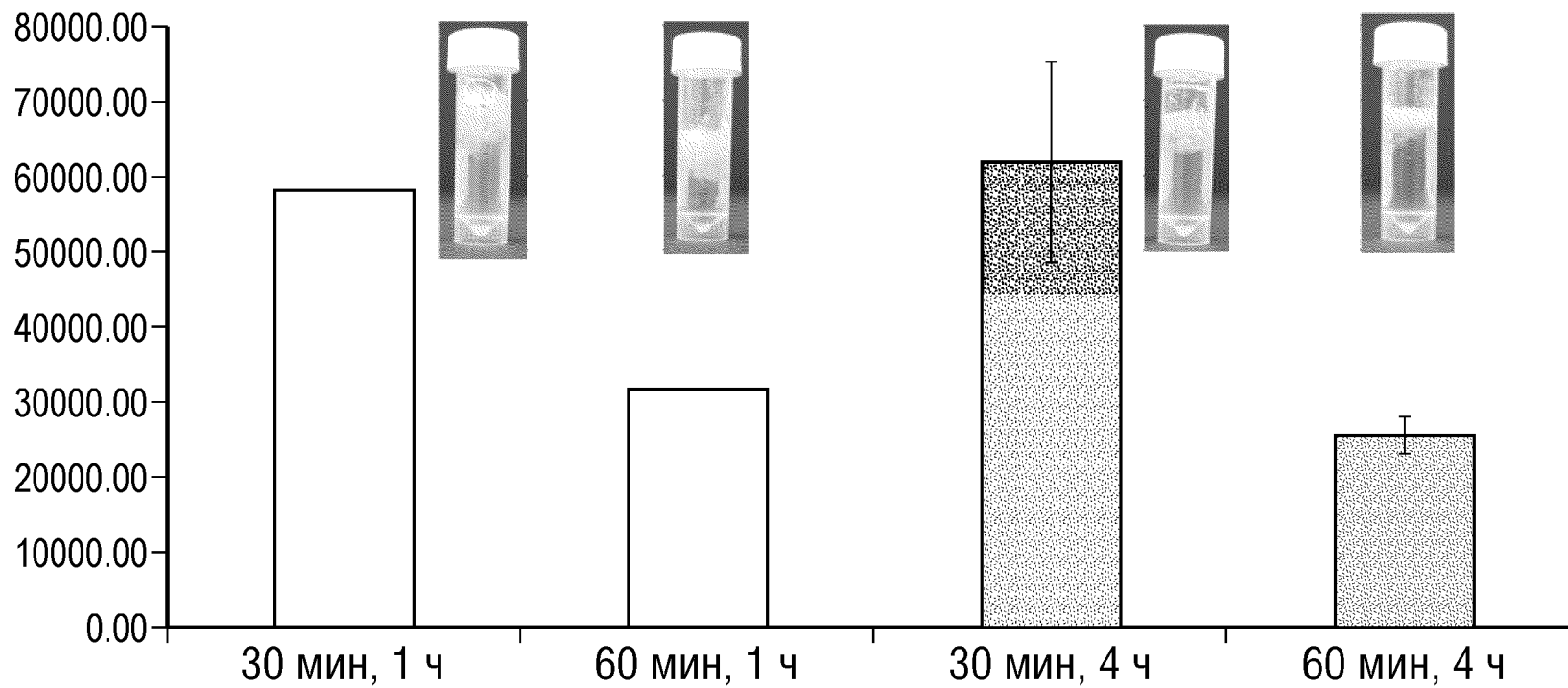
ФИГ.10

30 мин относительно 60 мин: кипячение при 100°C, кипящий LiBr, печь 60°C



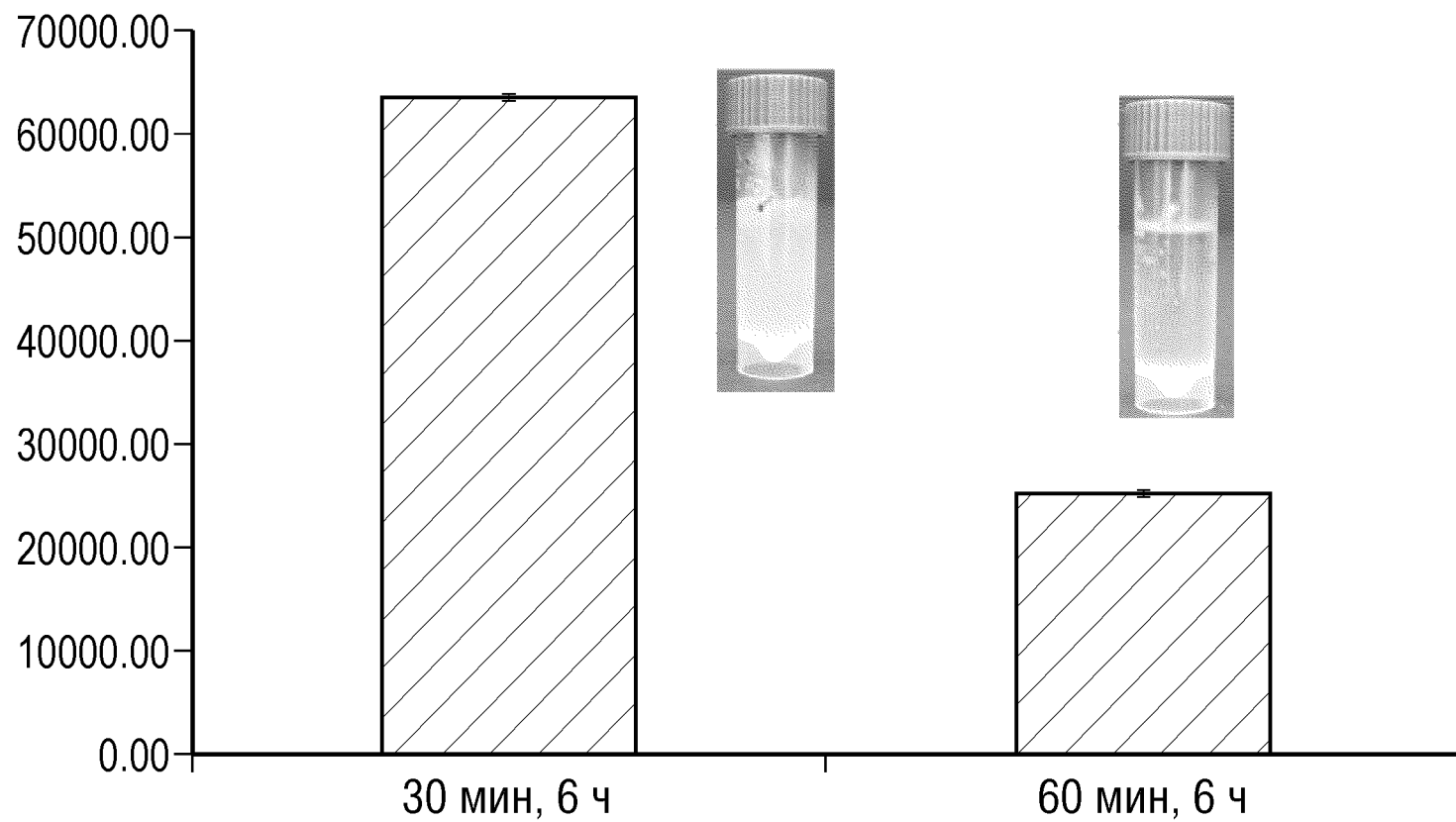
ФИГ.11

30 мин относительно 60 мин: кипячение при 100°C, LiBr 60°C, печь 60°C



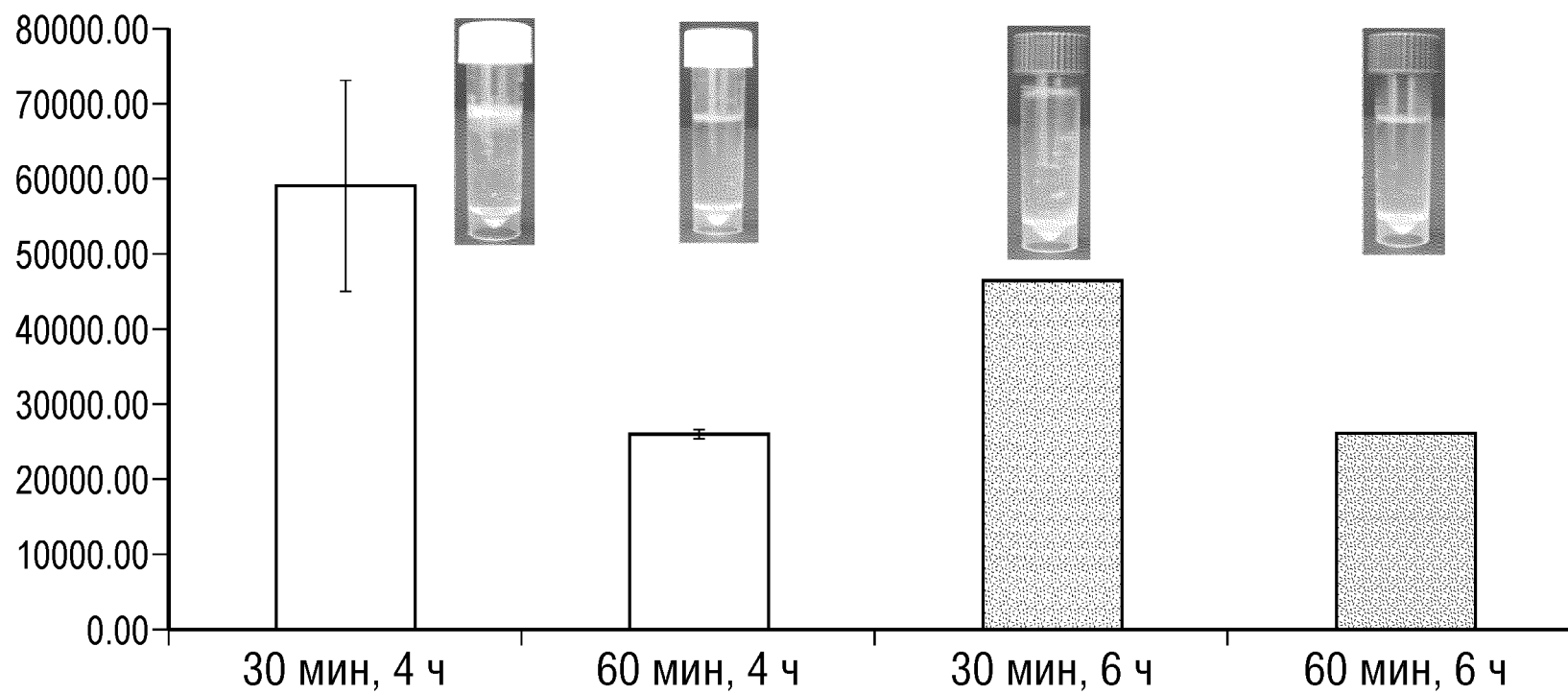
ФИГ.12

**30 мин относительно 60 мин: кипячение при 100°C, LiBr 80°C, печь 80°C**



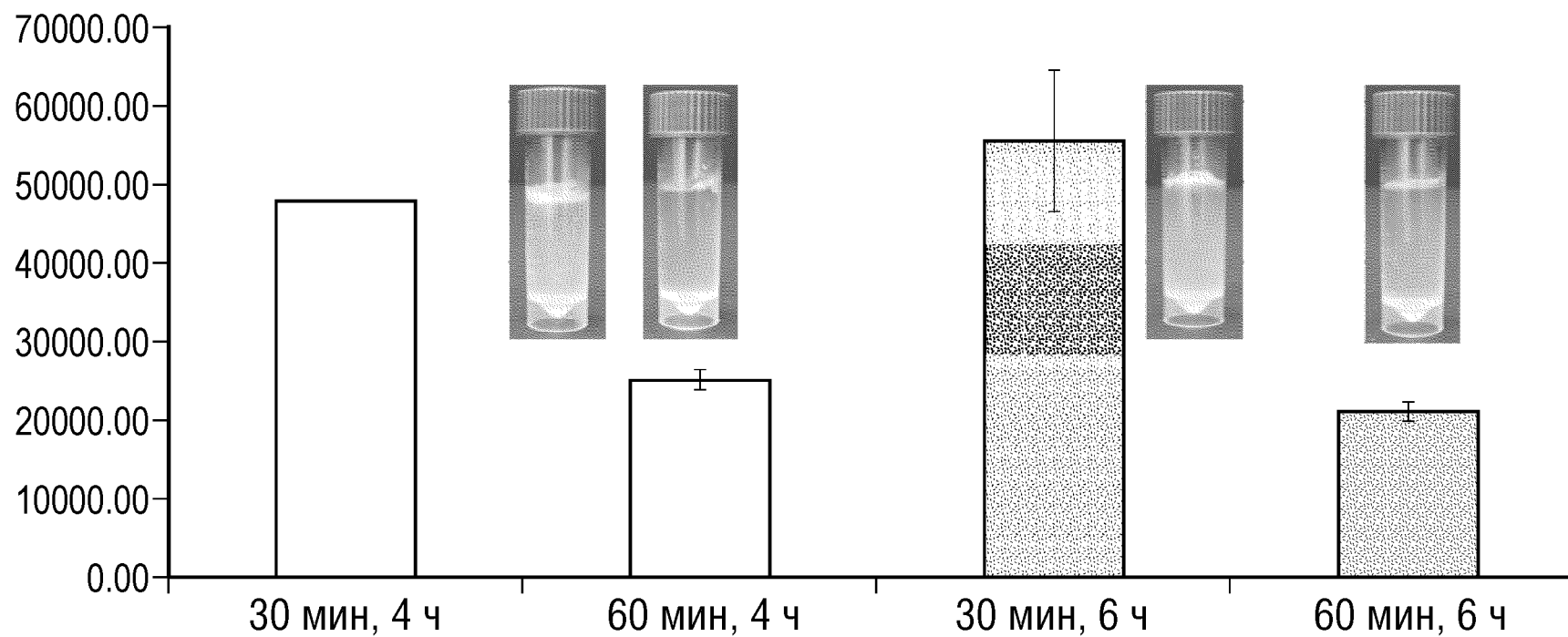
ФИГ.13

30 мин относительно 60 мин: кипячение при 100°C, LiBr 80°C, печь 60°C



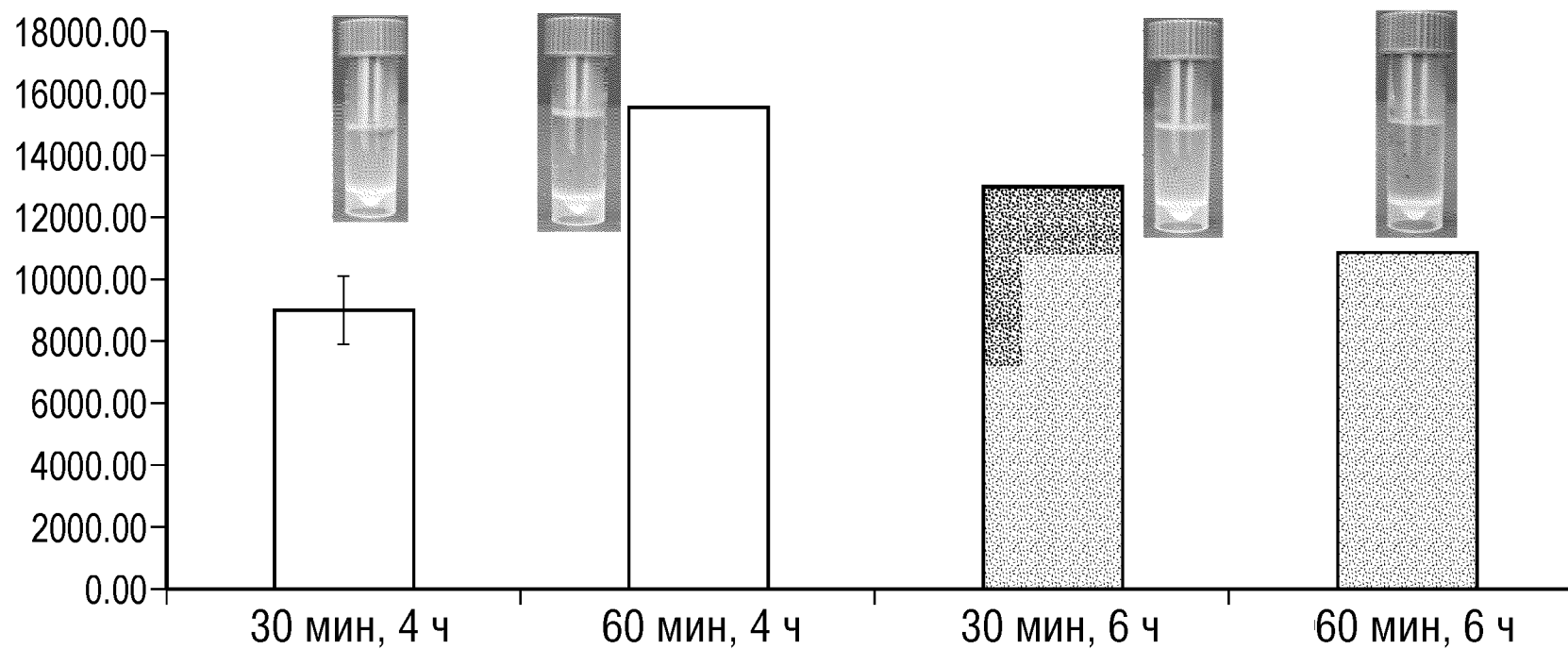
ФИГ.14

30 мин относительно 60 мин: кипячение при 100°C, LiBr 100°C, печь 60°C



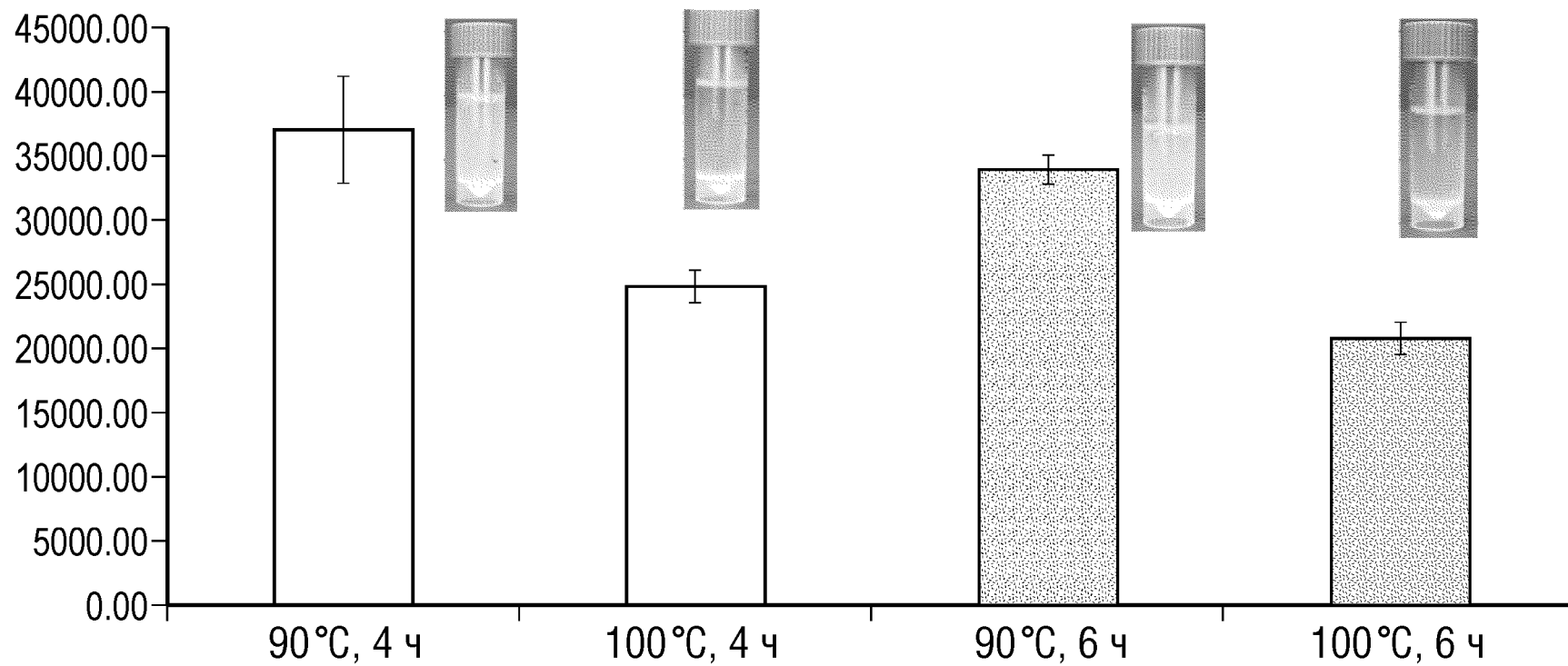
ФИГ.15

**30 мин относительно 60 мин: кипячение при 100°C, LiBr 140°C, печь 140°C**



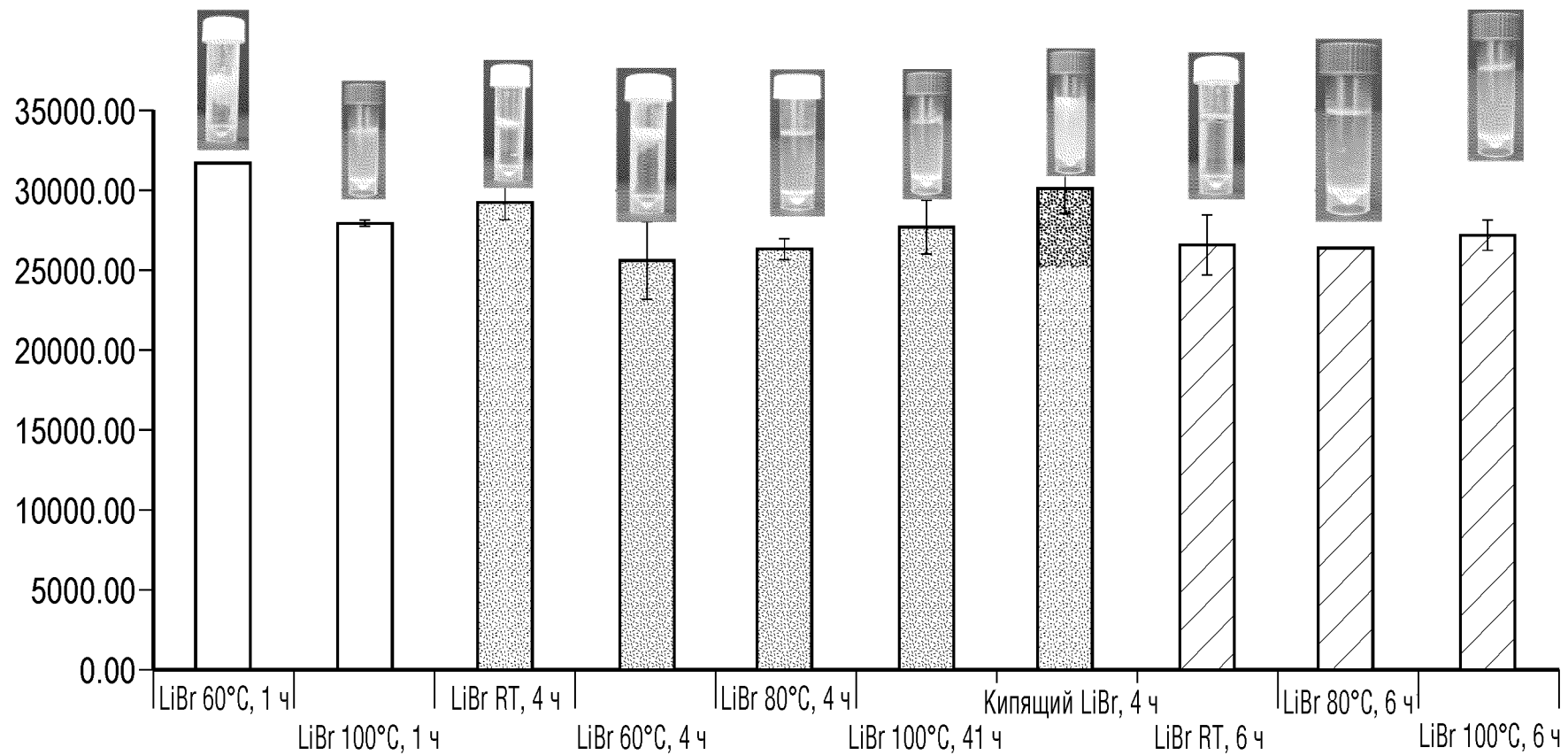
ФИГ.16

**Экстракция при 90°C и 100°C: 60 мин, LiBr 100°C, печь 100°C**



ФИГ.17

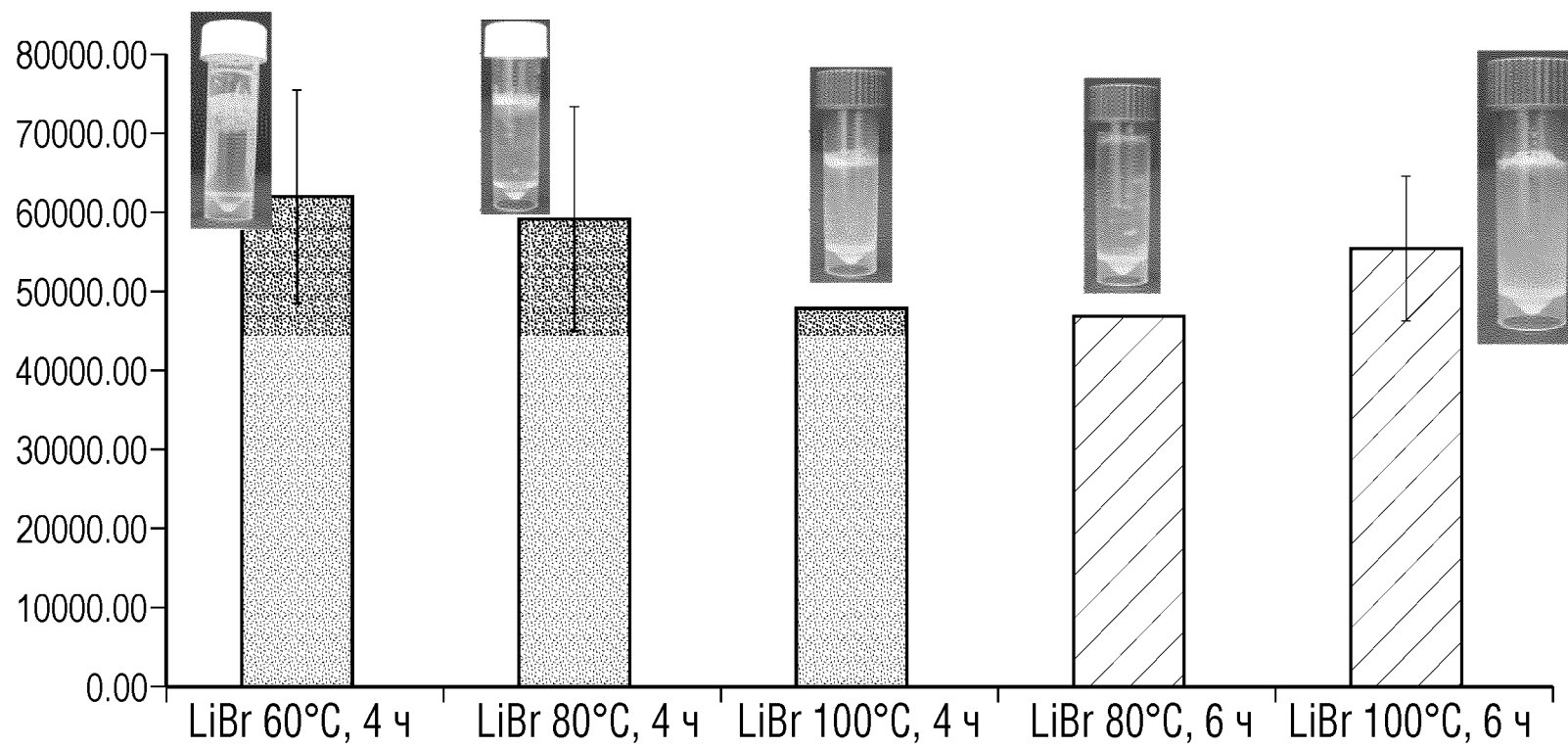
Температура LiBr: кипячение 100°C, 60 мин, печь 60°C





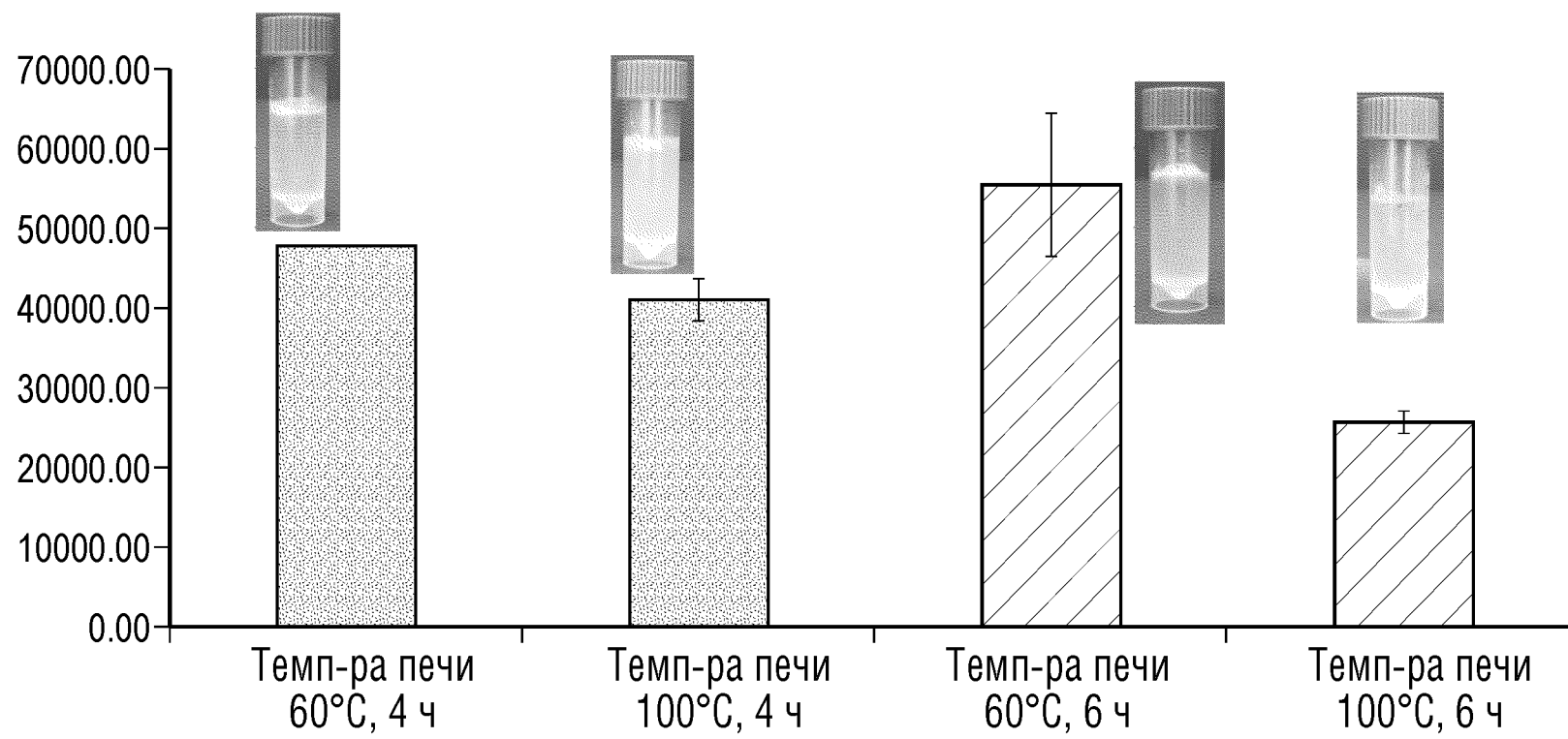
ФИГ.18

Температура LiBr: кипячение 100°C, 30 мин, печь 60°C



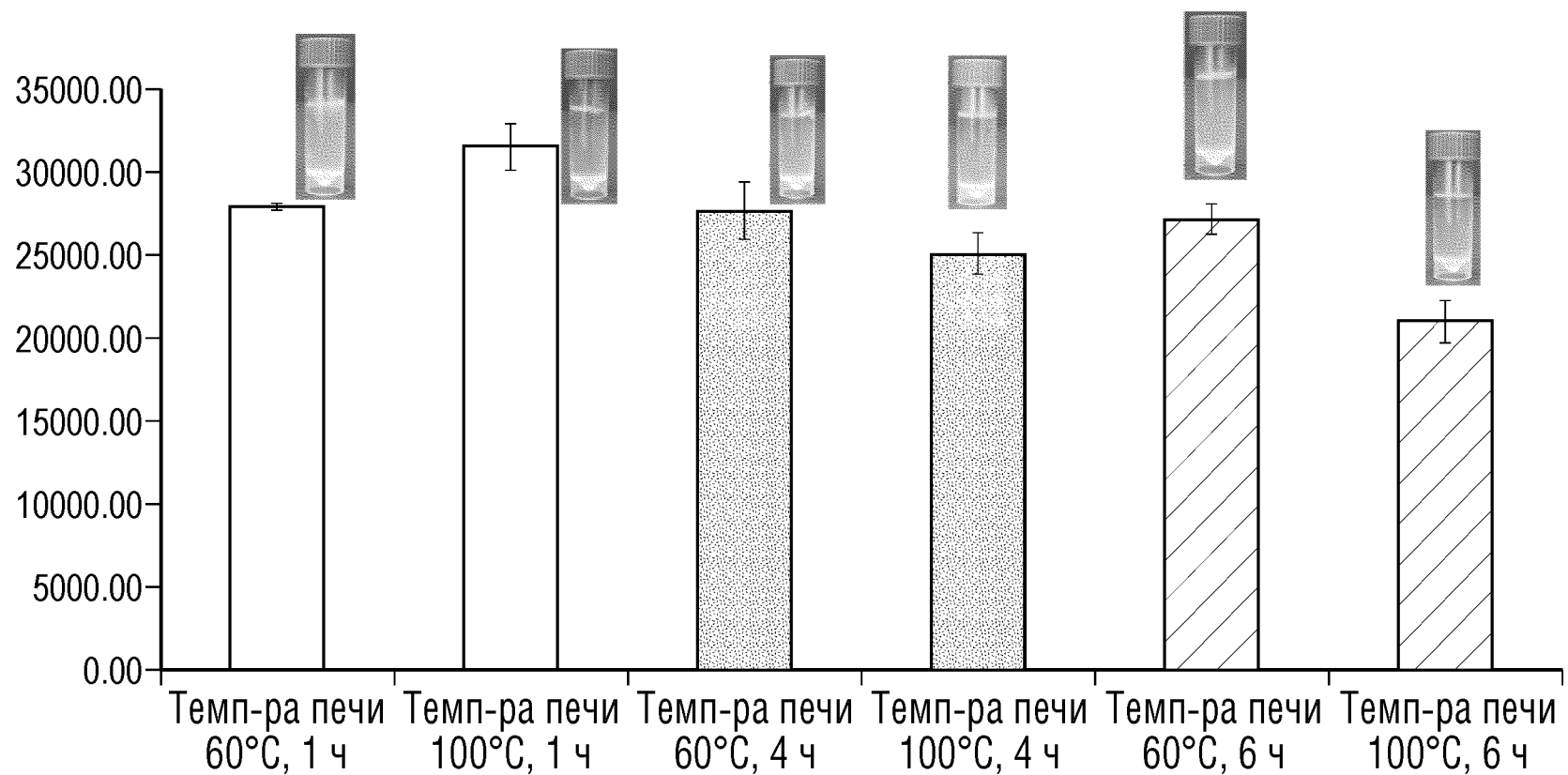
ФИГ.19

Температура печи: кипячение 100°C, 30 мин, LiBr 100°C



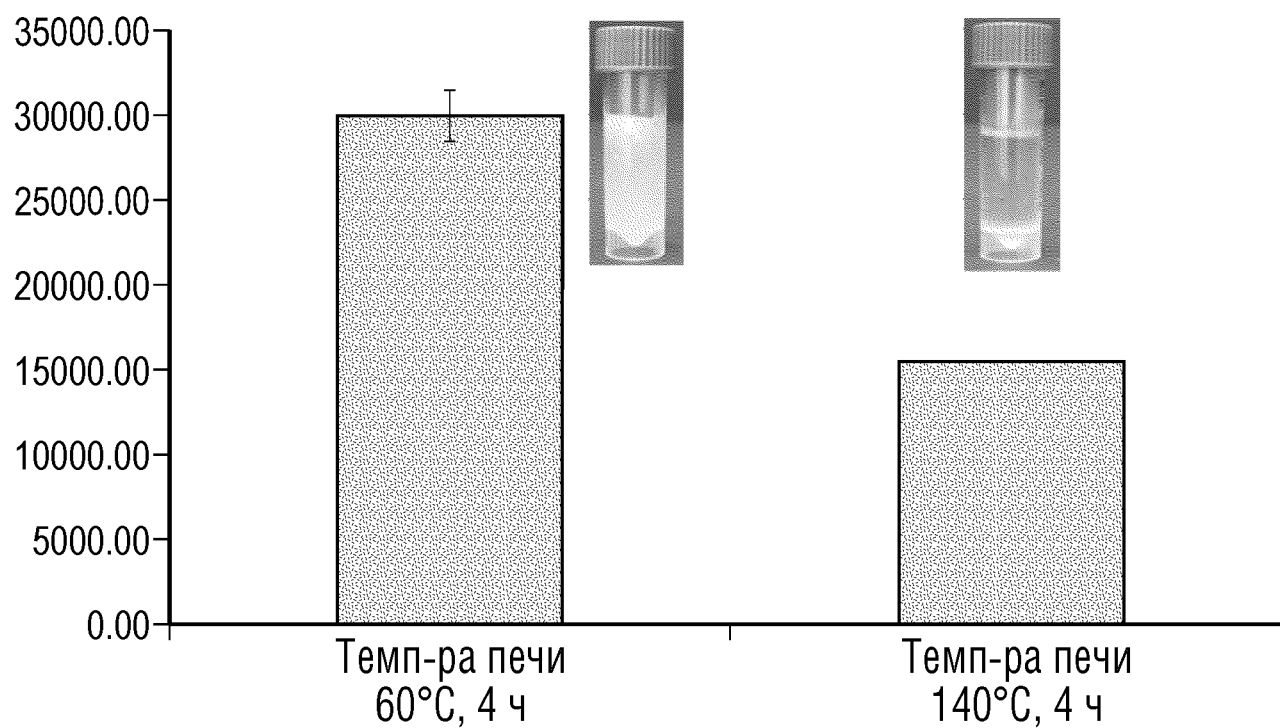
ФИГ.20

Температура печи: кипячение 100°C, 60 мин, LiBr 100°C



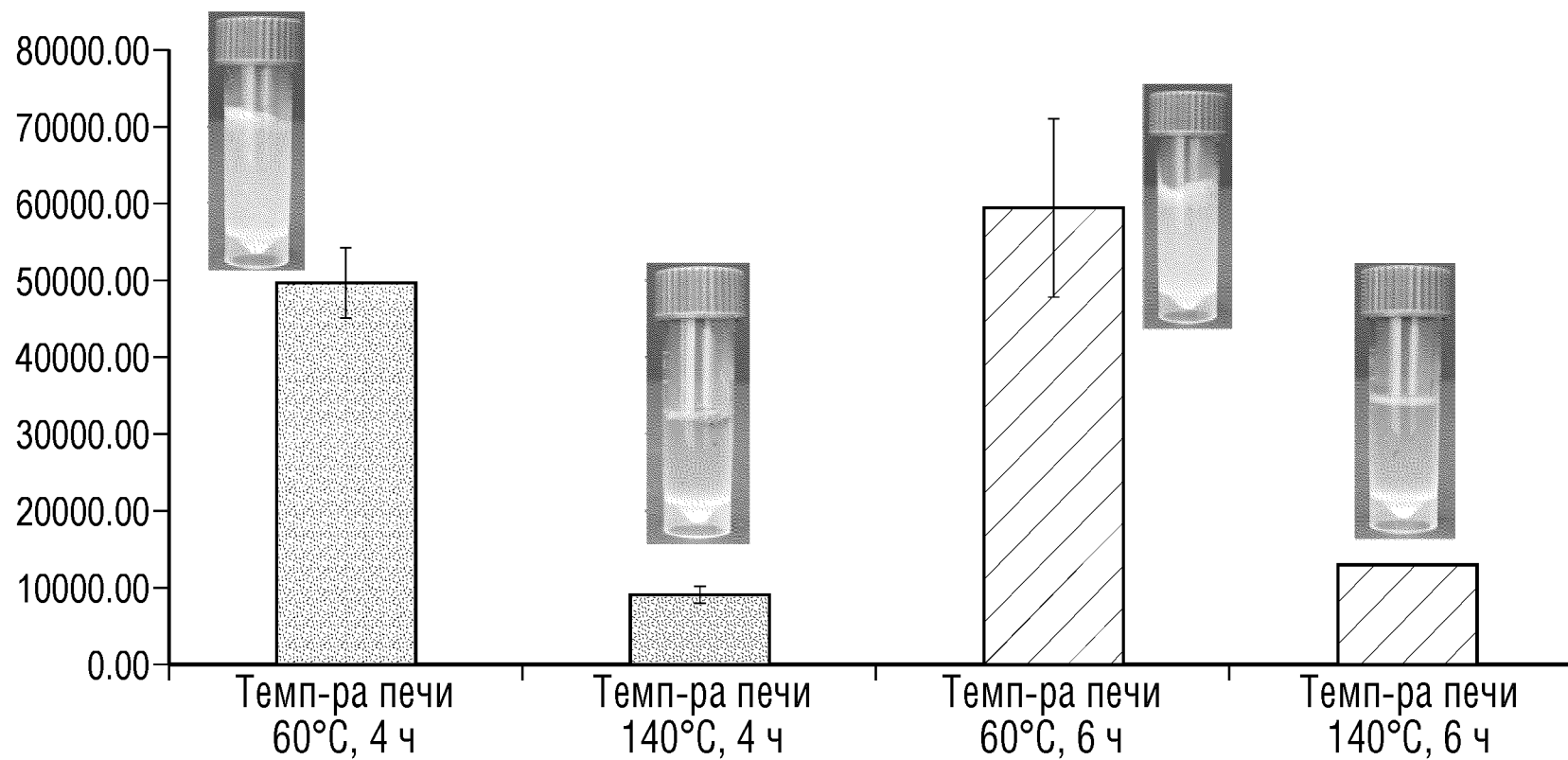
ФИГ.21

Температура печи: кипячение 100°C, 60 мин, LiBr 140°C



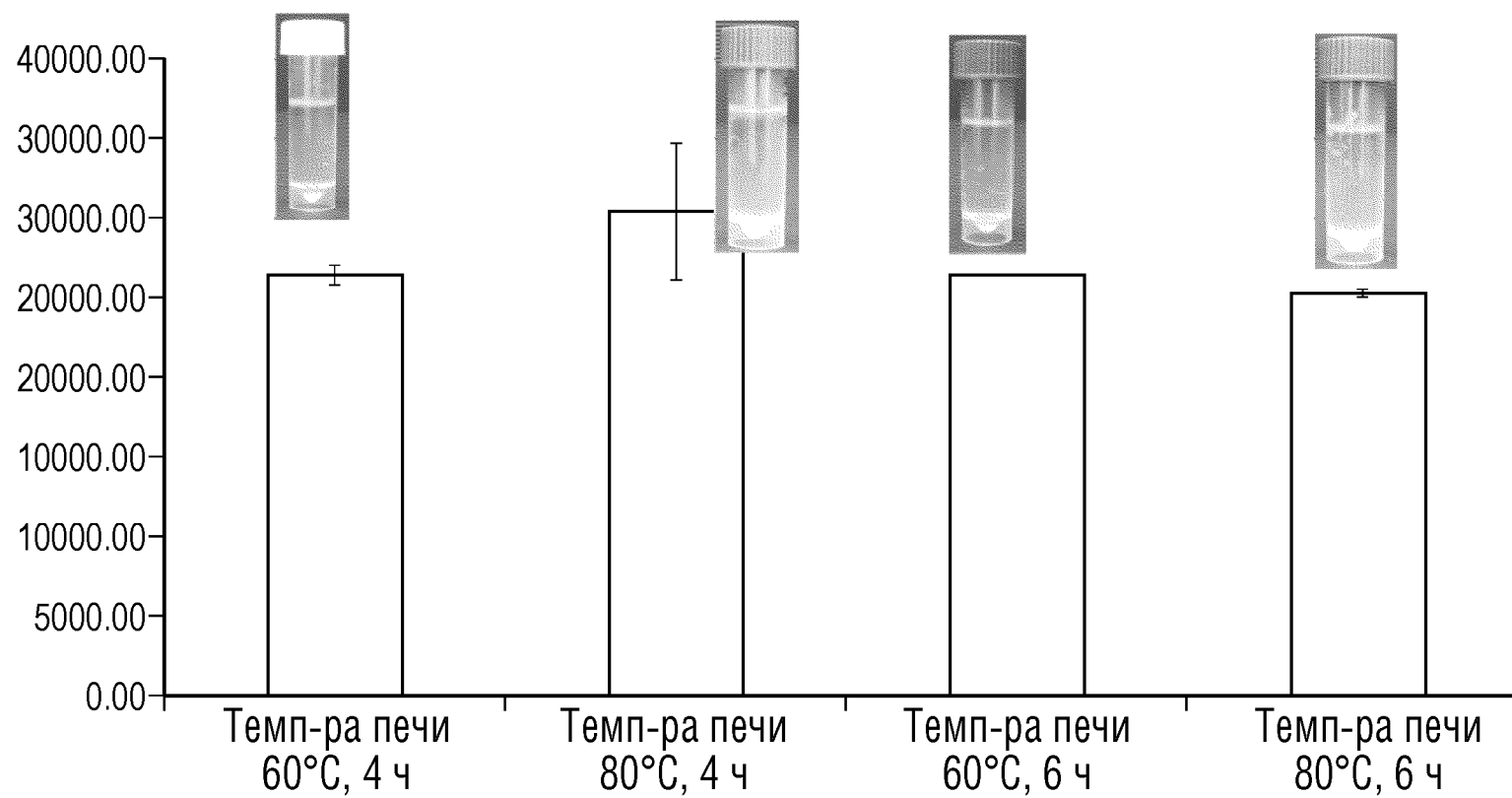
ФИГ.22

Температура печи: кипячение 100°C, 30 мин, LiBr 140°C

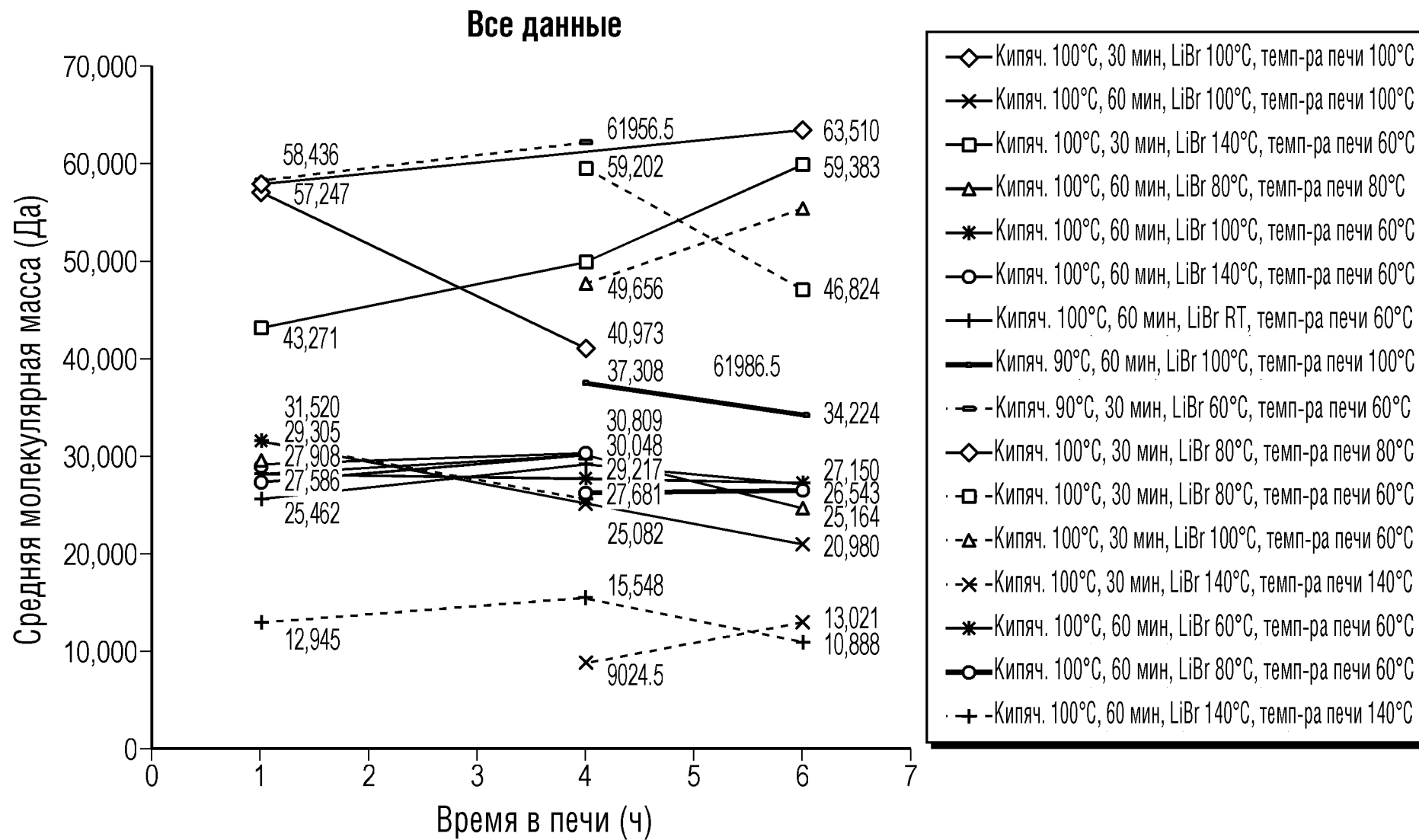


ФИГ.23

Температура печи: кипячение 100°C, 60 мин, LiBr 80°C



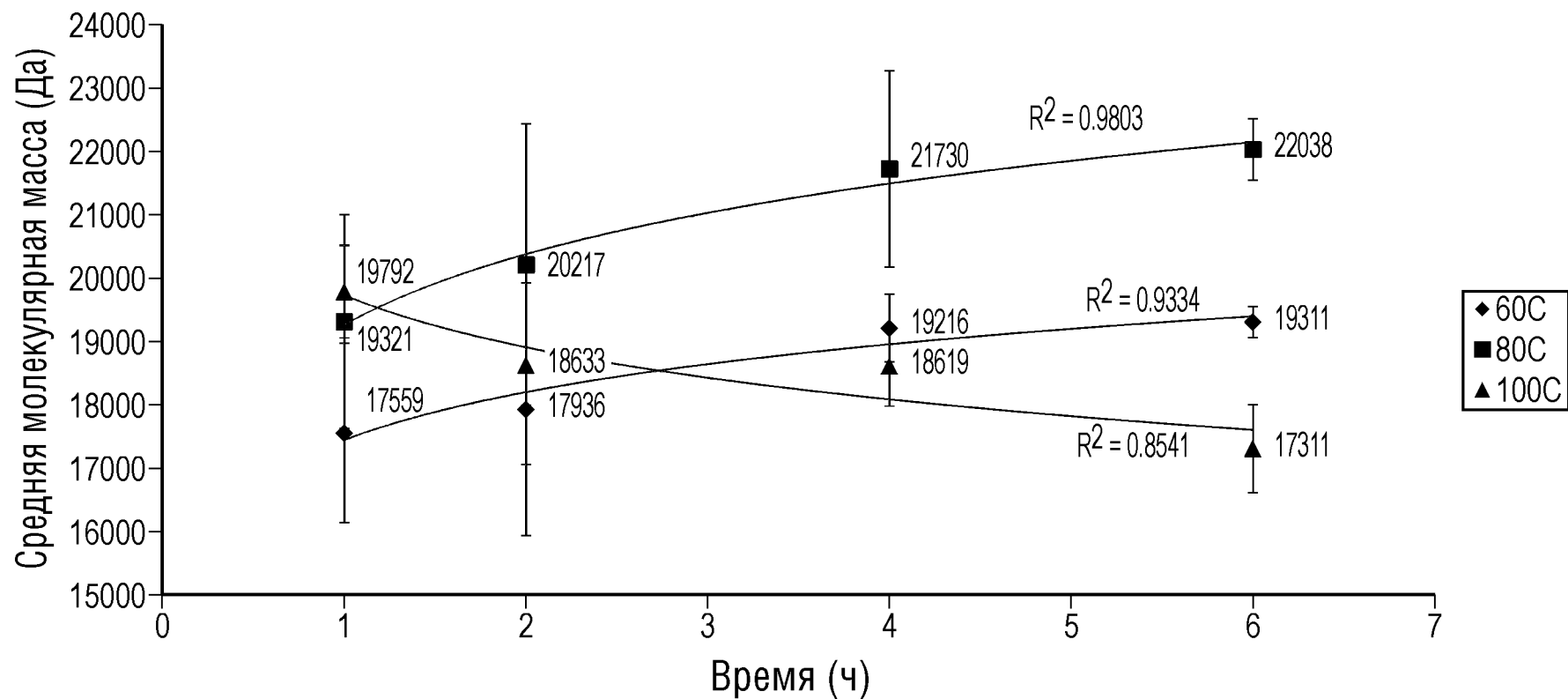
ФИГ.24



ФИГ.25

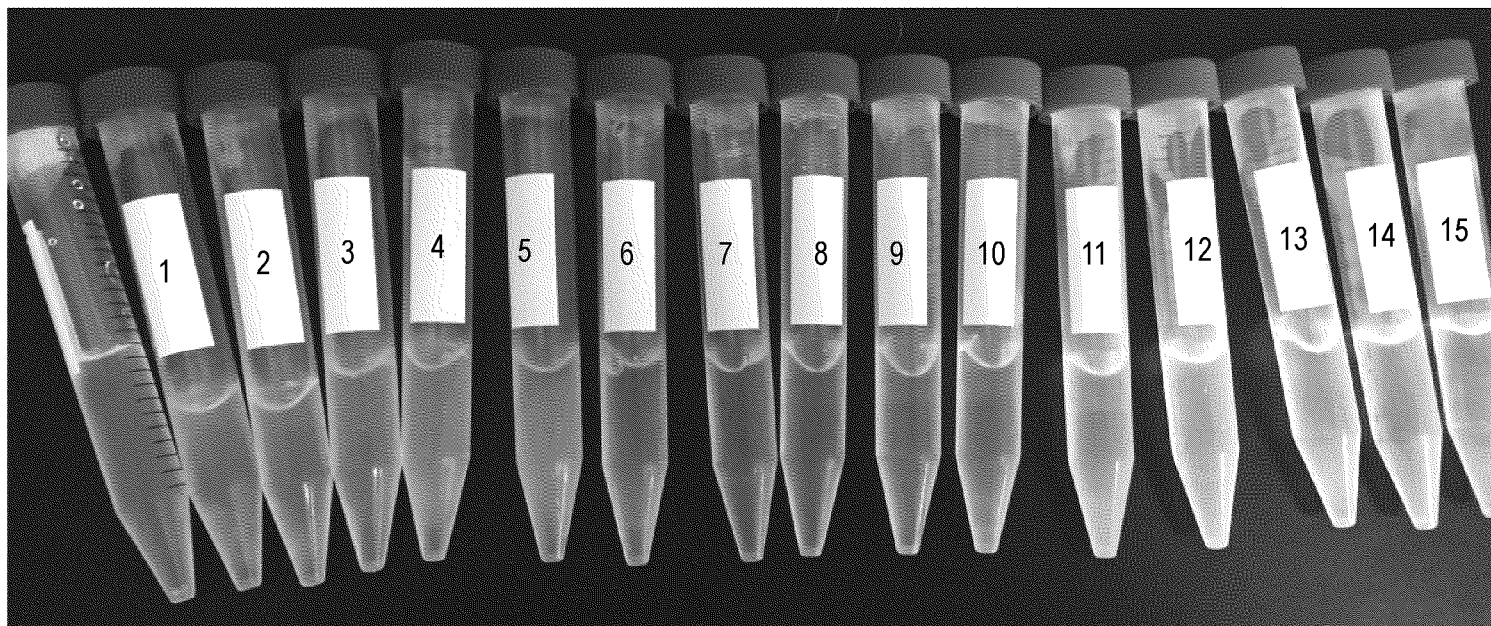
## Температура печи=Температура LiBr: Раунд 2

Данные о молекулярной массе: Температура печи=Температура LiBr

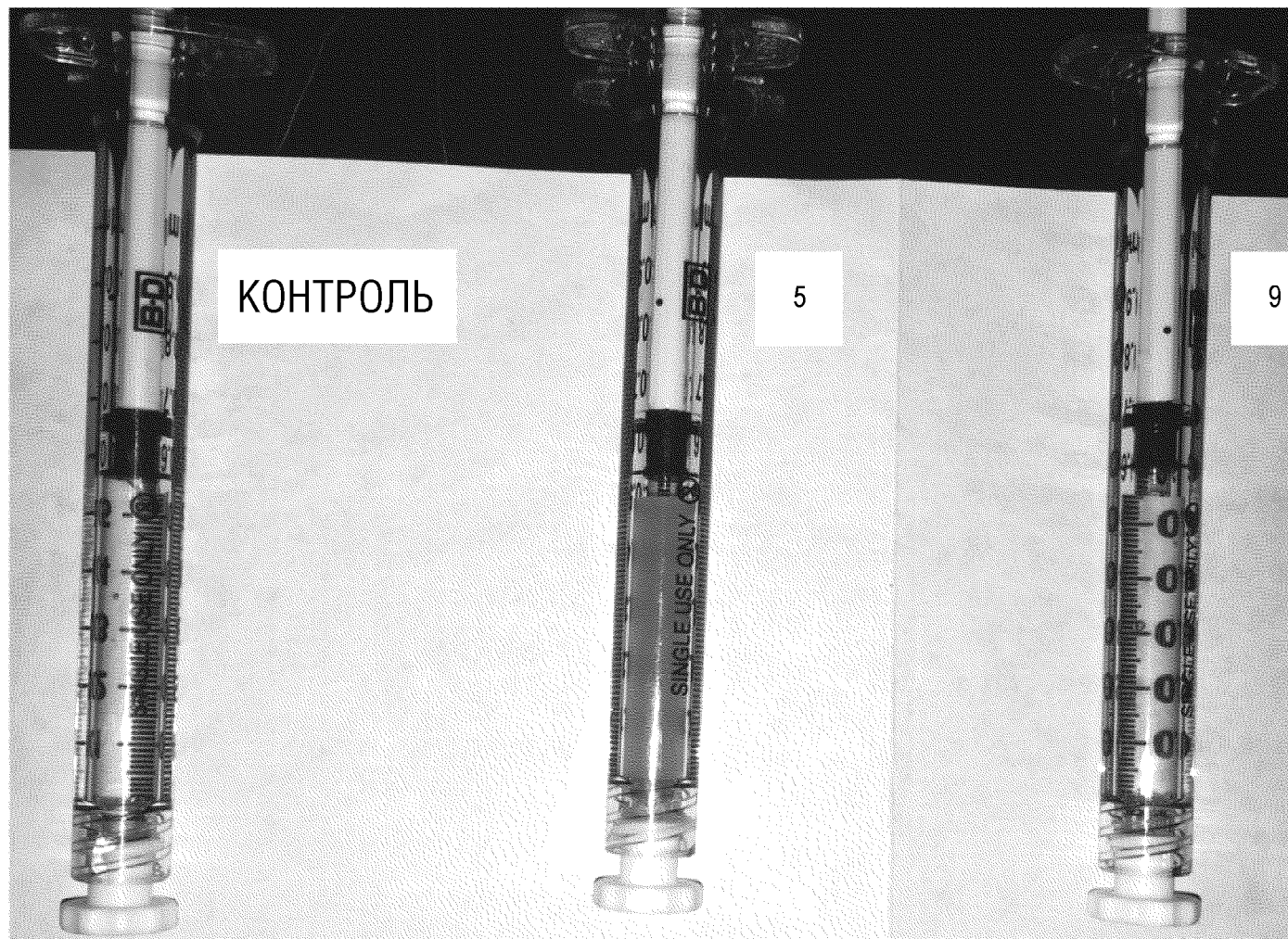




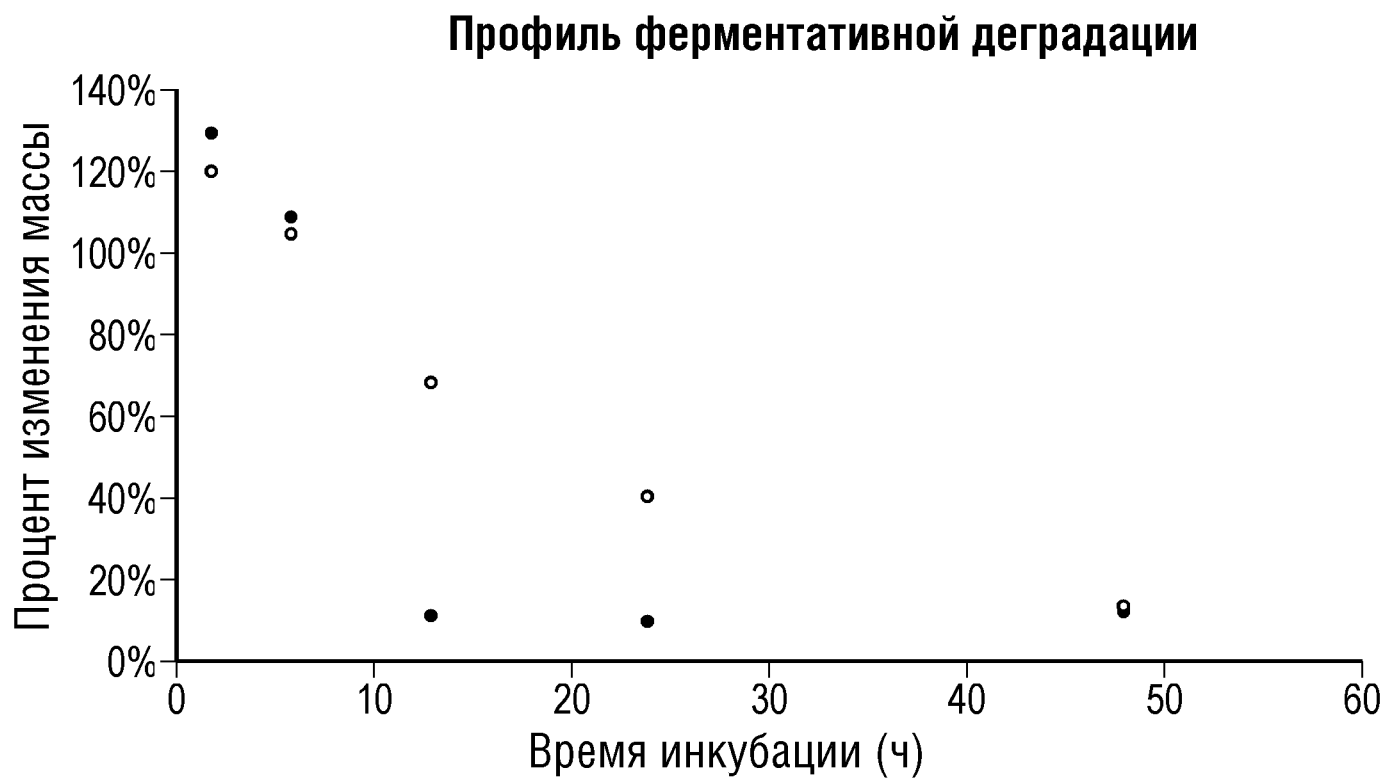
ФИГ.26



ФИГ.27

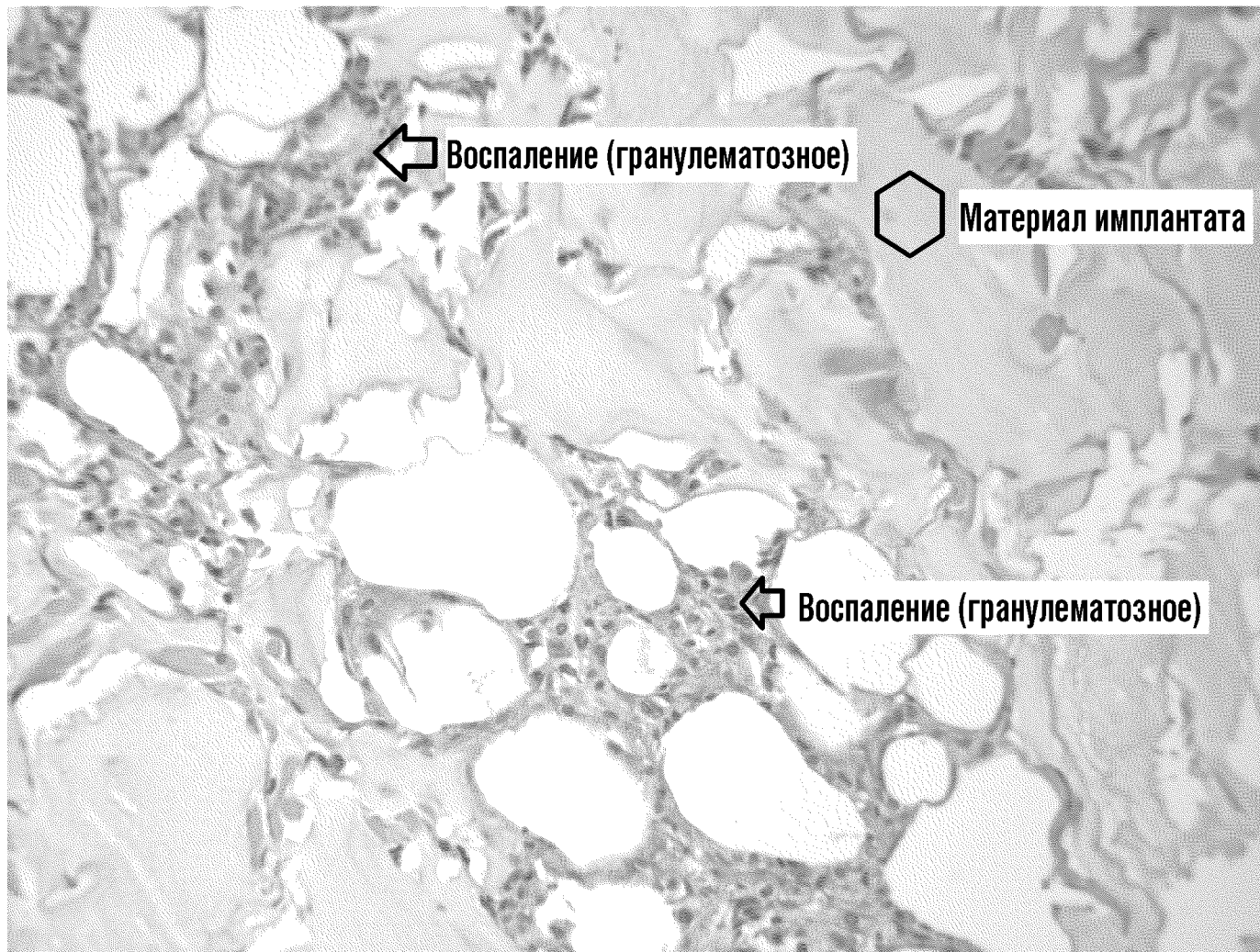


ФИГ.28

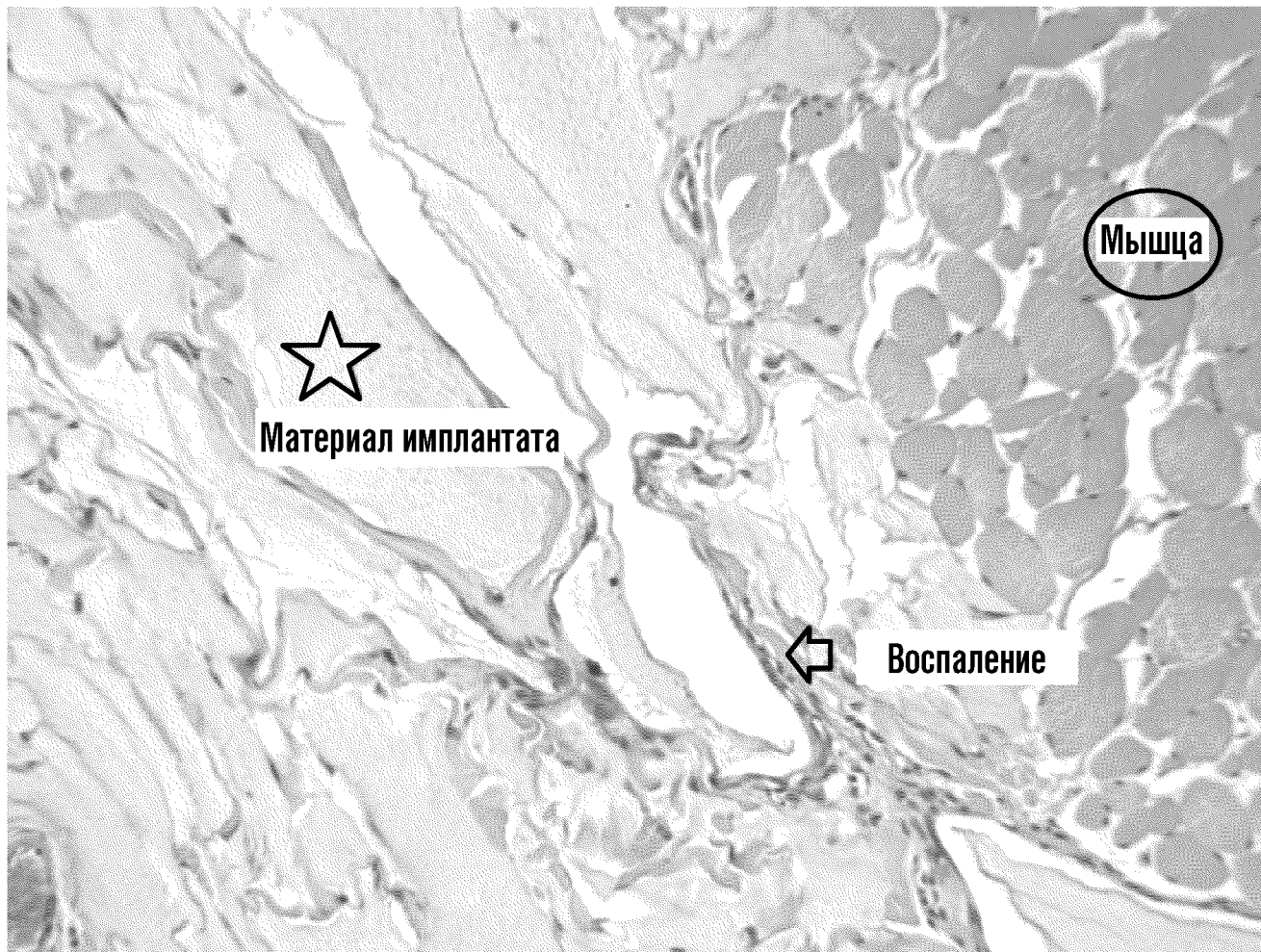


• Гидрогель шелк-НА ◦ Гидрогель НА

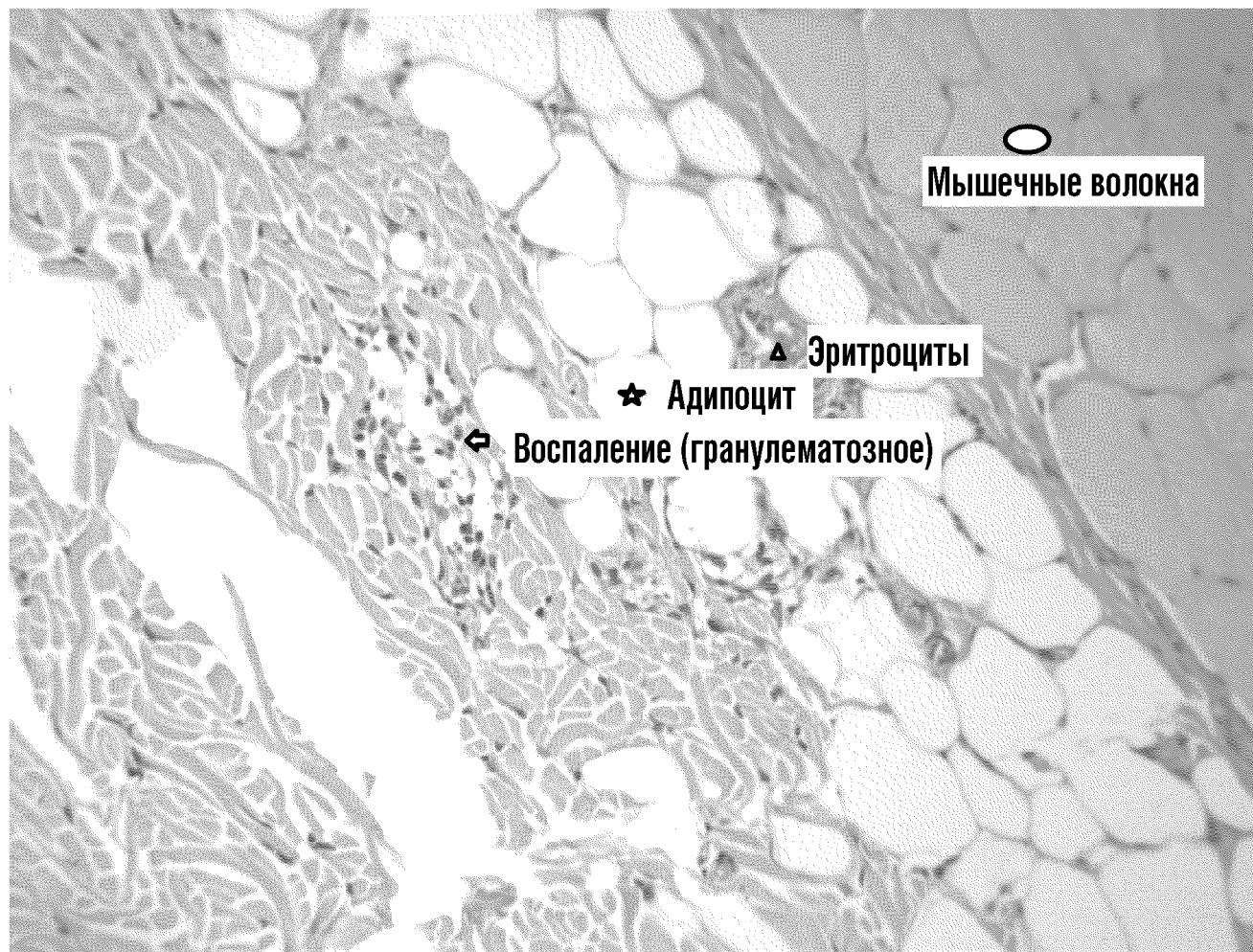
ФИГ.29



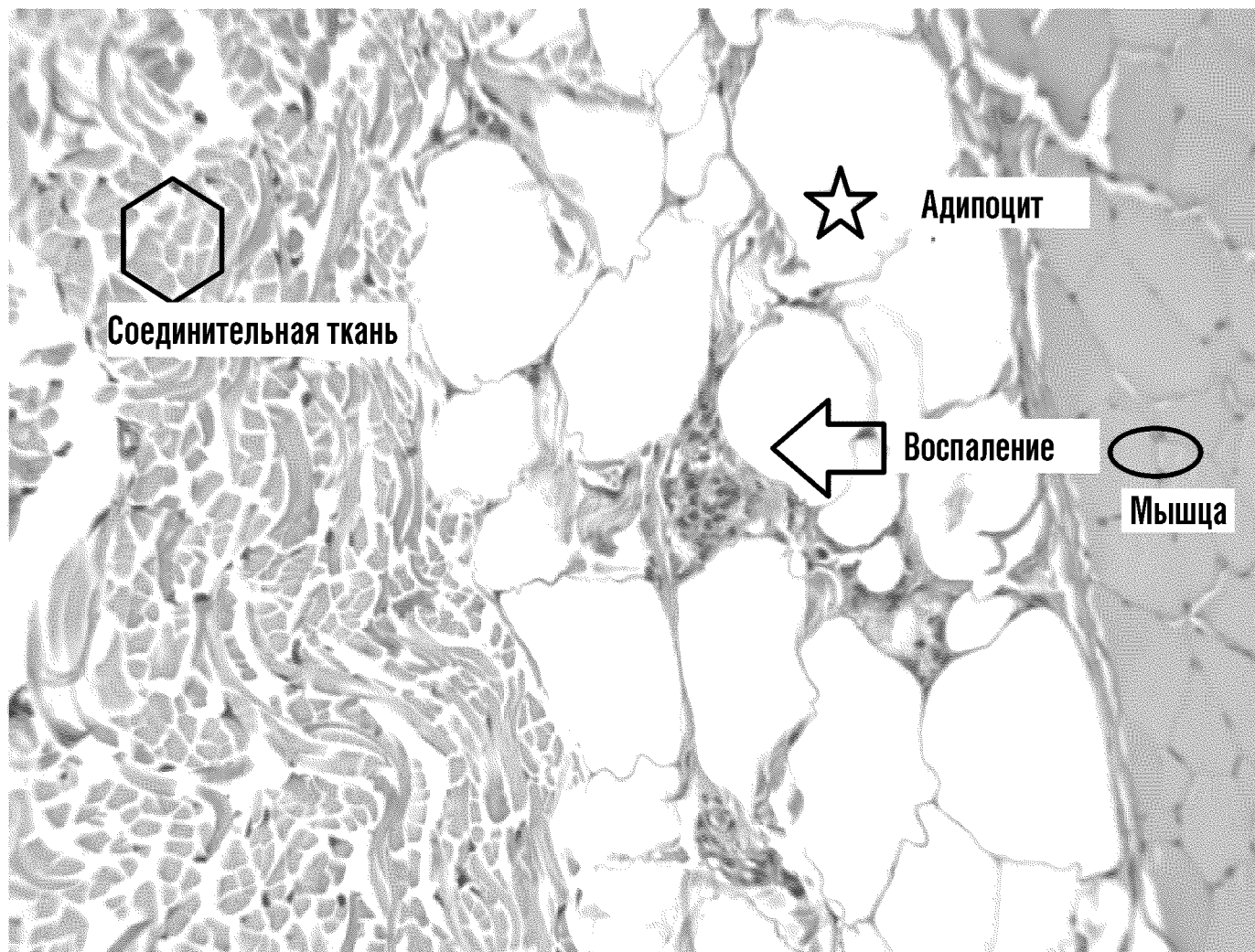
ФИГ.30



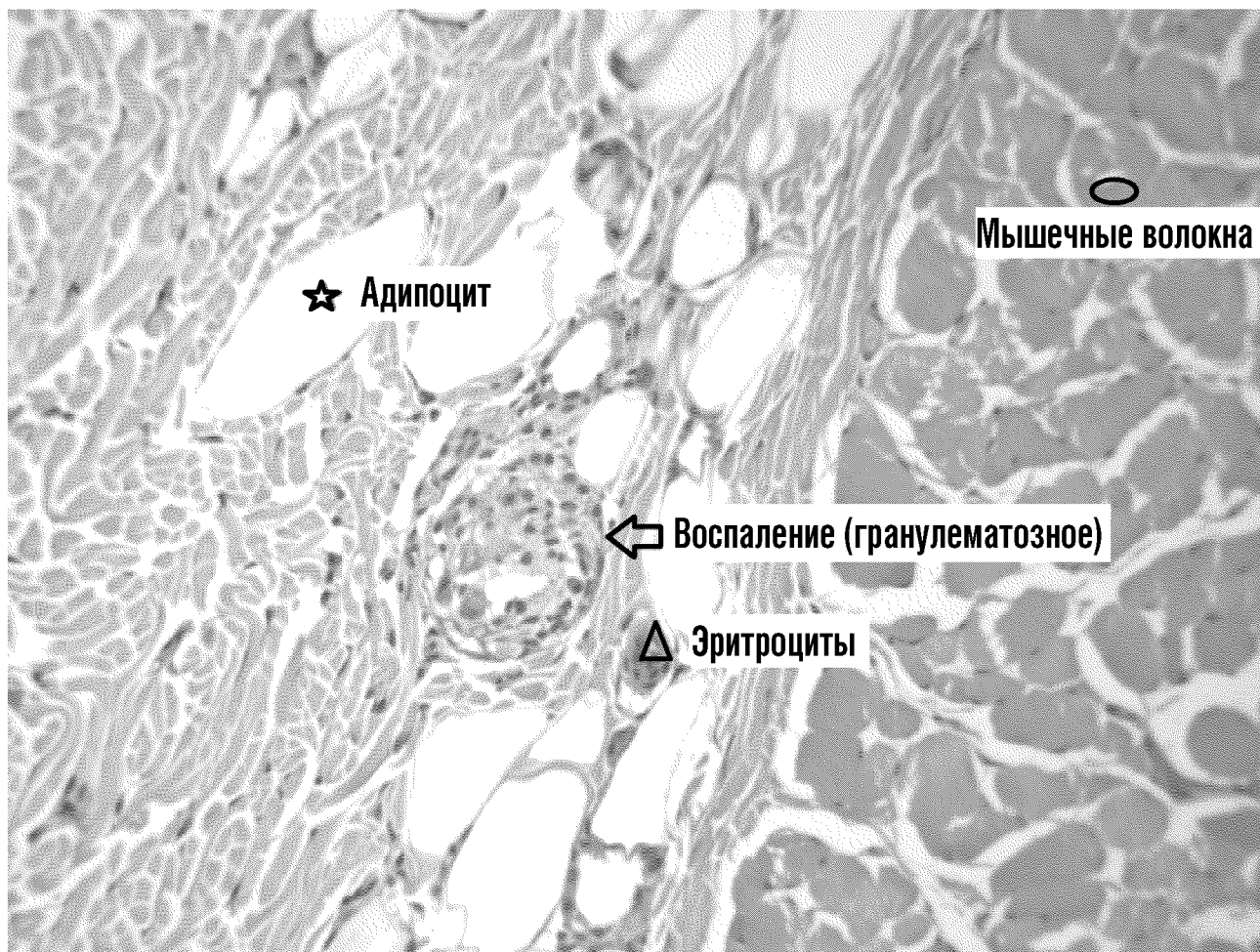
ФИГ.31



ФИГ.32

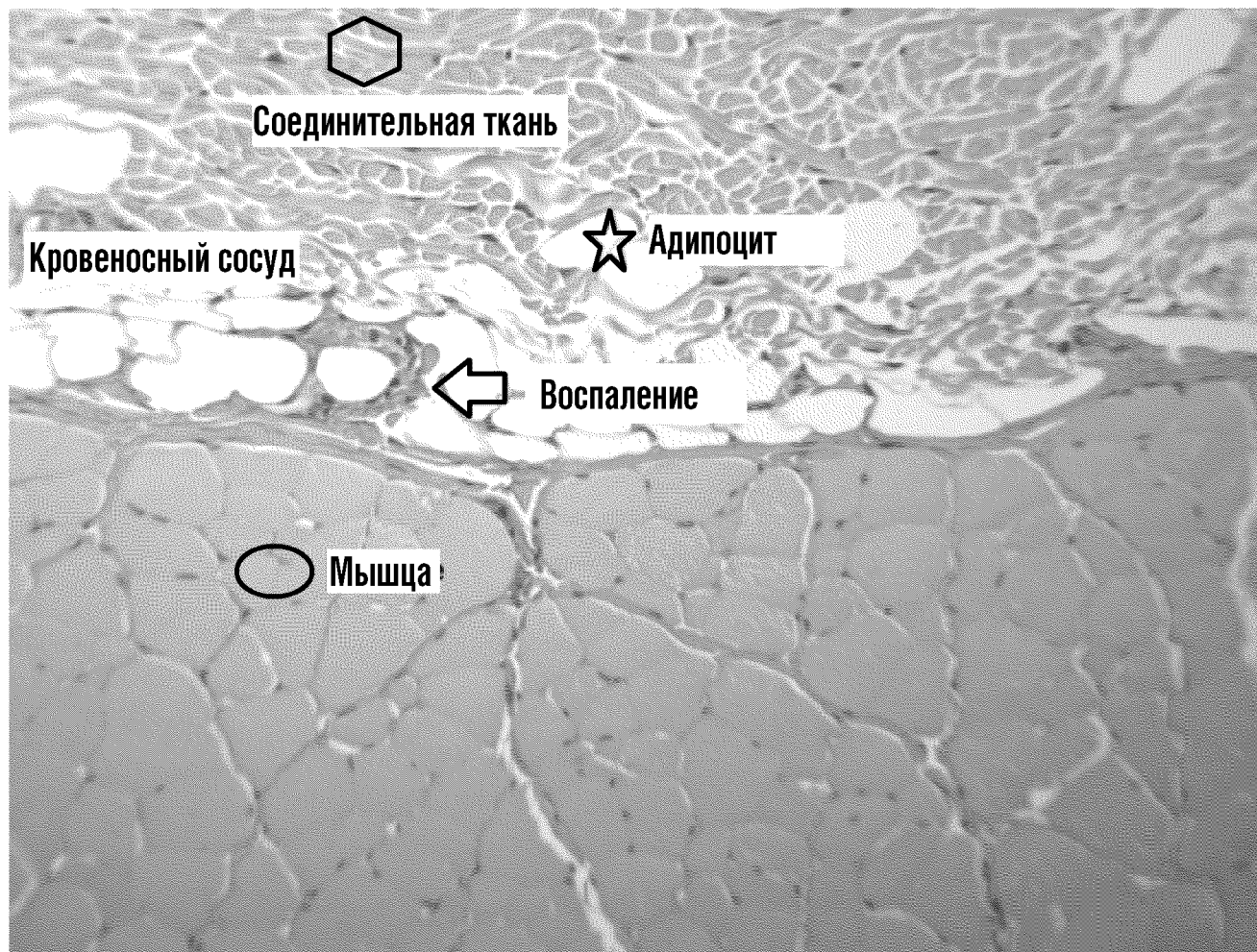


ФИГ.33

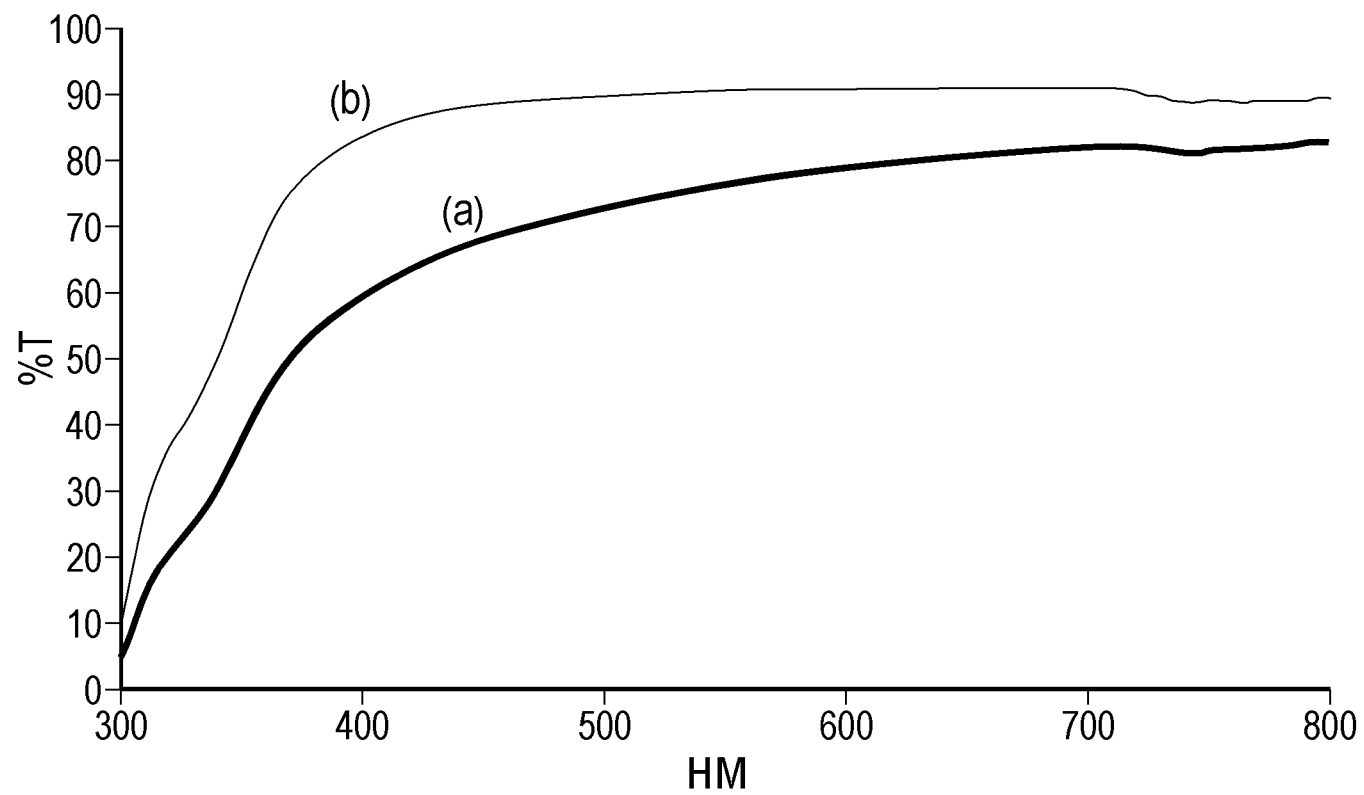




ФИГ.34

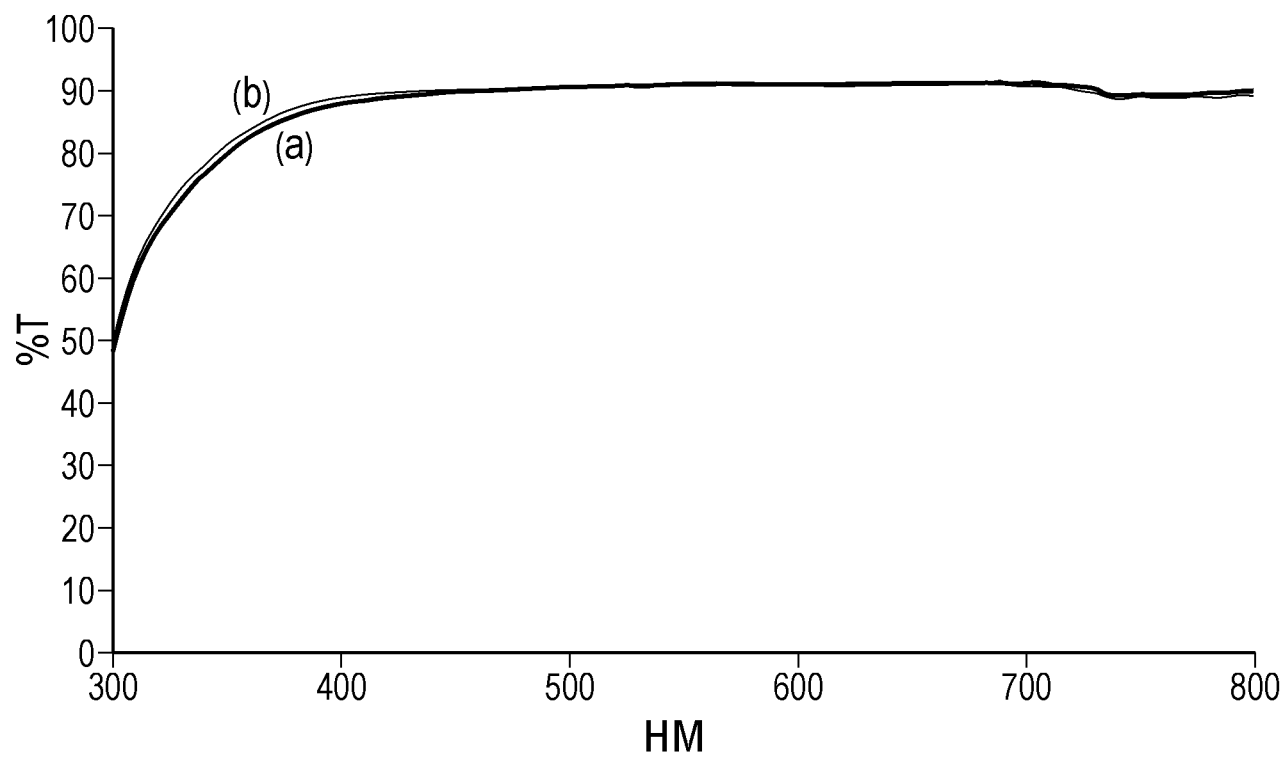


ФИГ.35



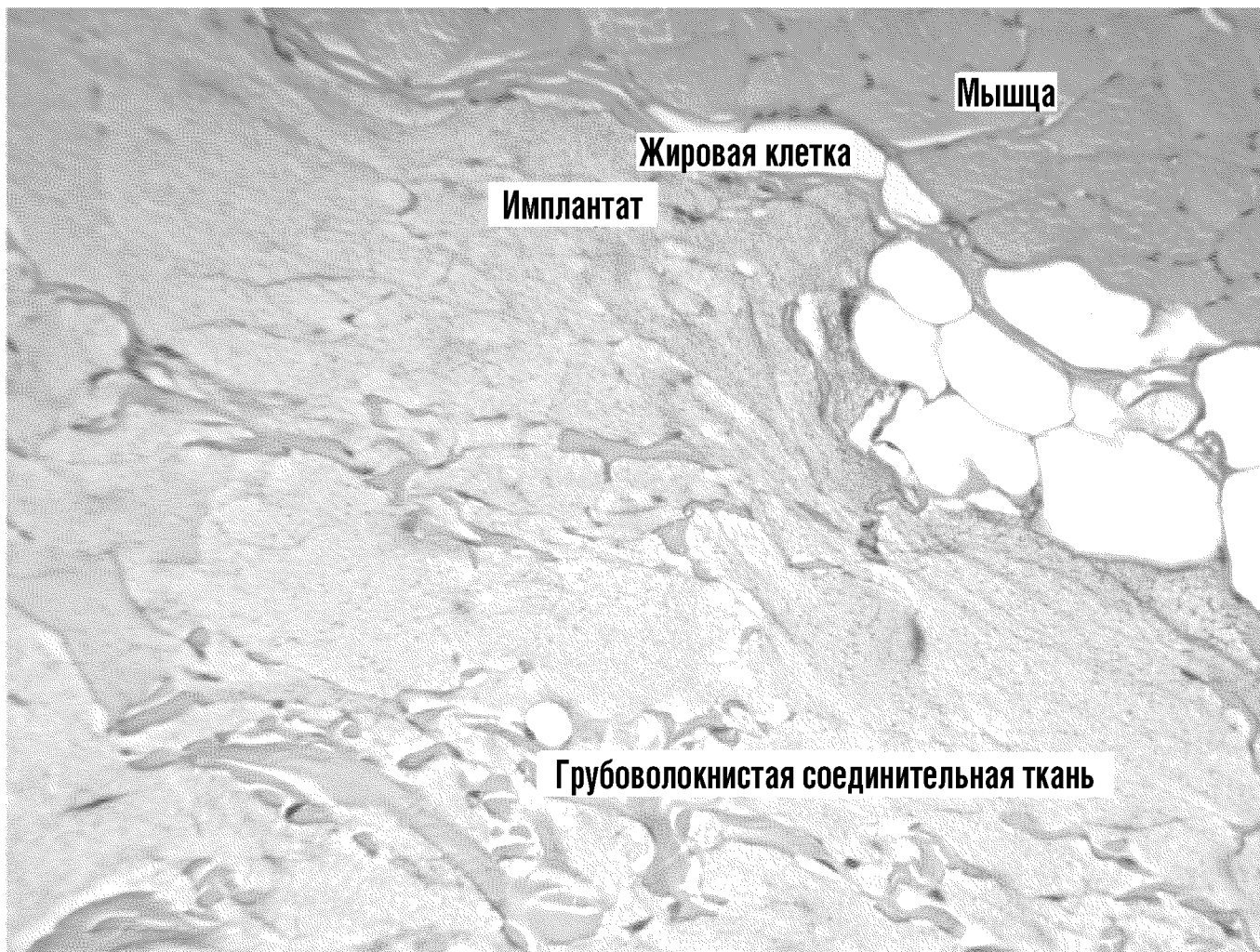
35/55

ФИГ.36

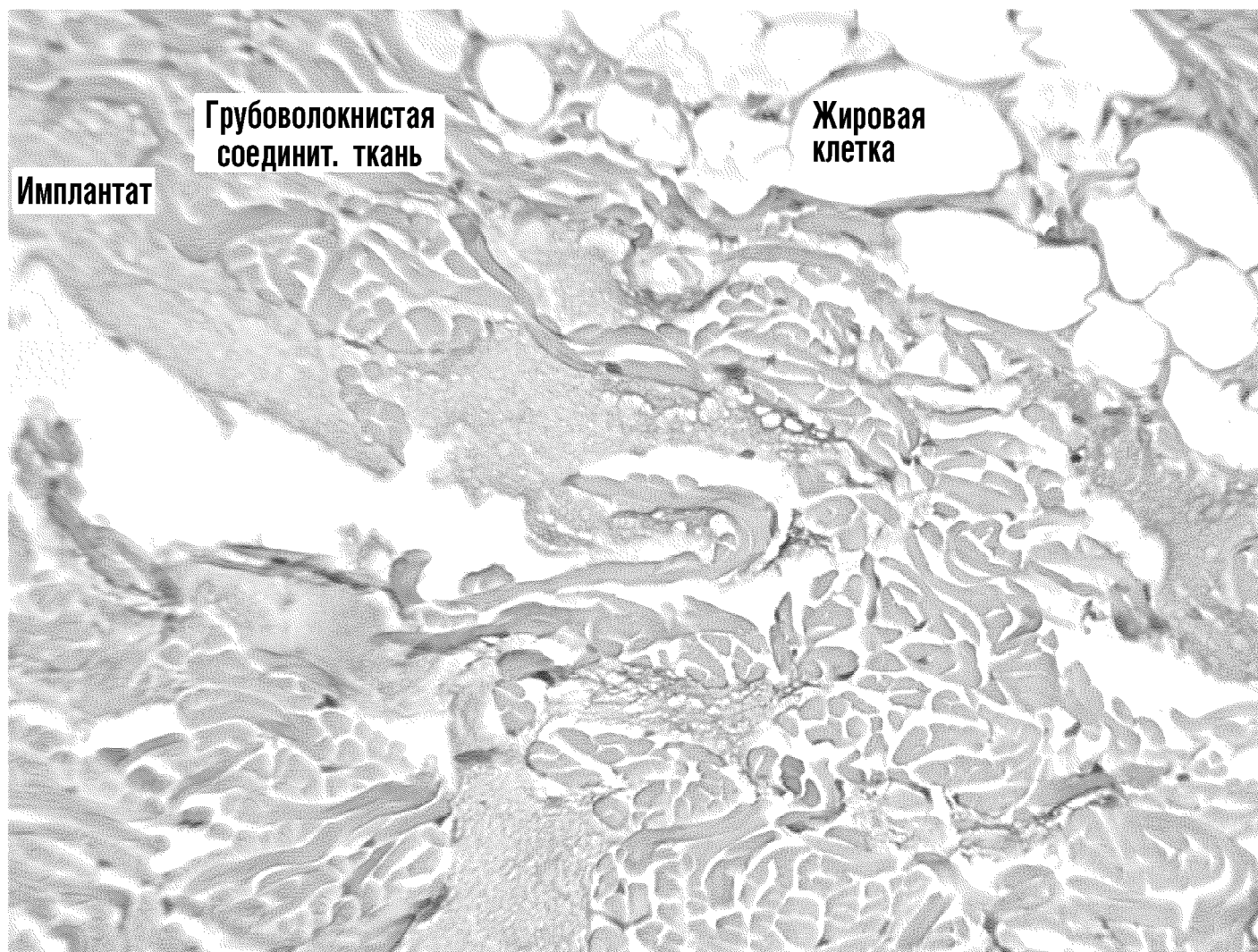


36/55

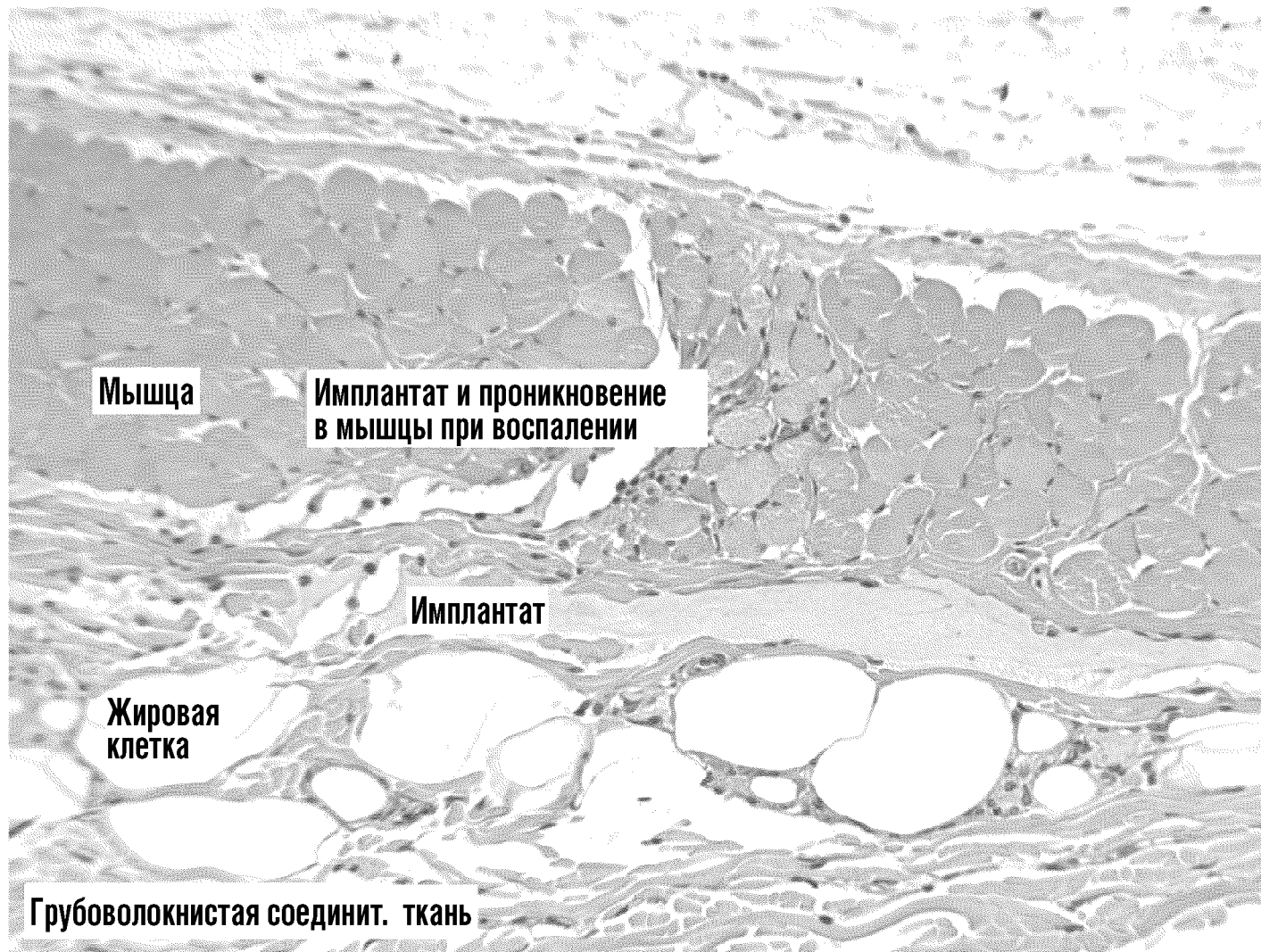
ФИГ.37



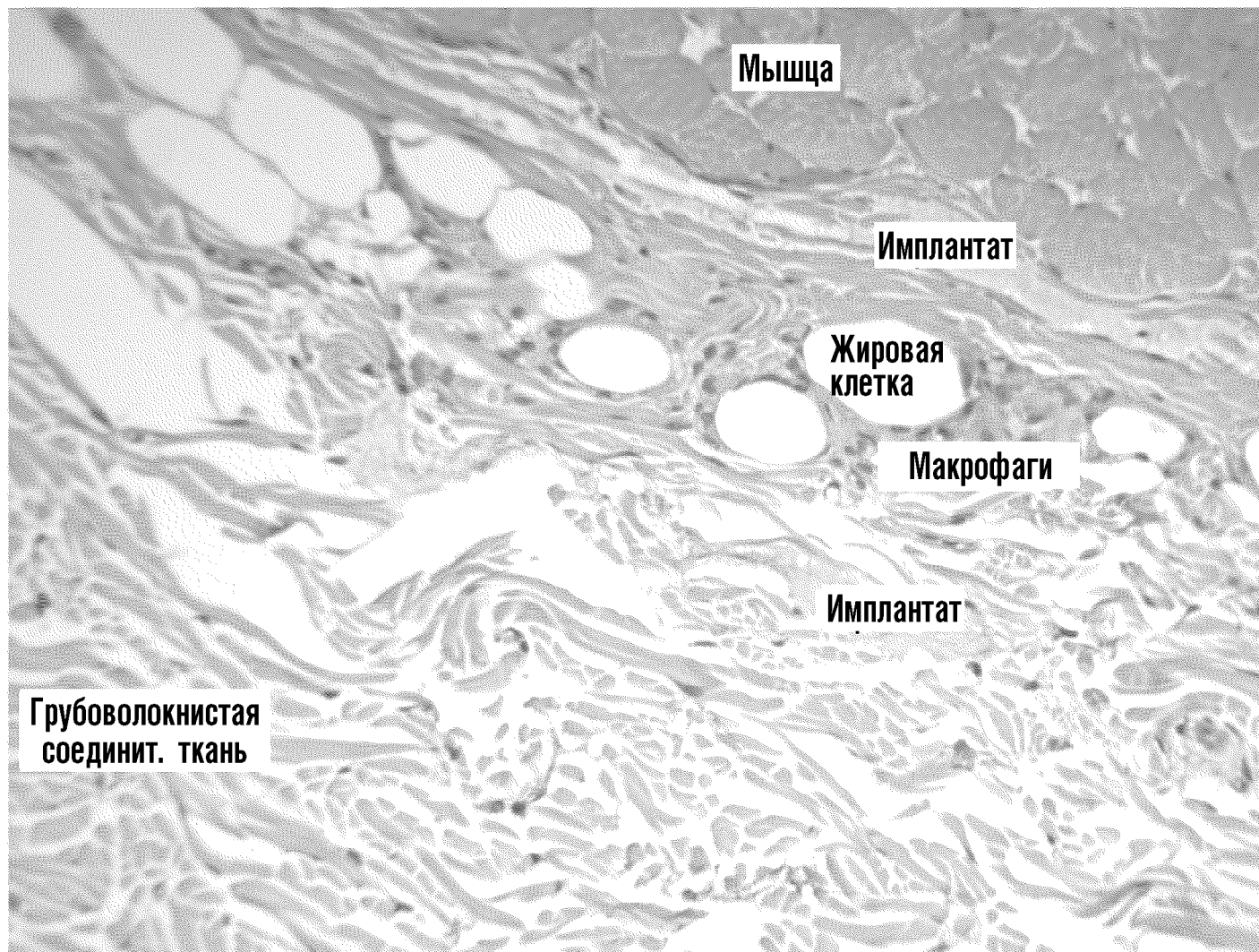
ФИГ.38



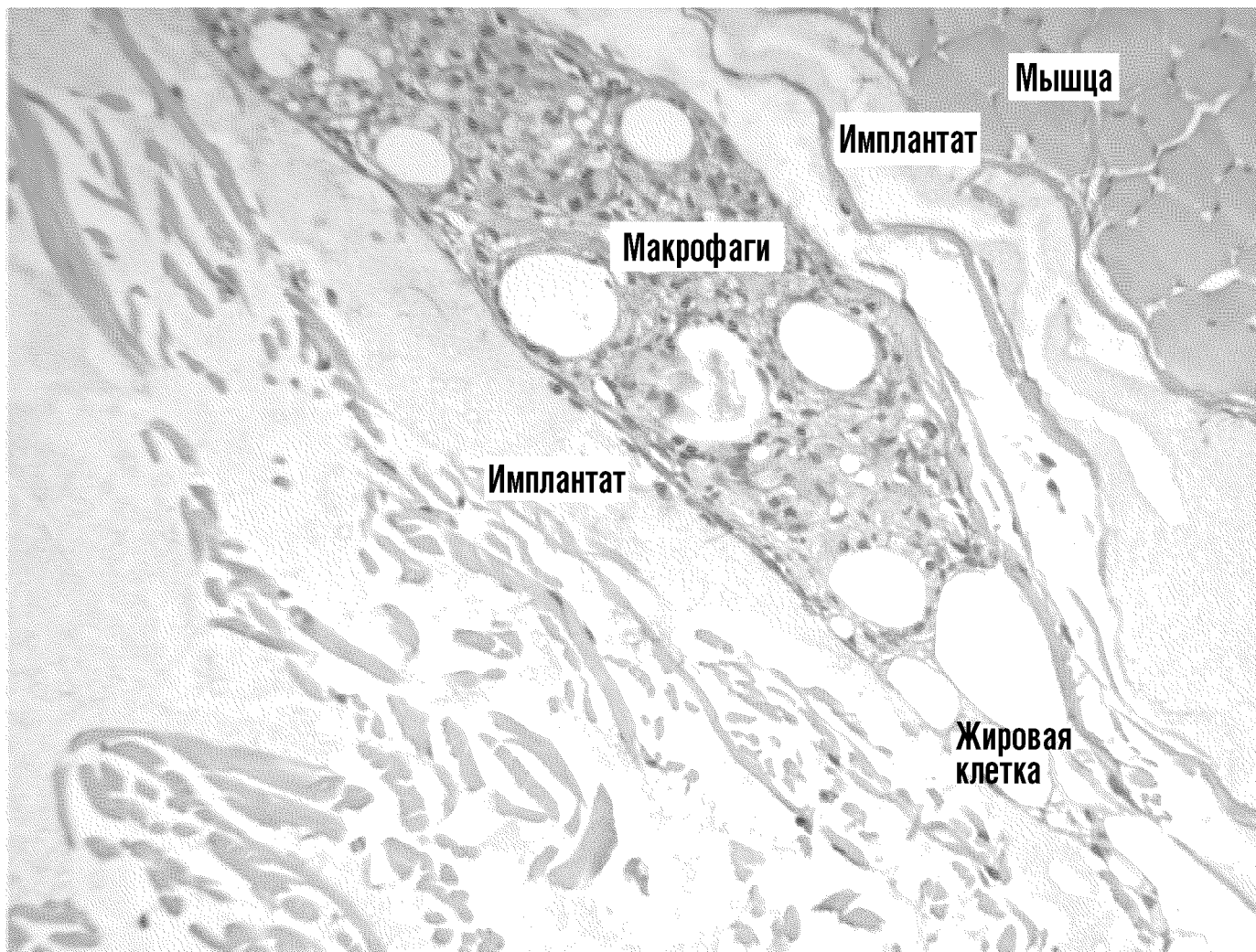
ФИГ.39



ФИГ.40

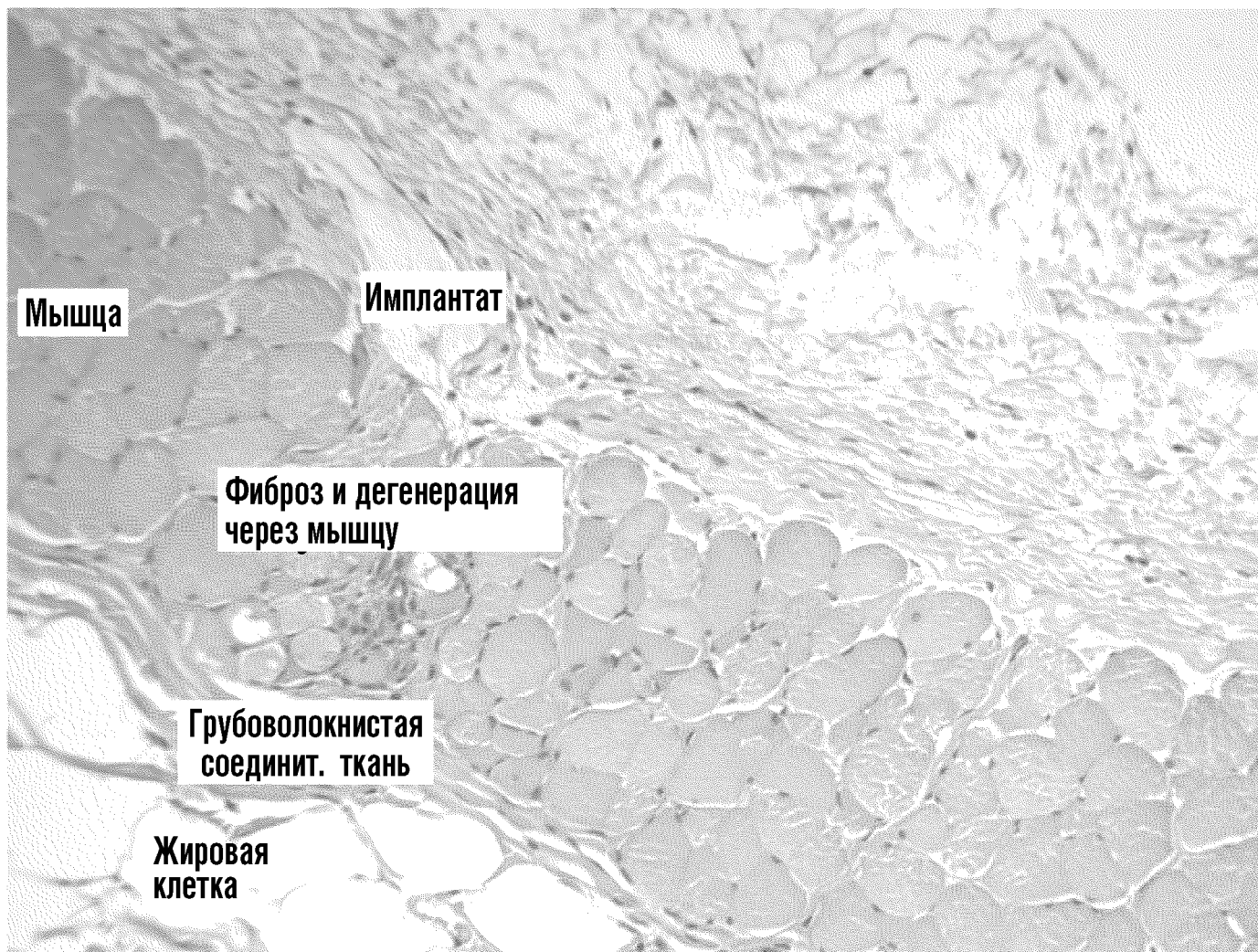


ФИГ.41

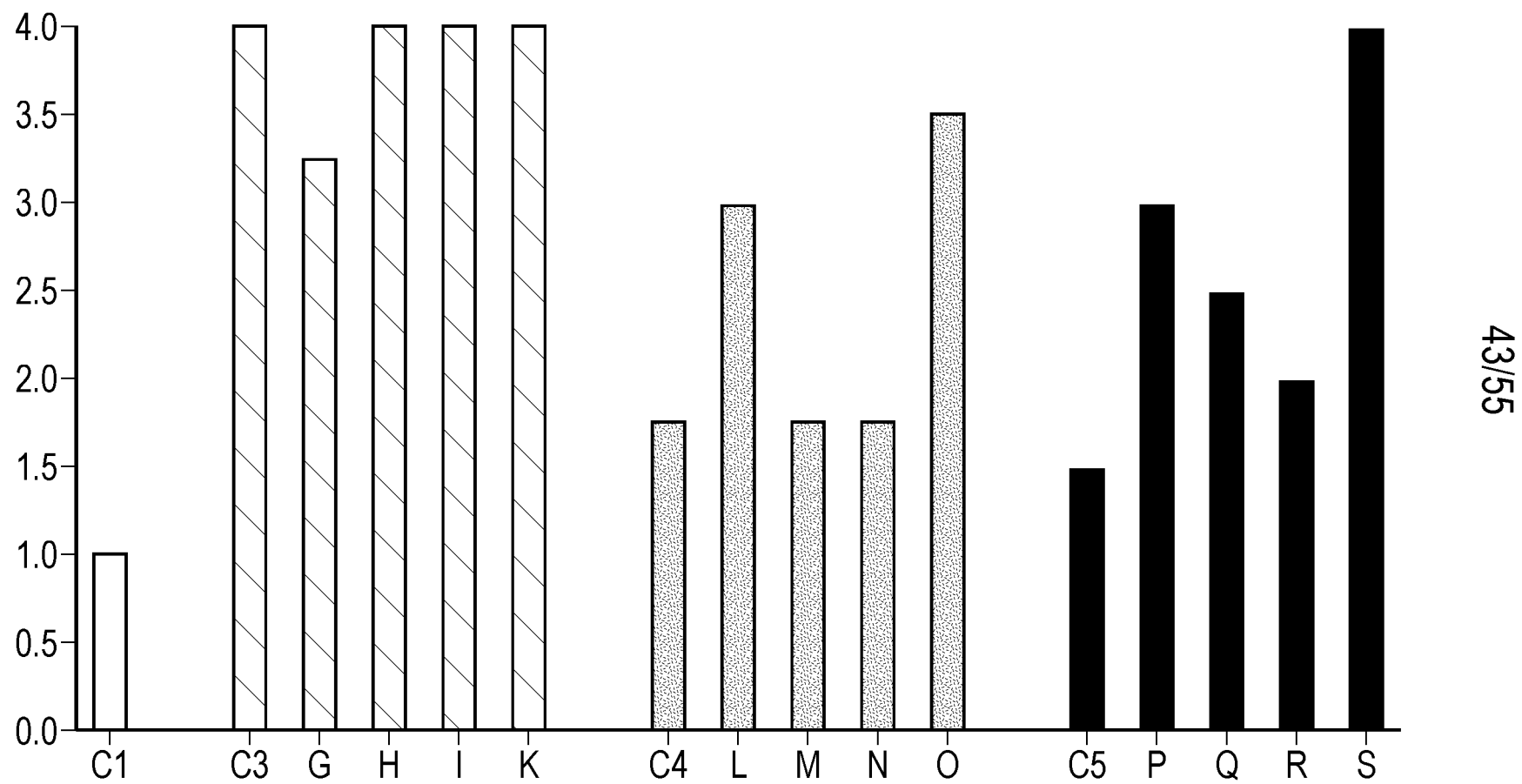




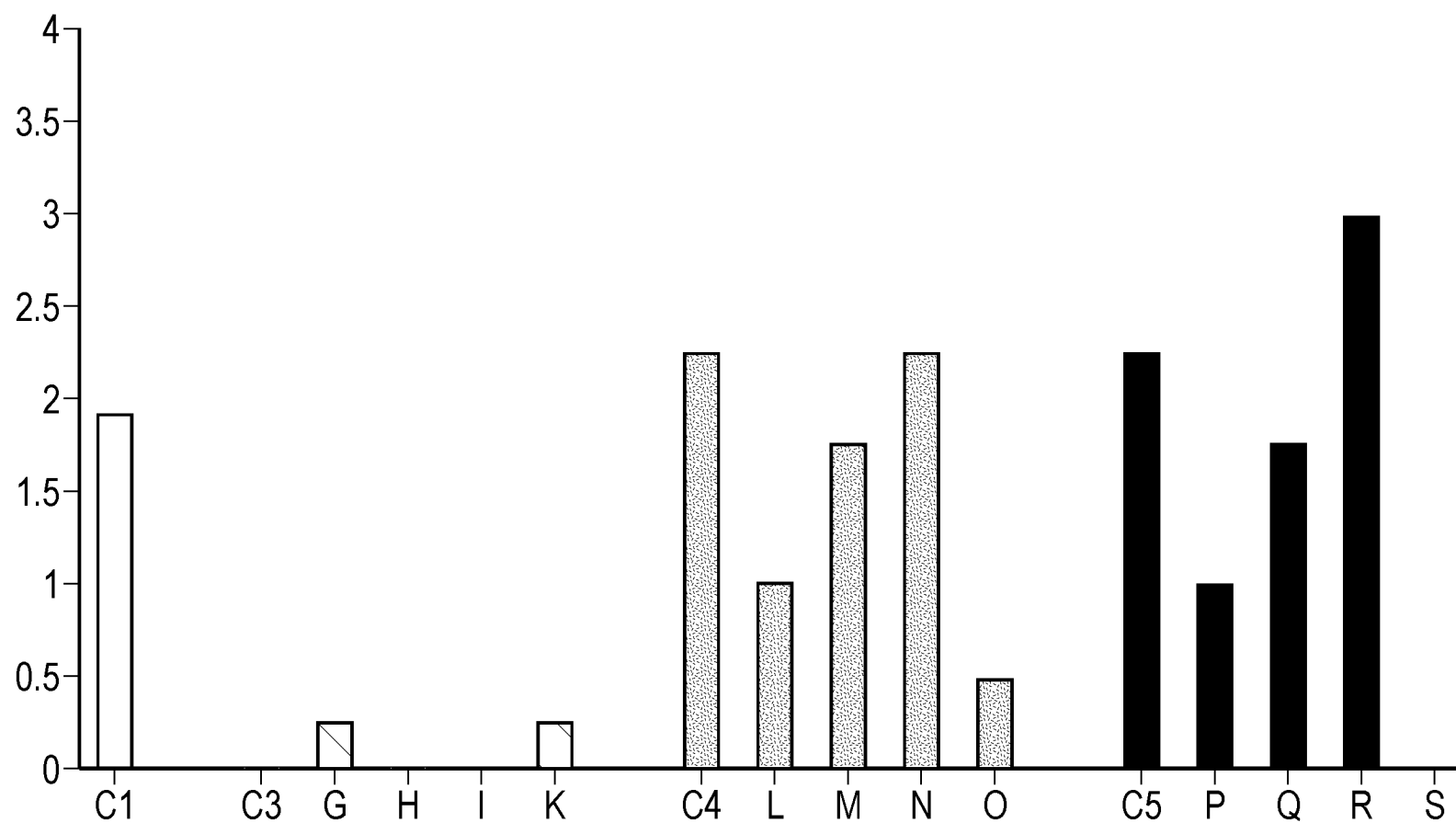
ФИГ.42



ФИГ.43

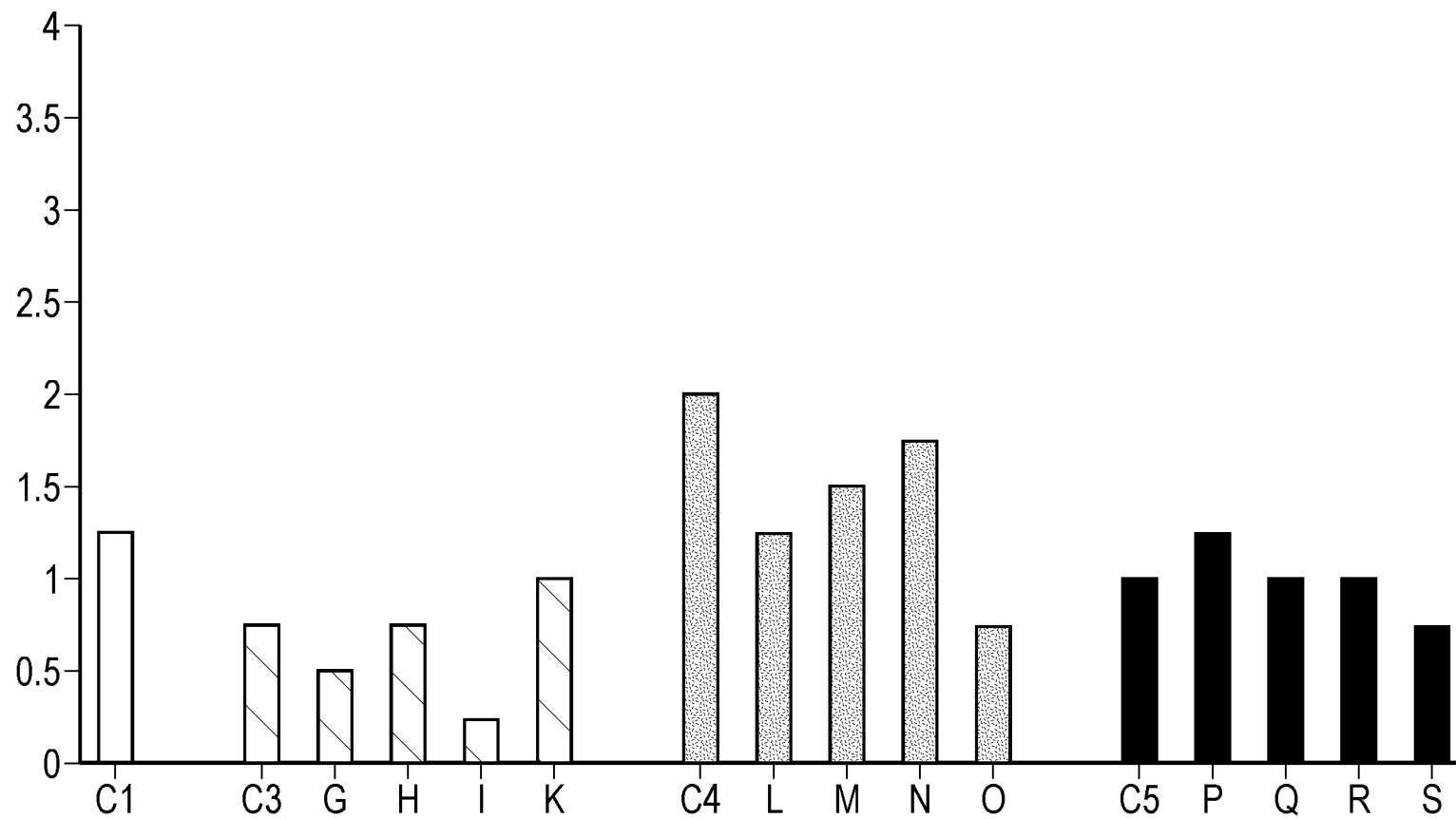


ФИГ.44



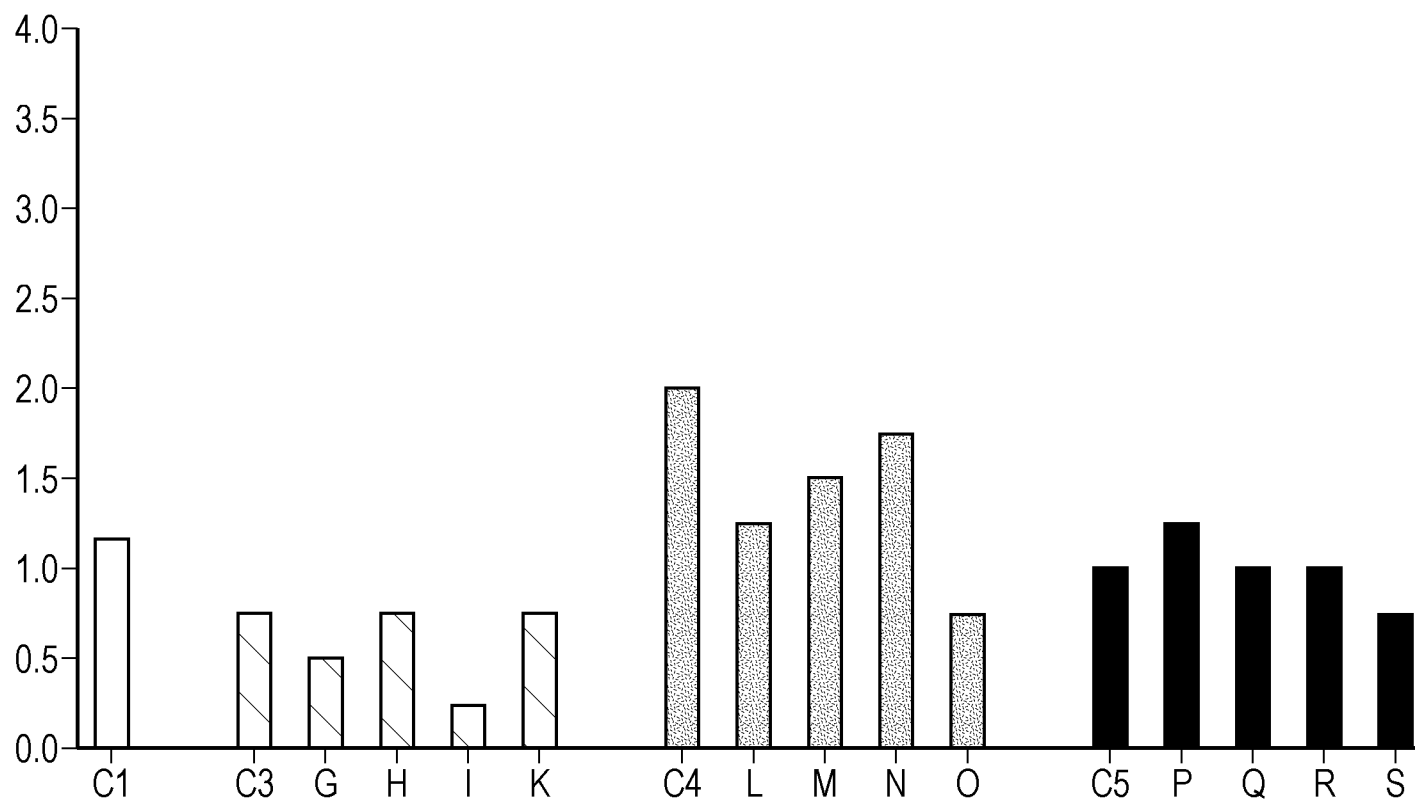
44/55

ФИГ.45



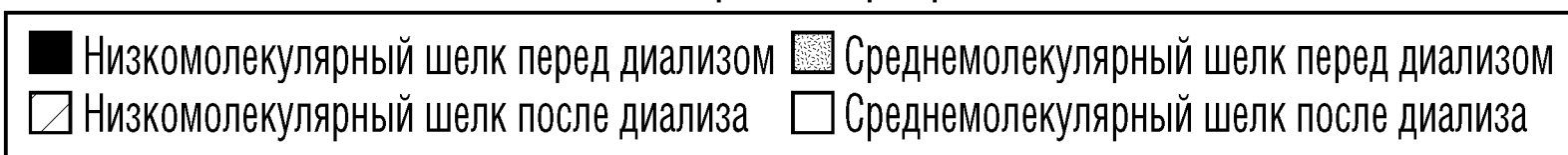
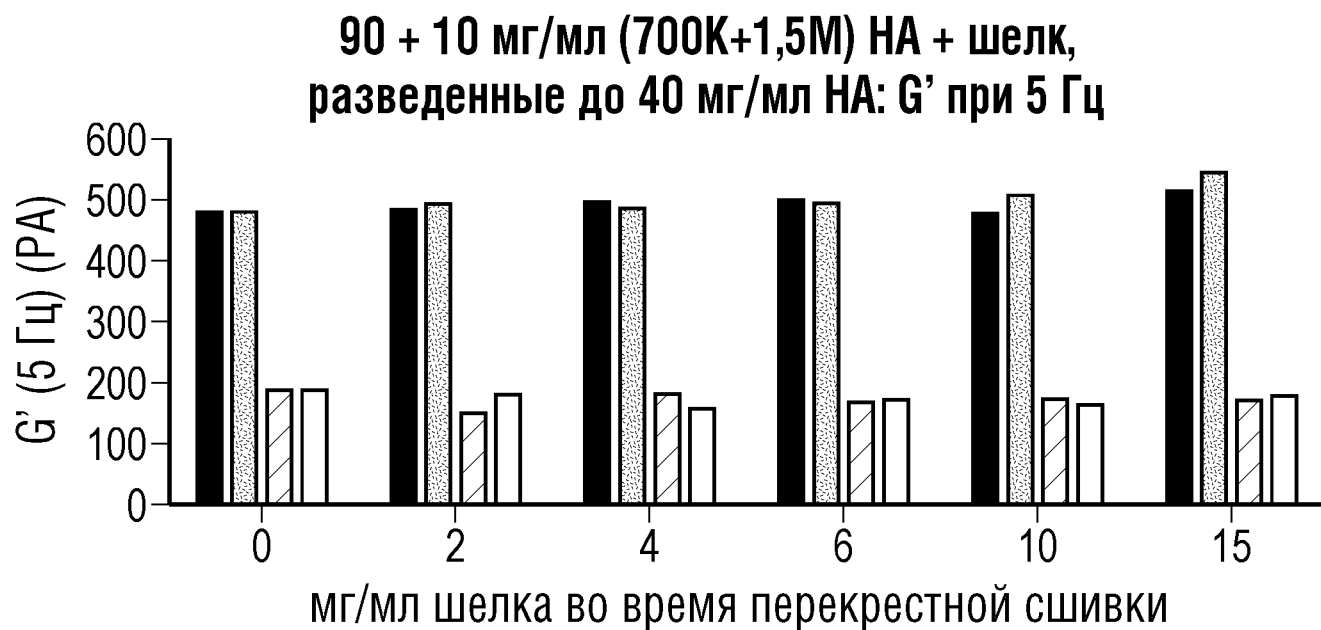
45/55

ФИГ.46

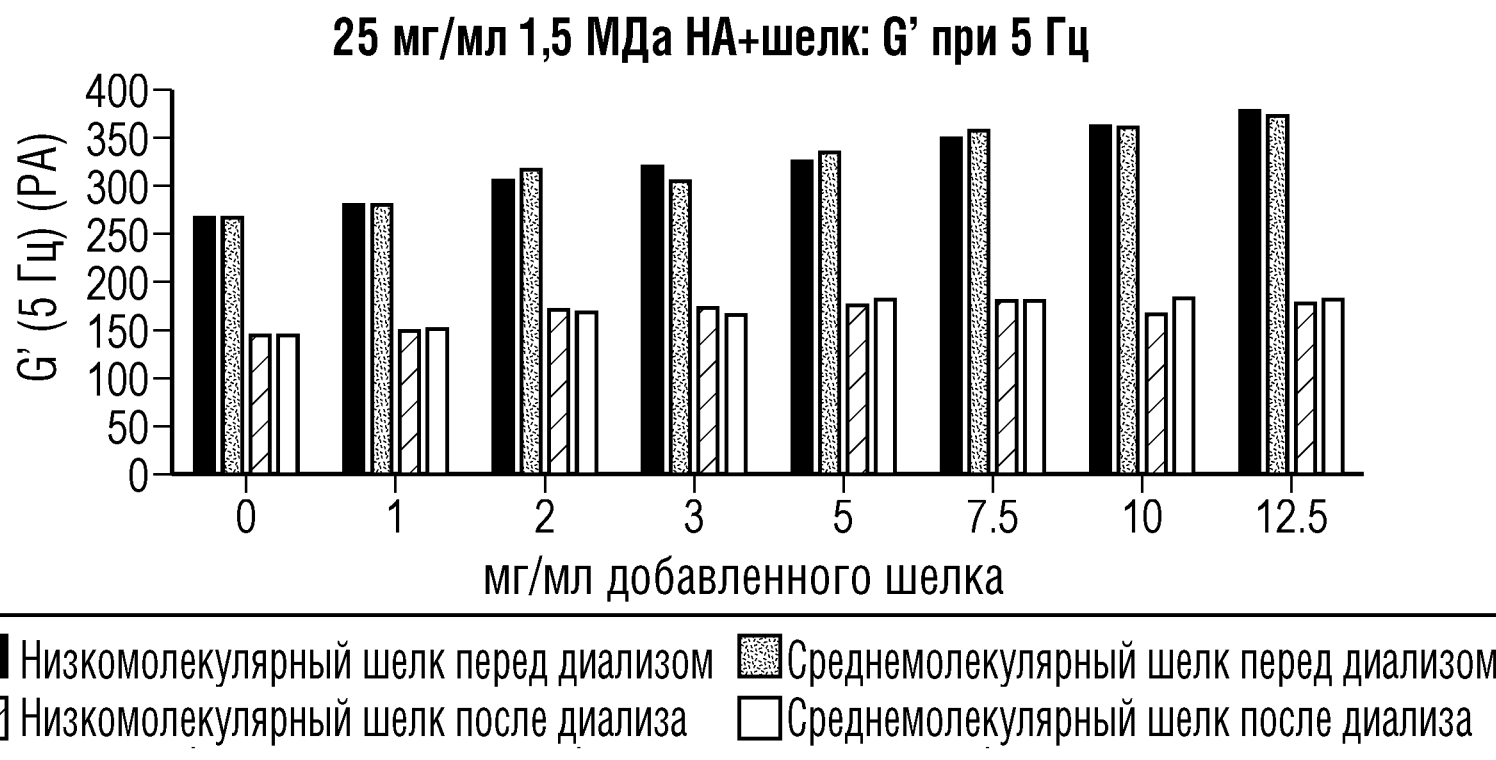


46/55

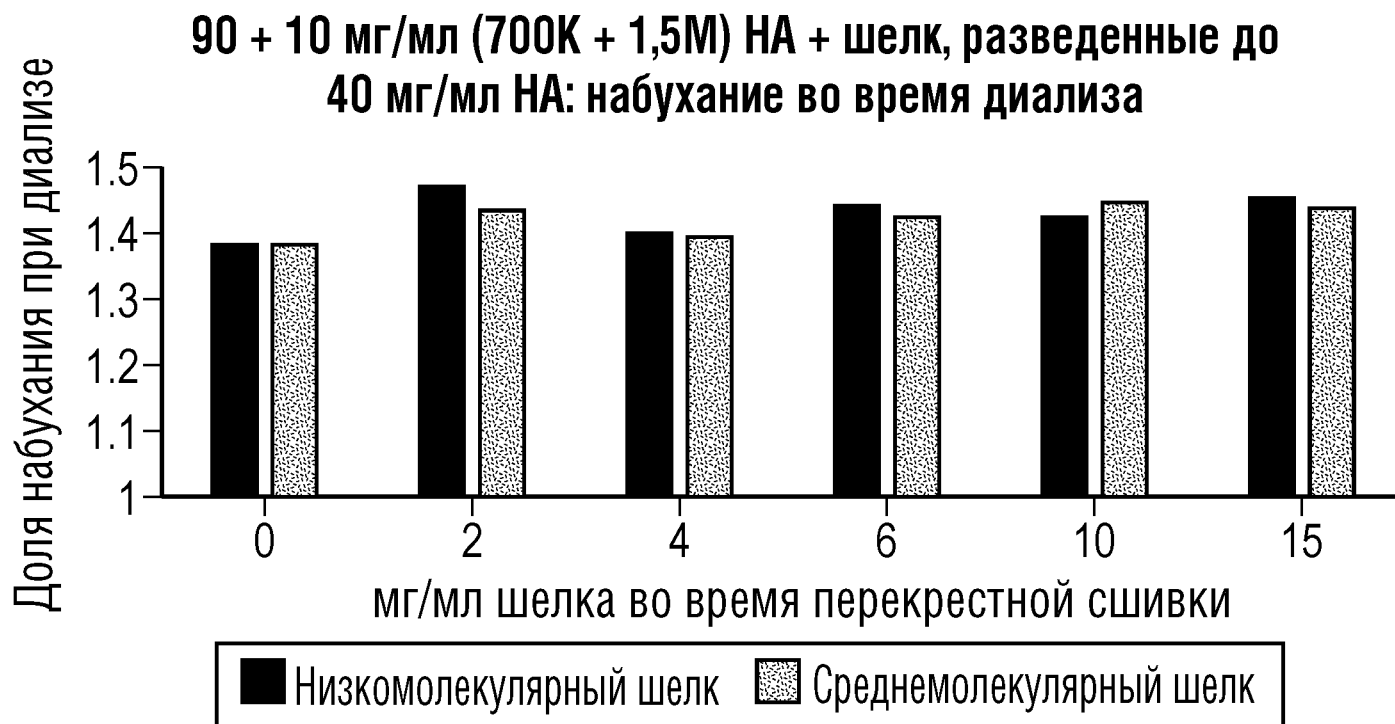
ФИГ.47А



ФИГ.47В

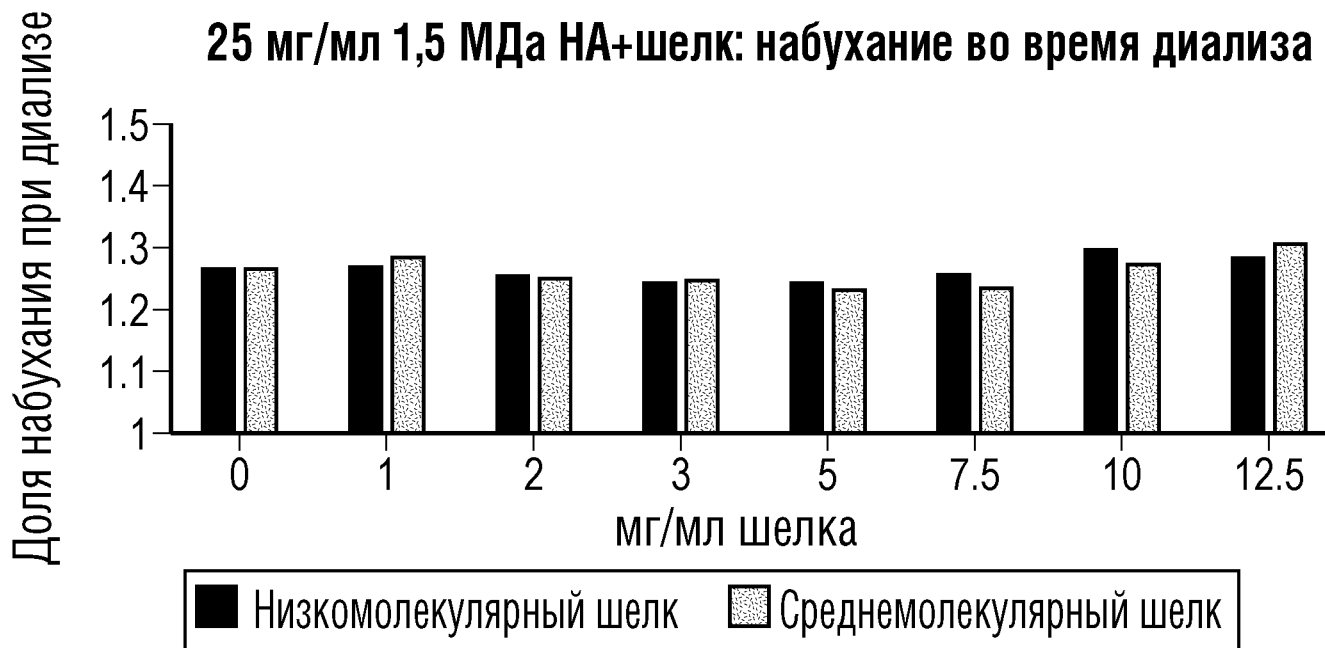


ФИГ.48А

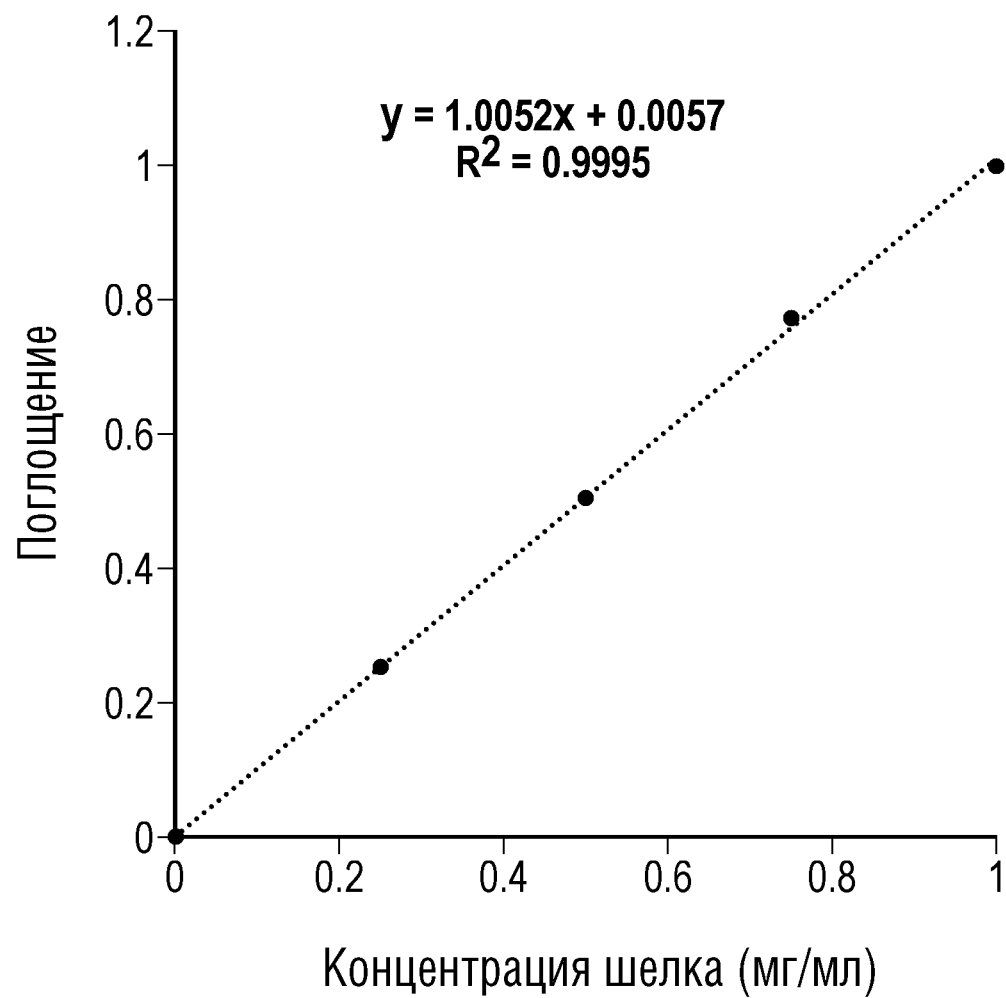




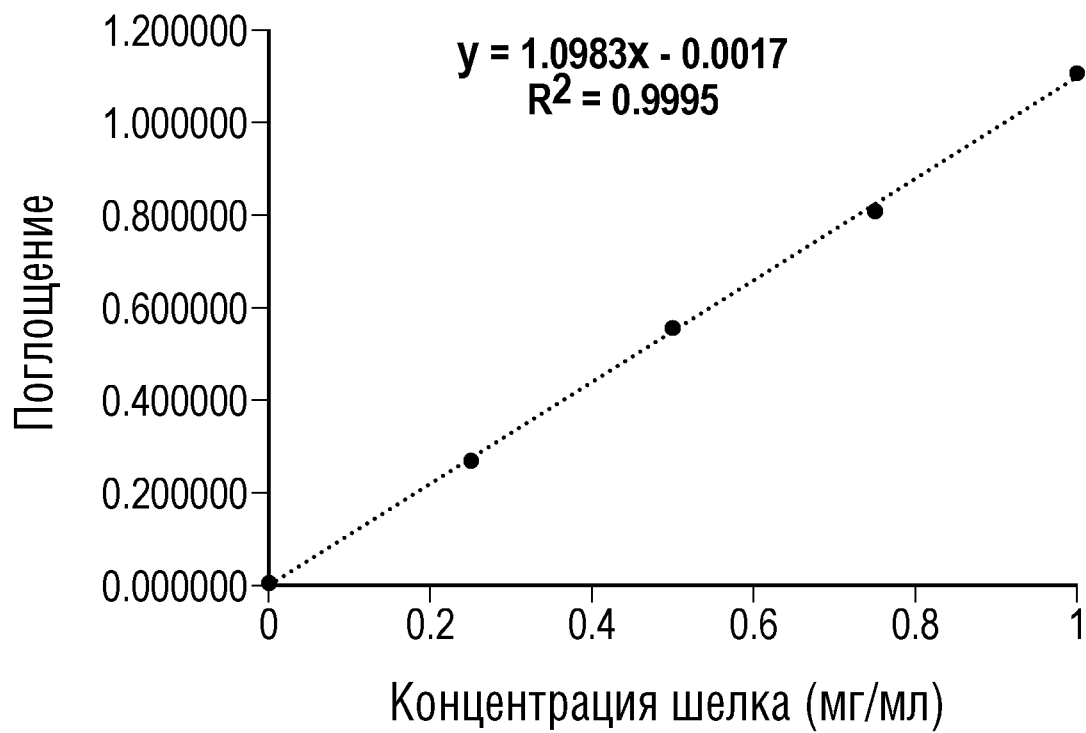
ФИГ.48В



ФИГ.49А

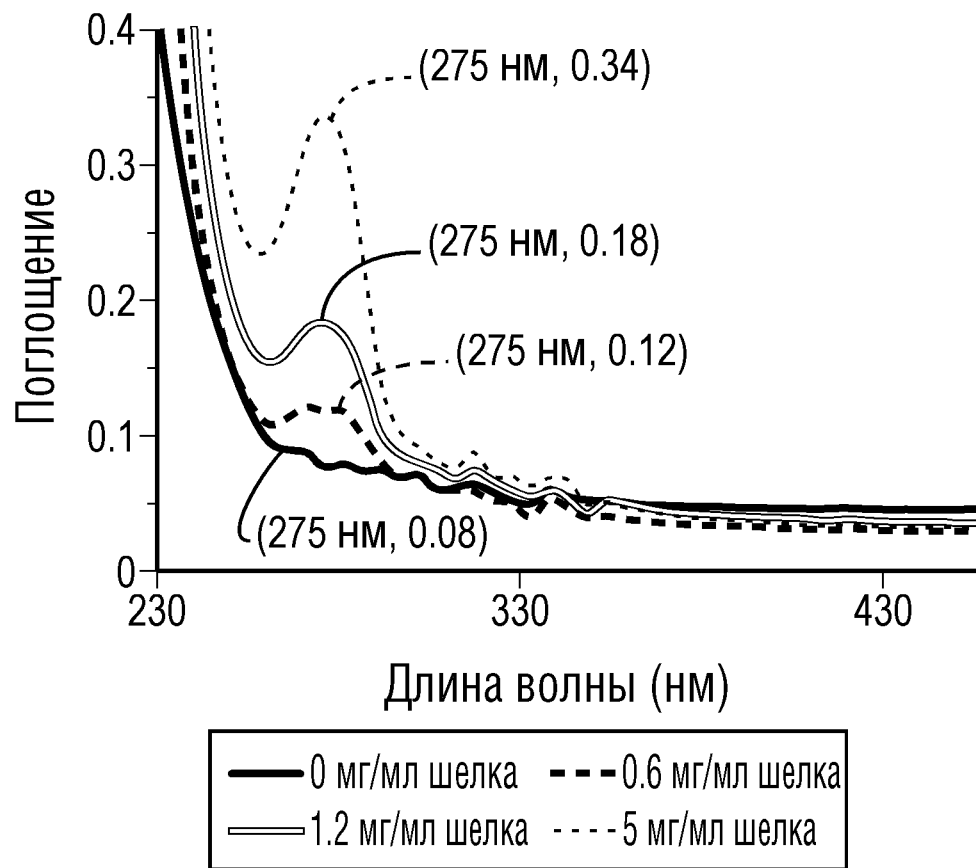


ФИГ.49В



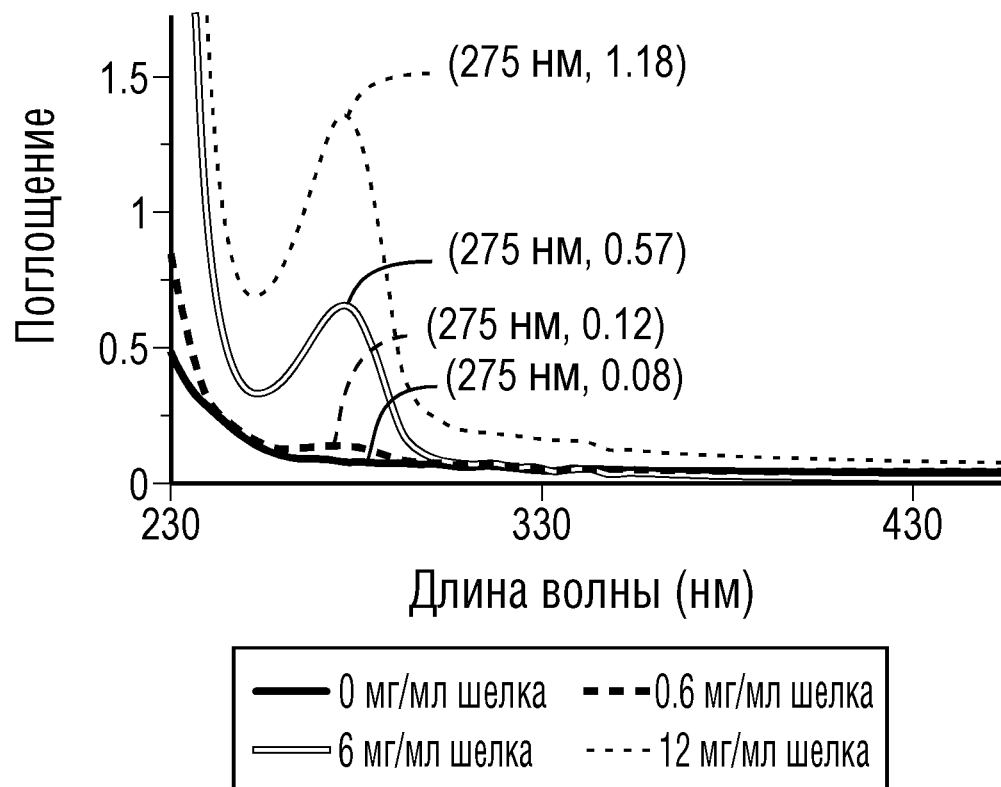
ФИГ.50А

Образцы низкомолекулярного шелка

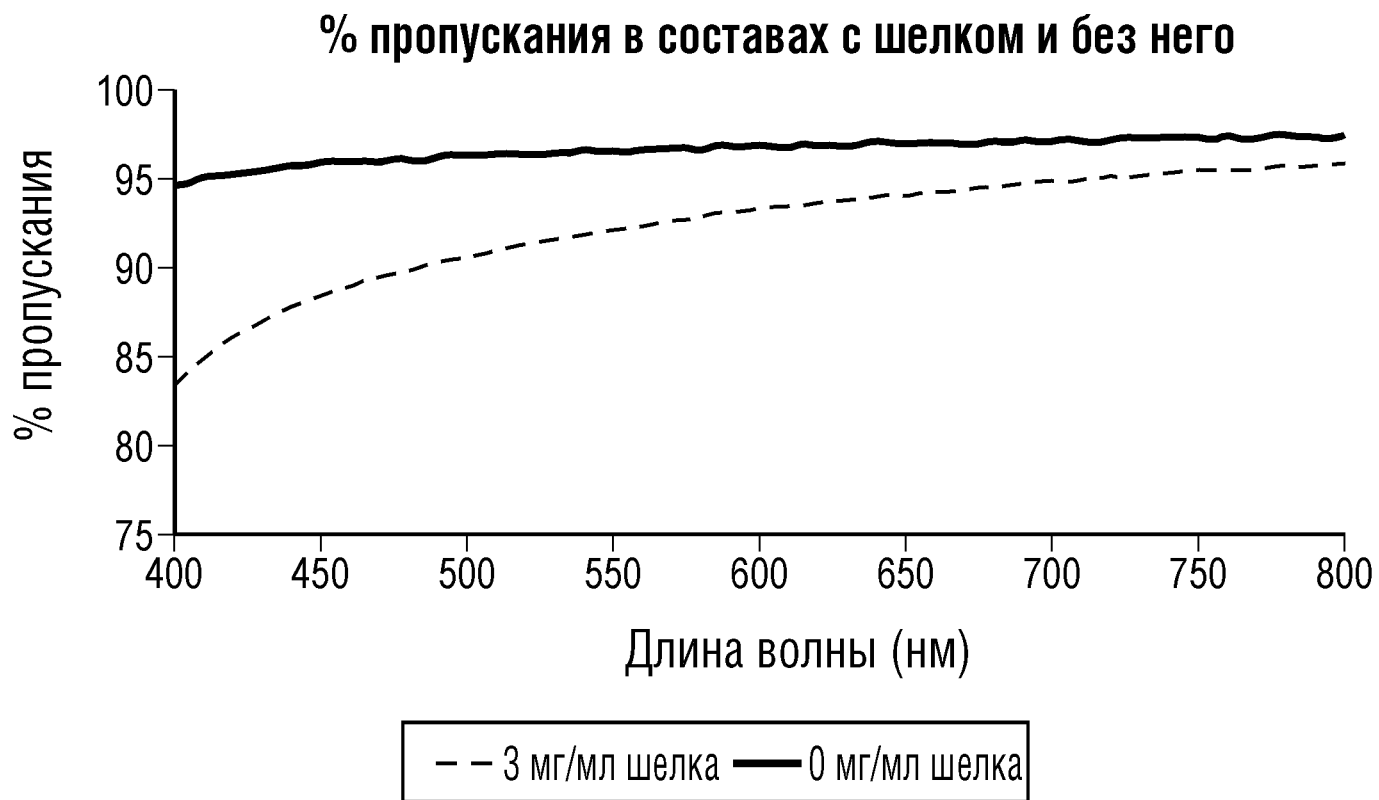


ФИГ.50В

Образцы среднемoleкулярного шелка



ФИГ.51



55/55