

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043436**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.24

(21) Номер заявки
201991679

(22) Дата подачи заявки
2018.10.09

(51) Int. Cl. *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/46 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
C09C 1/30 (2006.01)

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И КОМПОЗИЦИИ КОЖНОГО НАПОЛНИТЕЛЯ,
СОДЕРЖАЩИЕ ГИАЛУРОНОВУЮ КИСЛОТУ И ГИДРОКСИАПАТИТ**

(31) 62/570,189

(32) 2017.10.10

(33) US

(43) 2020.05.26

(86) PCT/IB2018/057822

(87) WO 2019/073386 2019.04.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**Е.Н.А. ИМПЕКАБЛ СКИНКЕА
СОЛЮШНЗ ЛТД (IL)**

(72) Изобретатель:
Двир Хаим (IL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) EP-A1-3156044
DATABASE WPI Week 201774 Thomson
Scientific, London, GB; AN 2017-69881N
XP002788070, & KR 2017 0108194 A (L & C BIO
CO LTD), 27 September 2017, (2017-09-27), abstract
DENG C. ET AL. "Preparation and
mechanical property of poly([epsilon]-caprolactone)-
matrix composites containing nano-apatite fillers
modified by silane coupling agents", JOURNAL
OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN
MEDICINE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS,
BO, vol. 21, no. 12, 1 October 2010,
(2010-10-01), pages 3059-3064, XP019864490,
ISSN: 1573-4838, DOI: 10.1007/S10856-010-4158-6,
the whole document

(57) Описана композиция кожного наполнителя, содержащая полисахарид, химически связанный с помощью связующего агента с гидроксиапатитом в форме частиц (Нар), который предварительно обработан с помощью указанного связующего агента, при этом указанный полисахарид представляет собой гиалуроновую кислоту (НА) или Гепарозан. Также предложен способ получения указанной композиции.

B1

043436

**043436
B1**

Область техники

В общем, изобретение относится к наполнителям мягких тканей и, в частности, к кожным и подкожным имплантируемым наполнителям на основе гиалуроновой кислоты и гидроксиапатита, применяемым по отдельности и в комбинации.

Уровень техники

Кожа состоит из трех слоев, при этом каждый слой выполняет определенные задачи. Наружный тонкий и жесткий слой представляет собой эпидермис. Толщина эпидермиса варьирует от 0,05 мм на веках до 0,8-1,5 мм на подошвах ног и ладонях. Большинство клеток в эпидермисе представляют собой кератиноциты. Новые кератиноциты образуются из клеток в самом глубоком слое эпидермиса, называемом базальным слоем, и мигрируют вверх к поверхности эпидермиса, заменяя старые клетки. Роговой слой, самая наружная часть эпидермиса, представляет собой водонепроницаемый барьер, который препятствует проникновению в организм большинства бактерий, вирусов и химических веществ. Клетки меланоцитов рассредоточены по всему базальному слою и вырабатывают пигмент меланин, который способствует окрашиванию кожи и фильтрует ультрафиолетовое излучение. Эпидермис также содержит клетки Лангерганса, которые являются частью иммунной системы кожи, защищающей организм от инфекции. Под эпидермисом находится дерма. Толщина дермы варьирует от 0,6 мм на веках до 3-5 мм на подошвах ног и ладонях.

Дерма представляет собой толстый слой волокнистой и эластичной ткани, состоящей в основном из коллагена, эластина и фибриллина, которые придают коже ее упругость и прочность. Коллагеновые волокна составляют 70% дермы, придавая ей прочность и твердость, тогда как эластин поддерживает нормальную эластичность и упругость. Кожа содержит нервные окончания, которые ощущают боль, прикосновение, давление и температуру. Кожа содержит потовые железы, которые выделяют пот в ответ на тепло и стресс, способствуя охлаждению тела. Кожа содержит жировые (сальные) железы, которые откладывают жир (кожное сало) в волосяные фолликулы, сохраняя кожу влажной и мягкой. Кожа содержит волосяные фолликулы, которые способствуют регулированию температуры тела, обеспечению защиты от повреждения и усилению чувствительности. Кожа содержит кровеносные сосуды, обеспечивающие кожу питательными веществами и помогающие регулировать температуру тела. Под дермой находится гиподерма, также известная как подкожный жировой слой или подкожная клетчатка. Гиподерма представляет собой слой жира, около 50% жира, содержащегося в организме. Жир содержится в живых клетках, называемых жировыми клетками, которые удерживаются вместе волокнистой тканью. Жировой слой прикрепляет кожу к костям и мышцам и помогает изолировать тело, обеспечивая защитную прокладку и служа в качестве области накопления и хранения энергии.

Старение лица является проявлением динамического процесса, происходящего на протяжении всей нашей жизни вследствие кумулятивного воздействия на кожу, мягкие ткани и черепно-лицевой скелет, которое приводит к появлению на коже поверхностных структурных морщин, топографии и потере объема мягких тканей лица. Последствия такого старения включают гравитационную силу, прогрессирующую резорбцию кости, уменьшение эластичности ткани и перераспределение подкожного жира, и потерю наполненности. На привлекательность лица также могут влиять гормональный дисбаланс, воздействие солнца, эмоциональный стресс, диета, навыки труда, болезни, злоупотребление наркотиками и лекарственными препаратами и курение.

Атрофия кости и динамика роста и потери костной ткани являются причиной старения черепно-лицевого скелета. Резорбция кости может привести к потере биометрического объема, и без структурной поддержки кости лежащие выше мягкие ткани и кожа могут подвергаться значительным изменениям. Например, верхнечелюстная резорбция может привести к потере опоры верхней губы и может привести к смещению жирового тела скулы и, таким образом, способствовать появлению околоротовых морщин и носогубных складок, соответственно. Молодое лицо характеризуется округлой топографией лица благодаря сбалансированному распределению поверхностного и глубокого жира, придающего наполненность мягким тканям. Перераспределение и потеря жира вызывают постепенную потерю поддержки и наполненности мягких тканей, что приводит к опущению мягких тканей, например, к потере жира в области лба, скулы и т. п., и к прибавлению жира в области щек, носогубных складок и т.п.

При рассмотрении внешнего вида и структуры лица удобно разделить лицо на три области, где верхняя треть включает лоб и брови, средняя треть включает среднюю часть лица и нос, а нижняя треть включает подбородок, линию подбородка и шею. Средняя часть лица включает глаза, нос, губы и скулы (центральный треугольник лица), которые наибольшим образом способствуют восприятию эстетики и привлекательности лица.

На верхнюю часть лица, включающую лоб, бровь, висок и область верхнего века, влияет потеря наполненности подкожной ткани, приводящая к появлению лобных морщин.

У молодого человека работа мышц в этой области является относительно скрытой за счет наполненности подкожной ткани лба. При старении человека потеря наполненности приводит к появлению морщин и складок. Впечатление от опущения бровей является результатом потери поддержки бровей в уголках глаз и потери наполненности в верхнем веке.

На среднюю часть лица, включающую глаза, нос, губы и скулы (центральный треугольник лица),

влияет потеря наполненности подкожной ткани. "Гусиные лапки" являются результатом потери наполненности подкожной ткани вокруг круговой мышцы глаза. Кроме того, становится заметной граница круговой мышцы глаза, которая способствует развитию серповидной формы скул над скуловым выступом и носогубной складки. С возрастом происходит ослабление окологлазничной слезной борозды, поскольку количество жира, накопленного в нижнем веке, уменьшается, что приводит к появлению изможденного вида. Потеря наполненности между круговой мышцей глаза и нижним веком приводит к более тесной близости тканей, вызывая появление более темного цвета кожи и усталых, измученных глаз даже после спокойного ночного сна. Темный цвет также может быть связан с отложением меланина в дерме. Носогубные складки возникают из-за опущения жира птозных щек. Нос также подвергается воздействию старения, такого как потеря наполненности в межбровной области, верхненосовой точке и верхней стенке носа (краниальный нос) и опущение кончика носа, создающего иллюзию увеличенной длины носа. Опущенный подбородок также может способствовать впечатлению увеличенной длины носа. С увеличением возраста нижняя часть лица, включающая подбородок, линию подбородка и шею, демонстрирует накопление жира, что приводит к относительному избытку кожи, приводящему к потере четкости линии подбородка. Опущение жира к границе нижней челюсти приводит к образованию обвислых щек. Дефект "двойного подбородка" является результатом опущения неподдерживаемой кожи, подушечки подбородка и направленного вниз растяжения подкожной мышцы шеи, напоминающей горловой мешок индейки. В остальных случаях с возрастом сокращение подкожной мышцы шеи приводит к появлению на шее вертикальных фиброзных связок.

Основной целью при омоложении кожи лица является восстановление топографии лица. Омоложение кожи лица может быть достигнуто с помощью хирургических и нехирургических процедур. Оперативное вмешательство включает широкий ряд процедур от подтяжек до липосакции и пересадки жировой ткани. Методы шлифовки применяют для изменения поверхности кожи, при коррекции последствий старения кожи от воздействия ультрафиолетовых лучей, в том числе мелких и тонких морщинок, неровной пигментации и дефектов кожи. Шлифовку выполняют посредством химического пилинга, микродермабразии и лазерной шлифовкой. В настоящее время пациенты предпочитают нехирургические процедуры, которые могут восстановить объем мягких тканей лица, исправить асимметрию лица или даже улучшить существующие черты лица при обеспечении немедленных косметических результатов и короткого времени восстановления. Это достигается с помощью широкого ряда веществ, которые вводят путем инъекций. Основное применение состоит в обработке морщинок, морщин и складок для компенсации потери объема мягких тканей лица. Такая обработка включает инъекции нейротоксинов (ботулотоксин используют для ослабления мышц и минимизации мимических морщин), наполнителей объема мягких тканей и стимуляторов коллагена.

Гиалуроновая кислота (НА) представляет собой линейный полисахарид природного происхождения, состоящий из повторяющихся дисахаридных звеньев глюконовой кислоты и N-ацетилглюкозамина, попеременно связанных β -1,3- и β -1,4-гликозидными связями, с молекулярной массой (MW) до нескольких миллионов дальтон. (Да). В физиологических условиях НА встречается в своей ионизированной форме в виде гиалуроната с натрием, кальцием и т.п. в качестве противоиона, например, в форме гиалуроната натрия (NaHA). В организме человека она присутствует в высокой концентрации в коже, пуповине и стекловидном теле. НА представляет собой относительно жесткую молекулу вследствие ограничения вращения гликозидной связи из-за объемной N-ацетильной группы, расположенной рядом с гликозидной связью. Природная конформация глюконовой кислоты представляет собой спираль, при этом спиральная конформация дополнительно укреплена за счет водородных связей, образующихся между различными функциональными группами (например, аминогруппой, карбоксильной и гидроксильной группами). Основными источниками НА для промышленных масштабов являются животные ткани, такие как гребень петуха, которые требуют интенсивной очистки, и микробная ферментация стрептококком, такая как ферментация бактериями *Streptococcus zooepidemicus* для получения НА.

НА характеризуется значительными структурными, реологическими, физиологическими и биологическими функциями. НА обладает способностью поглощать большие количества воды и характеризуется способностью удерживать влагу с образованием высоковязкоупругого вещества в водном растворе. Благодаря своей абсорбционной способности и вязкоупругой природе в сочетании с отсутствием у нее иммуногенности и токсичности указанная кислота может заполнять, покрывать, смазывать ткани и выдерживать механическое воздействие в тканях. Соответственно, НА находит различные применения в косметической, биомедицинской, фармацевтической и пищевой промышленности. Хотя она обладает биологической совместимостью, НА является биоразлагаемой и легко разрушается ферментами, такими как гиалуронидаза (ферментативное разложение), что приводит к относительно короткому времени пребывания в тканях. Гиалуроновая кислота имеет период полураспада менее одной недели. Кроме того, НА не способна выдерживать повышенную температуру в течение какого-либо значительного периода времени. Она подвергается термическому разложению, что означает, что она разлагается под действием свободных радикалов посредством гидролиза. Например, молекулярная масса НА, находящейся в водном растворе в условиях автоклавирования при 121°C в течение нескольких минут, демонстрирует значительное снижение. При температуре выше 60°C происходит экспоненциальное ускорение уменьшения

MW. Помимо ферментативного, термического и радикального разложения НА подвергается механическому разложению, например, разложению под действием сил сдвига. Все перечисленные выше типы разложения обеспечивают относительно короткое время пребывания в тканях.

Химическая модификация, функционализация или дериватизация НА органическими группами позволяет контролируемым способом изменять химические и физические свойства НА с получением нового биоматериала с новыми требуемыми и улучшенными свойствами. В зависимости от типа и степени модификации модифицированная НА представляет собой другое химическое вещество, отличное от исходной НА, и, таким образом, может быть менее натуральной, биосовместимой, и даже ее биологическое поведение может измениться. Несмотря на это, следует оценивать выгоду и результат, при котором такая модификация позволяет выступать ей в качестве медицинского средства. Например, НА имеет низкую растворимость в органических растворителях.

Реакция со спиртами может изменить липофобные свойства НА и придать ей более липофильные свойства, повышая, тем самым, ее растворимость в органических растворителях. Поскольку производное НА является менее растворимым в воде, оно, возможно, увеличивает время пребывания *in vivo*. Кроме того, такое производное может характеризоваться улучшенным взаимодействием с молекулами, например, лекарственными препаратами. Другим примером является сшитый гидрогель НА, применяемый в качестве косметического имплантата, при этом косметический кожный наполнитель, который вводят в кожу для наращивания (аугментации) ткани, увеличения объема и уменьшения морщин, служит для увеличения времени пребывания НА *in vivo*, что имеет решающее значение с точки зрения ее клинической эффективности.

Молекулярная масса (MW) молекулы НА, применяемой для косметических целей и целей наращивания, обычно составляет примерно от сотен тысяч до нескольких миллионов Да. Несшитая НА, которую можно использовать в качестве кожного наполнителя, имеет высокую MW, что позволяет поддерживать стабильность *in vivo*, но является слишком вязкой для введения путем инъекции через иглу малого калибра (обычно относящейся к иглам с калибром от 27G (по шкале Гейдж) и выше, на практике до 30G), тогда как НА с низкой MW легко инъецируется, но лишена стабильности. Одним из способов преодоления этого недостатка является химическая модификация в виде сшивания. Химическое сшивание НА достигается путем взаимодействия несшитой НА со сшивающим агентом с образованием бесконечной трехмерной (3D) сетки НА, которая больше не является водорастворимой в воде в водной среде, содержащей гидрогель НА, обладающий улучшенной стабильностью *in vivo*. В то же время такая стадия химической реакции или модификации добавляет дополнительные стадии к процедуре химической обработки реагента и очистки продуктов реакции. Обычно химические реагенты растворимы в воде, и химические реакции и процедуры очистки выполняют в водной среде. Как было указано выше, следует оценивать выгоду и результат, при котором такая модификация позволяет выступать ей в качестве медицинского средства. Исходя из этого утверждения, сшитый гель НА позволяет преодолеть недостатки несшитой НА и может использоваться в качестве кожного наполнителя, для наращивания ткани в косметических целях, такого как наращивание ткани лицевой области путем увеличения объема ткани лицевой области, коррекции морщин и складок и восстановления гладкой поверхности лица.

Гидроксиапатит (НАр) имеет следующую химическую формулу: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (соотношение Ca/P = 1,67). НАр представляет собой керамический материал в форме частиц на основе фосфата кальция. НАр встречается в природе в виде геологических отложений и в обычных биологических тканях, таких как кость, хрящ, эмаль, дентин и зубной цемент позвоночных животных, а также во многих местах патологических кальцификаций, таких как кровеносные сосуды и кожа. 75 мас. %, (все проценты приведены в массе на массу, если не указано иное) человеческой кости состоит из биоапатита, который придает кости ее жесткость и устойчивость к механической нагрузке. Морфология биоапатита представляет собой плоские удлиненные зерна с гексагональной структурой.

НАр представляет собой имплантируемый материал, термодинамически стабильный в физиологических условиях, который обладает превосходной биологической совместимостью (нетоксичный, неиммуногенный) и биологической активностью, возможностью стимулировать образование клеток и репарацию тканей. Он может стимулировать клеточную реакцию, синтез коллагена, использоваться в качестве средства трансформации клетки, носителя для доставки генов и т.п. НАр находит применение в технологиях тканевой инженерии, например, в качестве материала-заменителя костей и зубов для целей пластических операций и реплантации. Существует много описанных способов синтеза НАр, включая плазменное распыление, гидротермальный синтез, лиофилизацию, золь-гель, фазовое превращение, механохимический синтез, химическое осаждение и т.д. Морфология описанного синтетического НАр представляет собой либо моноклинные, либо гексагональные кристаллиты, при этом ключевыми факторами для медицинских целей являются соотношение Ca/P и размер зерен порошка. Как правило, размер частиц порошка НАр составляет от 10 мкм до 100 мкм. Размер частиц нанопорошковой формы НАр обычно составляет от 1 нм до 100 нм. Как правило, частицы НАр в кожном наполнителе являются круглыми, единообразными, гладкими с низкой удельной поверхностью. Тем не менее, частицы НАр могут иметь неправильную форму, могут быть пористыми, полыми, цветковидными пористыми полыми микросферами или иметь любую другую подходящую форму с высокой удельной поверхностью.

В общем случае, кожные и подкожные наполнители на основе НА содержат НА с молекулярной массой примерно от сотен тысяч до нескольких миллионов Да, необязательно с двух- или полифункциональным сшивающим агентом, образующим ковалентные связи с НА в щелочных или кислотных условиях. Например, диэпоксиды, такие как диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (BDDE) и диглицидиловый эфир 1,2-этандиола (EDDE), в щелочных условиях взаимодействуют с гидроксильной группой с образованием простой эфирной связи, тогда как в кислотных условиях в реакции, протекающей вместо этого, образуется сложный эфир. Наиболее распространенные кожные наполнители, существующие на рынке, были сшиты с помощью таких сшивающих агентов, как BDDE и дивинилсульфон (DVS). Тем не менее, для сшивания в прямой реакции с НА могут использоваться любые другие двух- или полифункциональные сшивающие агенты, в том числе, но не ограничиваясь ими, эпоксидные соединения, DVS, формальдегид, полиазиридин, аминокислоты или сложные аминоэфиры, карбодиимиды и т.д. НА можно сшить с помощью двух- или полифункциональных молекул в качестве боковых групп, которые, с одной стороны, связываются с НА, а с другой стороны, для связывания обоих концов боковых групп используют дополнительный отдельный двух- или полифункциональный сшивающий агент или несколько сшивающих агентов в сырье.

Кроме того, сшивающий агент может содержать несшитую НА с молекулярной массой примерно от сотен тысяч до нескольких миллионов Да, что позволяет облегчить экструзию через иглу малого калибра. Кроме того, он может содержать одну или более активных добавок, каждая из которых обладает своим собственным уникальным свойством, такие как анестетики, антиоксиданты, витамины и т.п. Не ограничиваясь ими, но некоторыми примерами являются лидокаин, маннитол, витамин С и т.п., соответственно. Концентрация НА в кожном наполнителе на основе НА может составлять от 1 мг/мл до 50 мг/мл и, более конкретно, до 15-30 мг/мл, при этом каждая концентрация является наиболее подходящей для конкретной области в отношении наполнения и наращивания ткани.

Типичная методология получения кожного наполнителя на основе сшитой НА включает несколько основных стадий, известных специалистам в данной области. Первая стадия представляет собой гидратирование сухой ГК. Следующей стадией является введение НА в сшивающий агент для сшивания НА в щелочной или кислой среде. Следующая стадия включает удаление остаточного сшивающего агента обычно посредством диализа и набухание сшитой НА с применением очищенной воды или фосфатно-буферного раствора (PBS). Например, диализ проводят в диализном мешке с отсечкой по молекулярной массе 12000 в течение нескольких дней до тех пор, пока большая часть остаточного сшивающего агента не будет удалена. Следующая стадия включает добавление активных добавок и добавление несшитой НА и гомогенизацию всей композиции. Следующая стадия включает стерилизацию для завершения процесса получения кожного наполнителя на основе НА с подходящими свойствами кожного наполнителя, такими как реологические свойства, сила экструзии, pH, осмолярность и т.п.

В общем случае, кожные наполнители на основе НАр содержат частицы микросфер НАр в количестве до 60% мас./мас., которые гомогенно суспендированы в высоковязкой жидкости или геле, действующем в качестве материала-носителя. Как правило, частицы НАр в кожном наполнителе являются круглыми, единообразными, гладкими, с низкой удельной поверхностью и имеют диаметр приблизительно от 10 до 100 мкм, наиболее предпочтительно от 25 до 50 мкм. В одном из примеров микросферы НАр суспендированы в носителе, состоящем из карбоксиметилцеллюлозы (СМС), глицерина и воды. В другом примере микросферы НАр суспендированы в носителе, состоящем из НА и воды. В еще одном примере микросферы НАр суспендированы в носителе, состоящем из сшитой НА, описанной выше, при этом микросферы НАр добавляют во время или после процесса сшивания НА. Указанные композиции и относительные концентрации ингредиентов известны специалистам в данной области техники, например, общая концентрация НАр в таких композициях составляет 55,7% мас./мас., или менее. Во всех примерах микросферы НАр суспендированы в высоковязкой жидкости или геле, при этом реальная связь между НА и НАр отсутствует. Носитель выступает в качестве инструмента для переноса микросфер НАр в заданную область для наполнения и наращивания ткани, а также для предотвращения агрегации микросфер как в шприце, так и в организме. Такой носитель служит для предотвращения осаждения НАр и разделения фаз. Кроме того, для удержания микросфер в пределах требуемого места следует предотвратить их рассеивание в области инъекции.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции кожного наполнителя, содержащей полисахарид, химически связанный с помощью связующего агента с гидроксиапатитом в форме частиц (НАр), который предварительно обработан с помощью указанного связующего агента, при этом указанный полисахарид представляет собой гиалуроновую кислоту (НА) или Гепарозан.

Необязательно, предложенные кожные наполнители можно применять для улучшения наращивания ткани лицевой области путем увеличения объема ткани лицевой области, коррекции морщин и складок и восстановления гладкой поверхности лица.

Комбинация НА, химически прикреплённой к поверхности НАр, обладает синергетическим эффектом, обеспечивающим продолжительное наращивание ткани благодаря более медленному разложению обоих компонентов без снижения их внутренней способности функционировать в качестве компонентов

омоложения кожи.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения указанной композиции, включающему:

модификацию поверхности указанного НАр в форме частиц с помощью связующего агента; и химическое связывание указанного полисахарида с указанным НАр в форме частиц, при этом указанный НАр в форме частиц находится в форме микрочастиц.

Эти и другие аспекты и преимущества изобретения могут быть более легко поняты и оценены с помощью настоящего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

В настоящем документе предложенное изобретение описано только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые чертежи. В целом, с конкретной ссылкой на подробные чертежи подчеркивается, что показанные особенности приведены в качестве примера и только в целях иллюстративного обсуждения вариантов реализации изобретения и представлены для обеспечения описания, которое, как полагают, представляет собой наиболее полезное и легко понимаемое описание принципов и концептуальных аспектов изобретения. В связи с этим не предпринимается попытки показать структурные детали настоящего изобретения более подробно, чем это необходимо для фундаментального понимания изобретения, при этом такое описание в сочетании с чертежами делает очевидным для специалистов в данной области техники, как различные формы изобретения могут быть реализованы на практике.

На чертежах:

на фиг. 1 показаны необработанные микросферы НАр под SEM (сканирующим электронным микроскопом);

на фиг. 2 показаны обработанные микросферы НАр под SEM после обработки 3-глицидокси пропилтриметоксисилоном.

Подробное описание изобретения

Согласно предшествующему уровню техники микросферы НАр добавляют к носителю, который представляет собой высоковязкую жидкость или гель. В одном из примеров микросферы НАр добавляют к сшитой НА, при этом она опять выступает в качестве носителя. Комбинация как НА, так и НАр оказывает аддитивный, а не синергетический эффект. Аддитивный эффект заключается в следующем: микросферы НАр медленно разлагаются без реакции на чужеродные тела и служат в качестве каркаса для естественного роста тканей и гидратирования НА и поддержки внеклеточного матрикса. Синергетический эффект между НА и НАр совсем неочевиден вследствие того, что сшитая сетка НА и микросферы НАр образуют простую смесь, в которой гель НА представляет собой непрерывную фазу, а микросферы НАр представляют собой дисперсную фазу. В такой простой смеси каждый компонент сохраняет свои собственные свойства без проявления синергетического эффекта.

Кроме того, было заявлено, что добавление НАр к НА перед сшиванием может привести к образованию инкапсулированной структуры, состоящей из следующей структуры НАр, инкапсулированного посредством НА. Было заявлено, что такая инкапсулированная структура может замедлять разложение НАр, поскольку НА, пока не произойдет его разложение, выступает в качестве щита, который может препятствовать разложению НАр. Опять-таки, это неочевидно вследствие того, что в таких композициях известного уровня техники отсутствует реальная связь между НАр и НА.

Во-первых, в идеальном состоянии или идеальной системе, состоящей из НАр, инкапсулированного посредством НА, существует определенный механизм защиты от разложения НАр с помощью инкапсуляции НА до тех пор, пока такая инкапсуляция не будет нарушена. Такое идеальное состояние будет иметь место в зависимости от толщины капсулирования. Однако даже в таком идеальном состоянии отсутствует механизм защиты от разложения НА. И, во-вторых, такая система не является идеальной, поэтому, как следствие, большая часть микросфер НАр не инкапсулирована. Состояние микросфер варьирует от частичного покрытия НА до отсутствия НА-капсулирования микросфер НАр. Не желая ограничиваться единственной гипотезой, это, вероятно, связано с тем, что микросферы НАр на порядки больше, чем цепи НА (расстояние от конца до конца).

В композициях известного уровня техники такие короткие цепи перемешиваются, образуя локальные 3D-микросетки, которые необязательно захватывают микросферы НАр, что приводит к образованию некоторого количества инкапсулированных микросфер НАр и некоторого количества неинкапсулированных микросфер НАр. Большинство инкапсулированных микросфер НАр, вероятно, неинкапсулированы из-за их относительного размера, как описано выше. Опять-таки, такой результат можно рассматривать как простое смешивание, а не подлинная инкапсуляция.

Таким образом, можно инъектировать в одну и ту же область разные кожные наполнители на основе НА и НАр по отдельности для достижения такого же положительного эффекта, что и от смешивания, что обычно и делается. Кроме того, простое добавление в сшитую НА микросфер НАр с высокой концентрацией оказывает дополнительный негативный эффект, связанный с влиянием вязкости и высокой силой экструзии по сравнению с носителем на основе несшитой НА. Для преодоления указанной проблемы простым решением является снижение концентрации микросфер НАр. Тем не менее, повторное применение различных типов кожных наполнителей в одной и той же области может помочь в преодолении

этой проблемы.

Для достижения синергетического эффекта как НА, так и НАр желательно получить композицию на основе НА, содержащую НАр в качестве добавки. Композитный материал рассматривают как смесь нескольких добавок, обладающих разными и отличающимися функциональностями, и полимерной матрицы, которая соединяет и связывает их вместе с целью получения материала на основе полимера с улучшенными свойствами, значительно превышающими собственные свойства полимера, или для придания ему новых свойств. Свойства композитного материала на основе НА зависят не только от фракционного объема микросфер НАр, но также от химических и физических взаимодействий с гелем НА, таким как полимерная сетка, и от межфазных параметров (совместимость, смачиваемость и связывание, которые в совокупности описаны в настоящем документе как "адгезия"). Адгезия важна для обеспечения улучшенных свойств композитного материала. Кроме того, улучшенная адгезия также будет способствовать лучшему диспергированию добавки в сетке.

Связующий агент определяют как соединение, которое обеспечивает, с классической точки зрения, химическую связь между двумя разнородными материалами, обычно неорганическим материалом и органическим материалом, как в случае НА и НАр.

Связующие агенты также могут обеспечивать и другие взаимодействия, помимо химической связи, между двумя разнородными материалами, такие как ионные взаимодействия, водородные связи и т.д., вплоть до слабых ван-дер-ваальсовых (VDW) взаимодействий. В качестве одного из примеров, связующие агенты можно применять во время смешивания полимера и добавки. В другом примере связующий агент можно применять для поверхностной модификации добавки или в качестве новой функциональной группы, введенной в полимерную цепь, с последующим взаимодействием с другим фрагментом, а также использовать их комбинации. Все перечисленное выше рассматривают в качестве способов повышения адгезии между полимером и добавкой. Увеличенные адгезионные силы между добавкой и полимером изменяются в диапазоне от сильных химических связей или электрического притяжения до слабых VDW взаимодействий.

Возможно применение любого механизма связующего агента, как описано выше, но наиболее целесообразным вследствие чувствительности НА является применение модификации поверхности, такой как термическое разложение, разложение под действием сдвига, ферментативное разложение и так далее, как описано выше. Кроме того, в случае композитного материала, содержащего шниту НА, применение связующего агента во время смешивания или введения в качестве функциональной группы может препятствовать стадии сшивания НА с образованием шнитоного геля.

НА и НАр, находясь в контакте, могут вступать во взаимодействия типа VDW взаимодействий, взаимодействий посредством водородных связей или даже ионных взаимодействий, которые считаются непостоянными. Между тем, возникновение ковалентной связи между НА и НАр, которую можно считать постоянной, приведет к образованию настоящего композитного материала, обладающего преимуществами как НА, так и НАр. Простейший способ достижения химического связывания между поверхностью НАр и молекулами НА состоит в применении связующих агентов и, в частности, обработке поверхности органофункциональными силанами. Тип силоаного связующего агента, способ обработки поверхности силаном выбирают в зависимости от химии поверхности добавки и полимера. Аналогичным образом можно использовать и другие типы связующих агентов, например, цирконаты, титанаты и т.п. Другие способы обеспечения ковалентной связи между НА и НАр могут включать применение сшивающих агентов, хелатирующих агентов или даже применение нескольких связующих агентов друг за другом, что напоминает аддитивную поверхность, которая может привести к такому же эффекту химического связывания.

НАр проявляет склонность к агрегации вследствие VDW взаимодействий и взаимодействий посредством водородных связей. Другое преимущество применения силанов состоит в том, что они содействуют предотвращению агрегации благодаря устранению указанных взаимодействий и в некоторой степени способствуют возникновению стерических затруднений.

Наиболее распространенной химической структурой органофункционального силана является R-Si-X₃, где X представляет собой алкоксигруппу, которая может гидролизироваться с образованием на поверхности реакционноспособных групп, и R представляет собой органофункциональную группу, которая может взаимодействовать с полимерной матрицей. Другие типы органофункциональных силанов с менее чем тремя алкоксигруппами также подходят для взаимодействия с поверхностью. Альтернативно, X представляет собой атом хлора. Тем не менее, применение указанных материалов коммерчески ограничено вследствие сложности при обращении с коррозионными, легковоспламеняющимися или токсичными побочными продуктами, связанными с гидролизом.

Существуют два основных способа введения силана:

а. Предварительная обработка - прямое нанесение на добавку чистого силана или его раствора в органическом растворителе, разбавленном водой, что ускоряет реакцию. Обычно этот способ осуществляют путем распыления силоаного агента на добавку или путем погружения добавки в силоановый агент (обработка поверхности).

б. Добавление силана к полимеру с последующим добавлением необработанной добавки. Такой

способ считается редким.

В случае НА и НАр предпочтительным способом является предварительная обработка, при которой частицы НАр покрывают силаном перед введением в НА.

Результатом процесса промышленной предварительной обработки является формирование толстого трехмерного сшитого многослойного силана (полисилоксановой сетки). Монослой силана, который в настоящее время можно получить только способами парофазного силилирования, обычно не используется в рамках промышленной практики.

Органофункциональную группу силана выбирают в зависимости от типа взаимодействия, которое является целесообразным, между полимером и добавкой. Взаимодействие может быть типа слабых VDW сил, гидрофильно-гидрофобных взаимодействий и вплоть до химических ковалентных связей. Существует большое разнообразие возможных групп R, при этом конкретный вид выбирают по содству такой группы к полимерной матрице. Следует отметить, что с данным полимером можно эффективно использовать более одного типа силана. Таким образом, для конкретного полимера наиболее подходящий выбранный органофункциональный силановый связующий агент должен приводить к химическому связыванию и взаимной диффузии через матрицу с образованием сетки с полимером.

Например, используют способы обработки поверхности силаном, таким как 3-глицидоксипропилтриметоксисилан или 3-глицидоксипропилтриэтоксисилан или другой силан с эпоксидной функциональной группой, который может действовать как сшивающий агент BDDE и участвовать в химической реакции, протекающей во время отверждения геля НА, и, таким образом, образовывать связь между поверхностно-обработанным НАр и НА.

Общий механизм отверждения НА с помощью BDDE включает реакцию с BDDE, химическая формула диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола, содержащим две функциональные эпоксидные группы, которые в щелочных условиях образуют стабильную ковалентную простую эфирную связь между НА и сшивающим агентом, точно так же 3-глицидоксипропилтриметоксисилан содержит функциональную эпоксидную группу, которая может сшивать НАр с НА. R-группа 3-глицидоксипропилтриметоксисилана, эпоксидная группа может взять на себя роль BDDE и действовать в качестве сшивающего агента. Как было указано выше, сшивающие агенты также представляют собой способ обеспечения ковалентной связи между НА и НАр. В этом случае BDDE также может связывать НА и НАр, поскольку, с одной стороны, может связываться с НА, а с другой стороны, может связываться с поверхностью НАр, образуя эфирные связи или, в крайнем случае, осуществляя гашение радикалами поверхности НАр. Проблема в такой системе состоит в регулировании степени сшивания как при сшивании цепей НА между собой, так и при сшивании НА и НАр, вследствие конкуренции в центрах сшивания как в НА, так и в НАр. Более высокая концентрация BDDE потребуется для обеспечения сопоставимых или же любых свойств по сравнению с методом обработки поверхности НАр с последующим сшиванием с образованием композитного материала на основе НА и НАр.

Другой возможностью является винилтриметоксисилан, или винилтриэтоксисилан, или винилтрихлорсилан в качестве примера хлорсилана или другой силан с винильной функциональной группой, который может действовать как сшивающий агент DVS и принимать участие в химической реакции, протекающей во время отверждения геля НА, и, таким образом, образовывать связь между поверхностно-обработанным НАр и НА.

Обычный механизм отверждения НА с помощью DVS включает реакцию с DVS, содержащим две функциональные винильные группы, которые в щелочных условиях образуют стабильную ковалентную простую эфирную связь между НА и сшивающим агентом, точно так же винилтриметоксисилан содержит функциональную винильную группу, которая может сшивать НАр с НА. R-группа винилтриметоксисилана, винильная группа может взять на себя роль DVS и действовать в качестве сшивающего агента.

Существует огромное количество возможностей для сшивания НА и НАр, другим примером является дигидразид адипиновой кислоты (ADH) в качестве сшивающего агента, при этом 3-аминопропилтриэтоксисилан, или 3-аминопропилтриметоксисилан, или другой силан с функциональной аминогруппой могут взять на себя роль ADH и действовать в качестве сшивающего агента. Но не все реакции являются подходящими вследствие чувствительности НА, как описано выше. Такие примеры силанов, выбранные из силана с эпоксидной функциональной группой и силана с винильной функциональной группой, имитируют наиболее распространенные процедуры сшивания НА, существующие на рынке кожных наполнителей, и могут быть легко реализованы в композитном материале на основе НА и НАр, либо в композиции сшитой НА, либо несшитой. Как указывалось выше, во время силилирования на поверхности микросфер НАр образуется трехмерный сшитый многослойный силан. Из-за трехмерной структуры полное покрытие связанного силана на поверхности отсутствует. Таким образом, на поверхности имеются домены, обработанные силаном, и домены, не содержащие силан, что придает поверхности топографию в виде изолированных или взаимосвязанных обработанных участков, расположенных на более большой необработанной поверхности, визуализируемых в виде островков или взаимосвязанных (соединенных мостиками) островков в море. Домены, содержащие связанный с поверхностью силан, представляют собой островки, раскинувшиеся в море свободной поверхности НАр. Текстуру поверхности островков в таком море можно адаптировать в зависимости от концентрации используемого силана.

Не желая ограничиваться изменением концентрации, для адаптации топографии поверхности и сродства можно применять и другие способы, такие как способы получения "двуликих" частиц. "Двуликая" частица представляет собой антисимметричную частицу с двумя разными физическими свойствами, например, частицу НАр с одной полусферической поверхностью, размер которой соответствует силану, и другой необработанной полусферой. Топография поверхности и сродство таких двух полусфер различаются. Существуют и могут применяться различные способы получения "двуликих" частиц, например, способ маскирования, при котором частицы захватываются на границе раздела между двумя фазами, что позволяет маскировать необработанное полушарие и задавать размеры другого полушария, и, таким образом, модификация поверхности частицы выполняется только с одной стороны.

Еще одним примером такого способа адаптации топографии поверхности и сродства является применение смеси силановых реагентов с разными функциональными группами, например, одного силана, который может взаимодействовать с цепями НА, и другого, который не может. В крайнем случае образуется "двуликая" частица с одной полусферической поверхностью, соответствующей размеру реакционно-способного силана, и другой полусферой с нереакционноспособным силаном. В любом из указанных примеров обработанная силаном область имеет топографию в виде изолированных или взаимосвязанных обработанных участков, расположенных на более большой необработанной поверхности. Поверхностная обработка позволяет получить микросферы в диапазоне от приблизительно нанометровых до приблизительно микронных размеров. Такой тип топографии поверхности обеспечивает медленное разложение НАр и выступает в качестве каркаса для естественного роста тканей. Разумно предположить, что в такой структуре разложение может протекать медленнее, чем в случае необработанных микросфер НАр.

Цепи НА адсорбируются на поверхности поверхностно-обработанного НАр. Адсорбированная цепь НА образует на поверхности цепочки (часть цепи, которая находится в контакте с поверхностью), петли (часть цепи, которая не находится в контакте с поверхностью и ограничена двумя цепочками) и два хвоста (часть цепи, которая не находится в контакте с поверхностью и ограничена цепочкой, с одной стороны, и свободна, с другой стороны). Адсорбция включает появление физических взаимодействий и химических связей, обозначаемых как физическая сорбция и химическая сорбция, соответственно. Таким образом, разумно предположить, что некоторые из цепочек цепей НА ковалентно прилипают к поверхности, при этом такая адсорбция является необратимой и постоянной. Указанная структура подразумевает, что микросферы НАр также действуют в образованном геле как центры сшивания. Разумно предположить, что концентрация сшивающего агента в присутствии поверхностно-обработанных микросфер может быть понижена при оказании такого же сшивающего действия, соответственно, указанные микросферы могут в некоторой степени заменить сшивающий агент. Кроме того, действие микросферы как центра сшивания состоит в локальном увеличении механической прочности в месте закрепления, что может способствовать более стабильному объемному эффекту, особенно при глубоких морщинах. Кроме того, цепи НА, которые прилипают к поверхности, менее восприимчивы к ферментативному разложению. Разумно предположить, что такая часть цепи, определяемая как цепочки, менее склонна к ферментативному разложению, поскольку указанные цепочки связаны с поверхностью. Разложение части цепи, определяемой как петли и хвосты, зависит от их относительного размера и доступности для ферментов. Таким образом, все цепи НА вблизи микросфер НАр менее склонны к ферментативному разложению, что может способствовать более устойчивому объемному эффекту и более длительному применению в области инъекции. Кроме того, улучшенная механическая прочность композитного материала на основе НА, содержащего НАр в качестве сшивателей, при том, что микросферы действуют как точки закрепления, может существенно помочь в областях, в которых динамические морщины и складки требуют более высокой устойчивости к работе мышц. Из описанного выше вполне понятно, что НА, содержащая химически связанные частицы НАр, рассматривается в качестве композитного материала, упрочненного геля с улучшенными свойствами, такими как механические свойства, устойчивость к разложению и т. п., или же свойства могут быть специально адаптированы в зависимости от требуемого применения. Для эффекта закрепления цепей НА можно использовать и другие типы поверхностно-обработанных микросфер, биоразлагаемые или нет, инертные или стимулирующие, такие как микросферы полимолочной кислоты.

Как упомянуто выше, НА и НАр, находящиеся в контакте в простой смеси, а не в композитном материале, могут участвовать во взаимодействиях типа VDW взаимодействий, взаимодействий посредством водородных связей или даже ионных взаимодействий, которые считаются непостоянными. При инъекции такая смесь подвергается воздействию тканей организма и биологических жидкостей, которые могут проявлять такие же взаимодействия типа VDW взаимодействий, взаимодействий посредством водородных связей или даже ионных взаимодействий с НА и НАр, что может привести к прекращению взаимодействия между НА и НАр в отличие от постоянного химического ковалентного взаимодействия между НА и НАр.

Таким образом, в смеси цепи НА и микросферы НАр будут разлагаться, как если бы они были инъекционированы по отдельности, тогда как в композитном материале синергетический эффект состоит в том, что как цепи НА, так и микросферы НАр будут разлагаться гораздо медленнее, что обеспечивает более длительный срок применения в организме, более длительное время пребывания *in vivo*, следовательно, продолжительное наращивание ткани. Как описано выше, применение сшивающих агентов рассматрива-

ется как химическая модификация НА или стабилизация НА сшиванием, тогда как добавление химически связывающих частиц может рассматриваться как физическая и химическая модификация НА путем сшивания с частицами. Последнее также представляет собой способ стабилизации НА с помощью частиц, в общем и в частности, НАр в дополнение к стабилизации сшиванием.

Некоторые дополнительные преимущества, которые могут возникнуть при применении композитного материала на основе НА и НАр, состоят в избегании эффекта Тиндаля, поскольку НАр является непрозрачным, или в уменьшении белизны на тонких участках, поскольку НА является полупрозрачной. Кроме того, НАр является рентгеноконтрастным, и, таким образом, вся композиция может быть легко обнаружена при рентгенографии во время или после инъекции.

В целом, это можно рассматривать как химическую модификацию, функционализацию или дериватизацию НА с помощью неорганических групп, таких как керамический НАр с обработанной силаном поверхностью, что позволяет контролируемым образом изменять химические и физические свойства НА для получения нового биоматериала с новыми требуемыми и улучшенными свойствами.

Как было указано выше, НА и двух- или полифункциональный сшивающий агент могут образовывать ковалентную связь в щелочных или кислотных условиях. Добавление дендримерного полифункционального сшивающего агента может обеспечить еще одно преимущество, состоящее в пониженной вязкости и более высокой продолжительности пребывания в ткани. Дендример представляет собой макромолекулу с определенной молекулярной массой, гиперразветвленную структуру, которая определяет эллипсоидальную или глобулярную форму. Дендримеры состоят из центрального ядра и ряда радикально концентрических слоев в разветвлениях, называемых "поколениями", которые определяют его форму. Как правило, эффективные функциональные группы, которые могут взаимодействовать с другими фрагментами, расположены в самом удаленном от центра поколении (то есть в наиболее удаленных частях разветвлений). Например, реакция НА как с BDDE (сшивающим агентом с двумя функциональными эпоксидными группами), так и дендритной молекулой с эпоксидной функциональной группой может привести к получению более мягкого геля и более низкой силе экструзии через иглу малого калибра, а также к получению геля с более высокой продолжительностью пребывания в ткани благодаря дендритной структуре дендримерного сшивателя.

Альтернативно, несшитую НА, некоторую ее часть или всю, в кожном наполнителе можно сшить с помощью дендримера с эпоксидной функциональной группой, что, таким образом, позволяет сохранить низкую вязкость, которая может облегчить экструзию через иглу малого калибра и в некоторой степени обеспечить более высокую продолжительность пребывания в ткани по сравнению с несшитой НА. Игла малого калибра представляет собой, например, иглу с калибром в диапазоне от 27G до 30G. Необязательно, указанная более высокая продолжительность пребывания может быть по меньшей мере на 20% дольше, чем в случае композиции кожного наполнителя на основе НА, по меньшей мере на 50% дольше, по меньшей мере на 100% дольше, по меньшей мере на 200% дольше, по меньшей мере на 500% дольше или составлять любое целое значение в диапазоне между перечисленными значениями. Более высокая продолжительность пребывания характерна для сшитой НА, которая, например, может быть сшита с помощью BDDE и дендримера. Гелевый продукт, такой как конечный кожный наполнитель, может, например, содержать около 90% сшитого геля и 10% несшитой НА. Присутствие несшитой НА позволяет уменьшить вязкость геля и смазать его для облегчения экструзии из шприца.

Неограничивающие примеры таких дендримеров с эпоксидными функциональными группами можно найти в Multiply Functionalized Dendrimers: Protecting-Group-Free Synthesis through Sequential Thiol-Epoxy 'Click' Chemistry and Esterification Reaction (RSC Advances, представленном 4 мая 2015 года, Khan с соавторами; см., например, молекулу 8 в качестве неограничивающего примера эпоксидного дендримера).

Как было указано выше, НА и двух- или полифункциональный сшивающий агент могут образовывать ковалентную связь в щелочных или кислотных условиях. Добавление молекулы - "клетки" POSS® (ПОСС) (полиэдрический олигомерный силескквиоксан) в качестве полифункционального сшивающего агента, такого как, например, POSS® (ПОСС) с эпоксидными функциональными группами, такого как, например, глицидил-POSS® (ПОСС) (силескквиоксан с эпоксидными функциональными группами), может обеспечить некоторое преимущество, состоящее в пониженной вязкости и более высокой продолжительности пребывания в ткани. Различные органические функциональные группы могут быть адаптированы к базовой клеточной структуре, такой как, например, эпоксидная функциональная группа в глицидил-POSS® (ПОСС). Например, реакция НА как с BDDE, так и с молекулой глицидил-POSS® (ПОСС) может привести к получению более мягкого геля и более низкой силе экструзии через иглу малого калибра, а также к получению геля с более высокой продолжительностью пребывания в ткани благодаря клеточной структуре сшивателя глицидил-POSS® (ПОСС). Альтернативно, несшитую НА, некоторую ее часть или всю, в кожном наполнителе можно сшить с помощью глицидил-POSS® (ПОСС), что, таким образом, позволяет сохранить низкую вязкость, которая может облегчить экструзию через иглу малого калибра и в некоторой степени обеспечить более высокую продолжительностью пребывания в ткани по сравнению с несшитой НА.

Приведенное выше описание малого калибра и/или более высокой продолжительности пребывания также можно использовать для такого варианта реализации с применением POSS® (ПОСС).

POSS® (ПОСС), характеризующийся подходящими органическими функциональными группами, также может выступать в качестве связующего агента, например, в случае, когда функциональные алкоксигруппы, как силаны, и эпоксидные функциональные группы, обе, присутствуют в базовой клеточной структуре. Такая структура POSS® (ПОСС) позволяет соединить оба конца НА и НАр точно так же, как обработка поверхности силаном. Процедура применения POSS® (ПОСС) в качестве связующего агента аналогична процедуре, описанной выше.

Хотя описанный выше материал содержал полисахарид, в частности НА, химически связанную с помощью связующего агента с керамическим материалом в форме частиц на основе фосфата кальция, таким как, например, НАр, подразумевают, что указанный материал не ограничен каким-либо образом. Другие полисахариды, такие как гепарозан, могут подвергаться такой же процедуре связывания, что и НА с НАр, и другие типы поверхностно-обработанных микросфер, такие как биоразлагаемые микросферы полимолочной кислоты, могут взять на себя роль НАр в закреплении на поверхности цепей НА.

Хотя описанное выше относится к кожным наполнителям, в частности, к лицевым кожным наполнителям, это никоим образом не подразумевает ограниченный случай. Другие анатомические области в организме могут быть заполнены или увеличены путем наращивания, такие как шея, ягодицы, грудная клетка, грудь, рука, икра и т.д. Кроме того, предложенный наполнитель можно использовать в качестве нехирургической альтернативы или дополнения к хирургической операции при изменении формы носа, пересадке кончика носа. Кроме того, предложенный наполнитель можно использовать по всему телу для размытия отметок на коже, таких как шрамы, постугревые рубцы, стрии-растяжки и т.п. Кроме того, предложенный наполнитель может иметь преимущества и использоваться в таких областях, как реконструкция костей и зубов, при этом НАр является главным компонентом. Кроме того, указанный наполнитель может иметь преимущества и использоваться в таких областях, как смазка суставов для улучшения подвижности и амортизирующей способности суставов.

Пример 1 - Обработка поверхности силаном.

1. Приготовление раствора для обработки силаном (2% силана в общем объеме): 93,25% по объему метанола смешивали с 3,93% по объему дистиллированной воды.

Добавляли 0,81% по объему уксусной кислоты для буферизации раствора до pH от 4,5 до 5,5. К полученному раствору добавляли 2% по объему функционального силана. Более низкую концентрацию силана можно использовать для адаптации покрытия поверхности силаном.

2. Обработка силаном:

Раствор перемешивали в течение от 1 до 10 мин, и в течение этого времени в растворе образовались силанольные группы. В указанный раствор в течение приблизительно 30 минут вводили микросферы НАр. Затем микросферы НАр дважды промывали в чистом метаноле. Микросферы НАр помещали в печь с температурой от 70°C до 105°C в течение от 1 до 24 часов для отверждения и завершения указанной процедуры с формированием силанового слоя или оставляли отверждаться на всю ночь при комнатной температуре. Приведенные интервалы времени и температуры зависят от типа силана, например: 70°C в течение 24 часов подходит для 3-глицидоксипропилтриметоксисилана для предотвращения деструкции эпоксидных функциональных групп силана.

Для предотвращения агломерации микросфер можно использовать смеситель с большими сдвиговыми усилиями, роторно-статорный смеситель, гомогенизатор или сверхзвуковое генерирующее устройство датчикового типа.

Пример 2 - Получение кожного наполнителя на основе несшитой НА, содержащей микросферы НАр.

Исходный материал NaHA, например, с молекулярной массой два миллиона Да, в любой форме волокна или порошка вводили в щелочной раствор. NaHA перемешивали, растворяли и гидратировали в щелочном растворе при комнатной температуре в течение нескольких часов до тех пор, пока не образовалась гомогенная вязкая жидкость, представляющая собой НА.

Поверхностно-обработанный 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом НАр вводили при перемешивании в вязкую жидкость, представляющую собой НА, с образованием дисперсии. Дисперсию нагревали до 50°C в течение нескольких часов для обеспечения образования связи между НА и поверхностно-обработанным НАр. Реакцию можно использовать без перемешивания в случае, когда полученная дисперсия является высоковязкой и микросферы иммобилизованы в дисперсии благодаря высокой вязкости. В случае, когда микросферы являются подвижными и могут оседать, для предотвращения оседания и агломерации микросфер можно использовать смеситель или сверхзвуковое генерирующее устройство датчикового типа. Затем указанную дисперсию охлаждали до комнатной температуры. Далее дисперсия набухла и для удаления низкомолекулярных остатков подвергалась диализу в течение нескольких дней с применением PBS в диализном мешке с отсежкой по молекулярной массе 12000. PBS регулярно заменяли для введения в дисперсию свежего PBS. Например, для получения дисперсии, содержащей 30% об./об. НАр или менее определяли степень набухания. Благодаря синергетическому эффекту concentra-

ция как НА, так и НАр может быть понижена и при этом оказывать тот же эффект, что и обычные кожные наполнители, доступные на рынке. Дисперсию помещали в шприцы, стерилизовали, после чего она была готова к употреблению. Альтернативно, микросферы НАр, поверхностно-связанные с НА, можно включить в другой гелевый носитель, состоящий из карбоксиметилцеллюлозы (СМС), глицерина и воды.

Пример 3 - Получение кожного наполнителя на основе сшитой НА, содержащей микросферы НАр.

Основные стадии процедуры сшивания известны специалистам в данной области. Исходный материал NaHA, например, с молекулярной массой два миллиона Да, в любой форме волокна или порошка вводили в щелочной раствор. NaHA перемешивали, растворяли и гидратировали в щелочном растворе при комнатной температуре в течение нескольких часов до тех пор, пока не образовалась гомогенная вязкая жидкость, представляющая собой НА.

BDDE и поверхностно-обработанный 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом НАр вводили при перемешивании в вязкую жидкость, представляющую собой НА, с образованием дисперсии. Дисперсию нагревали до 50°C в течение нескольких часов для обеспечения образования связи между НА и поверхностно-обработанным НАр. Реакцию можно использовать без перемешивания в случае, когда полученная дисперсия является высоковязкой и микросферы иммобилизованы в дисперсии благодаря высокой вязкости. В случае, когда микросферы являются подвижными и могут осесть, для предотвращения оседания и агломерации микросфер можно использовать смеситель или сверхзвуковое генерирующее устройство датчикового типа. Затем композитный гель снова охлаждали до комнатной температуры. Далее композитный гель набухал и подвергался диализу с применением PBS в диализном мешке с отсечкой по молекулярной массе 12000 в течение нескольких дней для удаления низкомолекулярных остатков, включая избыток BDDE. PBS регулярно заменяли для введения в композитный гель свежего PBS. Несшитую НА добавляли в композитный гель, чтобы способствовать уменьшению силы экструзии. Например, композитный гель может содержать 30% об./об. НАр. Композитный гель помещали в шприцы, стерилизовали, после чего он был готов к употреблению.

Пример 4 - Исследование частиц, обработанных силаном.

Микросферы НАр получали согласно примеру 1, описанному выше. Применяемый материал:

1. Микросферы НАр медицинского назначения, сферические 15-60 мкм, D50 = 35 мкм.

2. 3-глицидоксипропилтриметоксисилан > 98% Sigma Aldrich

3. Метанол > 99,9% Sigma Aldrich, степень чистоты "для ВЭЖХ"

4. Уксусная кислота > 99,7% Sigma Aldrich, особо чистый SEM (сканирующая электронная микроскопия) + EDS (энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия):

Прибор: Phenom ProX Desktop SEM.

Анализ SEM + EDS.

Сканирующий электронный микроскоп (SEM) в сочетании с методом энергодисперсионной спектроскопии (EDS) использовали для проведения локализованного химического элементного анализа необработанных микросфер НАр и микросфер НАр, обработанных 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом. Методом SEM были получены микрофотографии, и с применением EDS был выполнен количественный анализ концентраций элементов на поверхности.

На полученных методом SEM микрофотографиях, приведенных на фиг. 1 и 2, показаны необработанные микросферы НАр и микросферы НАр, обработанные 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом, соответственно. Оба набора микросфер демонстрируют сходство морфологической структуры, что указывает на то, что применение поверхностной обработки силаном к микросферам НАр не ухудшило качество микросфер.

При анализе методом EDS необработанного НАр было обнаружено присутствие атомов Са, Р и О, как и ожидалось для НАр. Как видно из табл. 1, атомное отношение Са/Р составляло -1,67, как и ожидалось для НАр.

При анализе методом EDS НАр, обработанного 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом, было обнаружено, помимо атомов Са, Р и О, присутствие атома Si, что указывает на наличие обработки поверхности силаном. Как было указано выше, результатом промышленного процесса предварительной обработки являлось формирование толстого трехмерного сшитого многослойного силана (полисилоксановой сетки), что, таким образом, может привести к отклонению атомного отношения Са/Р от теоретического значения 1,67, как можно видеть в табл. 2, и свидетельствует о наличии обработки поверхности силаном применительно к необработанной поверхности.

Таблица 1
Элементный анализ необработанной микросферы НАр

Номер элемента	Символ элемента	Название элемента	Атомная концентрация	Массовая концентрация
8	O	Кислород	68,28	48,43
20	Ca	Кальций	19,82	35,22
15	P	Фосфор	11,90	16,35

Таблица 2

Элементный анализ микросферы НАр, обработанной 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом

Номер элемента	Символ элемента	Название элемента	Атомная концентрация	Массовая концентрация
8	O	Кислород	58,88	38,46
20	Ca	Кальций	25,75	42,13
15	P	Фосфор	15,22	19,24
14	Si	Кремний	0,15	0,18

Хотя настоящее изобретение было описано в сочетании с его конкретными вариантами реализации, совершенно ясно, что специалистам в данной области техники будут очевидны многие альтернативы, модификации и варианты. Соответственно, подразумевают, что указанное изобретение включает все такие альтернативы, модификации и варианты, которые находятся в пределах сущности и широкого объема прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты, заявки на патенты и последовательности, идентифицированные согласно их учетным номерам, упомянутые в описании настоящего изобретения, в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или последовательность, идентифицированная согласно ее учетному номеру, была специально и отдельно указана для включения в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, цитирование или идентификация любой ссылки в настоящей заявке не должна рассматриваться как признание того, что такая ссылка доступна настоящему изобретению в качестве известного уровня техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция кожного наполнителя, содержащая полисахарид, химически связанный с помощью связующего агента с гидроксипатитом в форме частиц (НАр), который предварительно обработан с помощью указанного связующего агента, при этом указанный полисахарид представляет собой гиалуроновую кислоту (НА) или Гепарозан.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный связующий агент представляет собой органофункциональный силан.

3. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что до реакции с указанным НАр в форме частиц указанный полисахарид остается несшитым.

4. Композиция по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащая носитель, подходящий для введения млекопитающему в качестве кожного наполнителя.

5. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что цепи указанного полисахарида стабилизированы путем добавления НАр в форме частиц.

6. Способ получения композиции по любому из предыдущих пунктов, включающий модификацию поверхности указанного НАр в форме частиц с помощью связующего агента; и химическое связывание указанного полисахарида с указанным НАр в форме частиц, при этом указанный НАр в форме частиц находится в форме микрочастиц.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанный связующий агент представляет собой органофункциональный силан.

8. Способ по п.6 или 7, отличающийся тем, что до реакции с указанным НАр в форме частиц указанный полисахарид остается несшитым.

9. Способ по любому из пп.6-8, дополнительно включающий добавление носителя, подходящего для введения млекопитающему в качестве кожного наполнителя.

10. Способ по любому из пп.6-9, отличающийся тем, что цепи указанного полисахарида стабилизированы путем добавления НАр в форме частиц.

