

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391100** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.06.07**

(51) Int. Cl. *A61K 8/65* (2006.01)  
*A61Q 19/08* (2006.01)  
*A61K 38/01* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.07.13**

---

(54) **ГИДРОЛИЗАТ КОЛЛАГЕНА В КАЧЕСТВЕ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА ДЛЯ ЗАМЕДЛЕНИЯ СТАРЕНИЯ**

---

(31) **10 2020 126 594.8**  
(32) **2020.10.09**  
(33) **DE**  
(86) **PCT/EP2021/069480**  
(87) **WO 2022/073664 2022.04.14**  
(71) Заявитель:  
**ГЕЛИТА АГ (DE)**

(72) Изобретатель:  
**Хаусманс Штефан, Фрех Ханс-Ульрих, Эссер Штеффен (DE)**  
(74) Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к гидролизату коллагена для применения в качестве действующего вещества для замедления старения соматических клеток у человека или животных.

**202391100**  
**A1**

**202391100**

**A1**

## ГИДРОЛИЗАТ КОЛЛАГЕНА В КАЧЕСТВЕ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА ДЛЯ ЗАМЕДЛЕНИЯ СТАРЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к гидролизату коллагена для применения  
5 в качестве действующего вещества для замедления старения соматических  
клеток у человека или животных.

Биологическое старение организма человека или животных, с одной  
стороны, связано с влияниями внешних факторов, накапливающимися на  
протяжении жизни. Однако вне зависимости от подобных влияний внешних  
10 факторов на уровне отдельных соматических клеток существует также общая  
связь между старением и постепенным укорочением теломер в течение жизни.  
Теломеры представляют собой повторяющиеся участки ДНК на концах  
хромосом, укорачивающиеся сначала при каждом делении клетки. Такое  
укорочение может частично вновь компенсироваться синтезирующим ДНК  
15 ферментом – теломеразой, активность которой при этом весьма различна в  
разных типах клеток. Когда длина теломер становится меньше определенной  
величины, дальнейшие деления клеток не происходят.

Для процесса старения и тем самым для ожидаемой продолжительности  
жизни организма первоначальная длина теломер менее важна, чем скорее  
20 скорость их укорочения, которую можно выражать, например, как среднюю  
скорость укорочения теломер в парах оснований на год жизни (см. К. Whitemore  
и др. в PNAS 116 (2019), сс. 15122-15127).

С некоторого времени ведется поиск действующих веществ, которые  
противодействуют укорочению теломер с целью замедлить таким путем  
25 старение соматических клеток у человека или животных, а тем самым и тканей,  
органов и всего организма в целом. Сказанное относится прежде всего (но не  
исключительно) к старению кожи, поскольку при этом оно в особой мере  
становится заметным внешне.

В качестве соответствующих действующих веществ для замедления  
30 старения уже были предложены различные растительные экстракты, например:  
экстракты растений родов *Astragalus* и *Cimicifuga* в WO 2005/044179 A2 или  
родов *Dendropanax* и *Kappaphycus* в WO 2018/139835 A1.

В основу изобретения была положена задача предложить эффективное действующее вещество для замедления старения соматических клеток у человека или животных.

5 Для решения этой задачи согласно настоящему изобретению предлагается применение гидролизата коллагена в качестве соответствующего действующего вещества. В опытах на клетках удалось продемонстрировать, что гидролизат коллагена значительно противодействует укорочению теломер и активирует теломеразу, как это детально представлено в последующем описании.

10 Изобретение относится прежде всего к применению гидролизата коллагена для замедления старения кожи. Оно обычно проявляется в виде образования морщин, потери упругости и эластичности, образования так называемых старческих или возрастных пятен (пигментных пятен) и иных изменений. В этом случае соматическими клетками, на которые направлено действие гидролизата коллагена, являются фибробласты.

15 К дальнейшим типам соматических клеток, старение которых согласно изобретению можно замедлить, относятся другие клетки соединительных тканей, такие как остеобласты и хондроциты, а также мышечные клетки (миоциты), нервные клетки (нейроны) и клетки иммунной системы.

20 В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения применение гидролизата коллагена является нетерапевтическим, т.е. прежде всего косметическим. В данном варианте во внимание принимается тот факт, что биологическое старение организма как естественный процесс не является патологическим состоянием, которое требовало бы лечения в медицинском смысле. Тем не менее замедление старения может способствовать улучшению  
25 качества жизни.

В еще одном варианте осуществления изобретения применение гидролизата коллагена является терапевтическим для предупреждения и/или лечения обусловленных возрастом (возрастных) заболеваний. К таким заболеваниям, которые связаны с укорочением теломер, относятся прежде всего атеросклероз, хронические заболевания печени, хронические воспалительные кишечные  
30 заболевания, а также определенные заболевания надпочечников и селезенки. К дальнейшим заболеваниям, которые появляются тем чаще, чем старше возраст, относятся остеопороз, артроз, саркопения и проявляющиеся деменцией заболевания, как, например, болезнь Альцгеймера.

При предлагаемом в изобретении применении гидролизат коллагена в первую очередь противодействует укорочению теломер в соматических клетках и прежде всего снижает скорость укорочения теломер. Как уже указывалось выше, скорость укорочения теломер, по меньшей мере при сравнении между разными видами, коррелирует с ожидаемой продолжительностью жизни. Снижение этой скорости под действием гидролизата коллагена удалось явно продемонстрировать в проведенных опытах на фибробластах человека.

Гидролизат коллагена способен при предлагаемом в изобретении применении активировать в соматических клетках фермент – теломеразу. Этот эффект также удалось продемонстрировать в опытах на фибробластах человека. Однако активация теломеразы вовсе необязательно является единственным механизмом действия для противодействия укорочению теломер.

Различные положительные физиологические действия гидролизата коллагена известны уже давно, прежде всего при остеопорозе или заболеваниях суставов. Однако на взаимодействие гидролизата коллагена с теломерами не существовало никаких указаний, и поэтому обнаруженная при создании настоящего изобретения эффективность гидролизата коллагена является в данном отношении совершенно неожиданной.

В зависимости от того, идет ли речь о нетерапевтическом или терапевтическом применении гидролизата коллагена, его согласно настоящему изобретению можно вводить в организм в виде биологически активной добавки либо в виде лекарственного средства. В любом случае гидролизат коллагена представляет собой совершенно безопасный для здоровья продукт, для которого неизвестно наличие у него каких-либо опасных побочных действий.

Гидролизат коллагена целесообразно принимать перорально. Известно, что пептиды гидролизата коллагена даже при относительно высокой молекулярной массе, составляющей вплоть до 10000 Да, всасываются в кишечнике по меньшей мере в определенной доле. Тем самым гидролизат коллагена при его пероральном приеме может в принципе достигать все соматические клетки в качестве места своего действия.

Конкретная форма применения гидролизата коллагена может представлять собой порошок, раствор, гель, таблетку или капсулу.

Суточная доза вводимого в организм гидролизата коллагена, прежде всего при его пероральном приеме, составляет преимущественно от примерно 0,5 до

примерно 20 г, предпочтительно от примерно 2 до примерно 15 г, более предпочтительно от примерно 3 до примерно 10 г, прежде всего от примерно 4 до примерно 8 г.

5 Гидролизат коллагена в качестве предлагаемого в изобретении действующего вещества обычно имеет среднюю молекулярную массу от 500 до 15000 Да, предпочтительно от 1000 до 8000 Да, более предпочтительно от 1500 до 5000 Да, наиболее предпочтительно от 1800 до 2200 Да. Под указанными значениями всегда подразумевается среднемассовая молекулярная масса, которую можно определять прежде всего гель-проникающей хроматографией.

10 Гидролизат коллагена в предпочтительном варианте получен путем ферментативного гидролиза коллагенсодержащего исходного материала. Для такого гидролиза используют прежде всего эндопептидазы или экзопептидазы микробного или растительного происхождения. Путем соответствующего выбора пептидаз и условий гидролиза возможно получение гидролизатов коллагена с молекулярной массой в требуемом в каждом случае диапазоне.

15 В качестве коллагенсодержащего исходного материала обычно используют шкуру или кости позвоночных животных, преимущественно млекопитающих или птиц, и прежде всего шкуру крупного рогатого скота или свиней (спилок крупного рогатого скота, соответственно свиную шкуру). В альтернативном варианте в качестве коллагенсодержащего исходного материала можно использовать кожу, кости и/или чешую рыб, прежде всего холодно- или тепловодных рыб.

20 Однако гидролизат коллагена можно также получать из беспозвоночных животных в качестве исходного материала и использовать по предлагаемому в настоящем изобретении назначению. Так, например, гидролизаты коллагена можно получать из моллюсков или из медуз.

Гидролизат коллагена может быть получен из этих исходных материалов либо одностадийным способом, либо через промежуточный желатин, причем в этом случае возможно применение желатина типа А, равно как и типа В.

30 В предпочтительном варианте гидролизат коллагена получен путем последовательного воздействия по меньшей мере двух эндопротеаз с различающейся между собой специфичностью, прежде всего по меньшей мере двух разных металлопротеаз и/или серинпротеаз, т.е. протеаз, которые расщепляют аминокислотную последовательность молекул коллагена перед,

соответственно за определенными аминокислотами. Под металлопротеазами и/или серинпротеазами преимущественно подразумеваются ферменты из микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus melleus*.

5           Путем выбора приемлемых эндопротеаз можно не только получать гидролизат коллагена с определенным молекулярно-массовым распределением, но и влиять на тип аминокислот на концах содержащихся в гидролизате пептидов. В этом отношении, например, предпочтительно, когда по меньшей мере 50% N-концевых аминокислот гидролизата коллагена представляют собой гидрофобные аминокислоты, прежде всего аланин, лейцин и изолейцин.

10           Альтернативно ферментативному гидролизу гидролизат коллагена может быть получен согласно изобретению путем рекомбинантной экспрессии генов. Использование естественных аминокислотных последовательностей коллагенов, прежде всего из крупного рогатого скота или свиней, и их экспрессия в модифицированных методами генной инженерии клетках (например, дрожжах, бактериях или растительных клетках, прежде всего клетках табака) позволяет получать продукты, которые в основном идентичны продуктам гидролиза соответствующих коллагенсодержащих сырьевых материалов. При этом возможно получение более узкого, соответственно точно заданного молекулярно-массового распределения.

20           В еще одном варианте осуществления изобретения гидролизат коллагена вводят в организм в комбинации с по меньшей мере одним дальнейшим действующим веществом, которое противодействует укорочению теломер в соматических клетках. Благодаря подобной комбинации при определенных условиях возможно достижение еще более сильных эффектов.

25           Такое по меньшей мере одно дальнейшее действующее вещество, которое противодействует укорочению теломер, в предпочтительном варианте выбрано из экстрактов растений родов *Astragalus* (астрагал), *Cimicifuga* (клопогон), *Dendropanax* и *Каррафусис*.

30           В еще одном варианте осуществления изобретения гидролизат коллагена вводят в организм в составе композиции, которая кроме гидролизата коллагена не содержит никакие другие действующие вещества. Возможен прежде всего вариант, в котором вводимая в организм композиция в основном полностью состоит из гидролизата коллагена.

В том случае, если гидролизат коллагена используется не как единственное действующее вещество, его в еще одном варианте осуществления изобретения можно комбинировать с одним или несколькими дальнейшими компонентами (например, в биологически активной добавке или лекарственном средстве),  
5 которые проявляют положительный физиологический эффект. Подобные компоненты в предпочтительном варианте выбраны из витамина С, витаминов В-, D-, Е- и К-рядов, конъюгированных линоленовых кислот, кофеина и его производных, экстракта гуараны, экстракта листьев зеленого чая, галлата эпигаллокатехина, креатина, L-карнитина, L-цитруллина, L-аргинина,  $\alpha$ -  
10 липоевой кислоты, N-ацетилцистеина, никотинамидадениндинуклеотида в восстановленной форме (NADH), D-рибозы, аспартата магния, антиокислителей, таких как антоцианы, каротиноиды, флавоноиды, ресвератрол, глутатион, супероксиддисмутаза и ксантаны, такие как мангиферин, минеральных веществ, таких как железо, магний, кальций, цинк, селен и фосфор, а также дальнейших  
15 белков, гидролизатов и пептидов, таких как соевый, пшеничный или сывороточный белок.

Объектом настоящего изобретения является далее способ замедления старения соматических клеток у человека или животных, заключающийся во введении гидролизата коллагена в организм человека или животного.  
20 Преимущества и предпочтительные варианты осуществления этого способа уже были описаны выше в отношении предлагаемого в изобретении гидролизата коллагена.

Эффективность гидролизата коллагена против укорочения теломер более подробно поясняется на последующих примерах.

## 25 Примеры

Описанные ниже эксперименты *in vitro* на фибробластах человека по исследованию воздействий гидролизата коллагена на длину теломер и активность теломеразы были проведены фирмой Life Length в Мадриде, Испания.

### 30 1. Влияние гидролизата коллагена на длину теломер

#### 1.1. Культуры клеток

Все исследования проводили на культурах фибробластов взрослого человека. Посев осуществлялся из расчета по 2000 клеток на  $\text{см}^2$  в DMEM-среде

(модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки, пенициллином в количестве 100 ед./мл и стрептомицином в количестве 1000 ед./мл. Среду заменяли каждые 2-3 дня, а клетки пассировали каждые 4-5 дней при конфлюентности 70-80%.

Параллельно с исследованием культур клеток в стандартных условиях исследовали также культуры клеток в окислительных условиях, при которых вышеуказанная культуральная среда дополнительно содержит  $H_2O_2$  в концентрации 10мкМ.

### 1.2. Гидролизат коллагена

Применявшийся для исследований гидролизат коллагена (ГК) выпускается фирмой Gelita AG под названием VERSIOL<sup>®</sup>. Его получают путем ферментативного гидролиза из желатина типа А из свиной шкуры, и он имеет среднюю молекулярную массу примерно 2000 Да.

Действия гидролизата коллагена исследовали в широком диапазоне концентраций. Для этого в каждом случае клеточные культуры выращивали (в стандартных, равно как и в окислительных условиях) в культуральной среде, к которой был добавлен гидролизат коллагена в количестве 0,01 мг/мл, 0,1 мг/мл, 1 мг/мл или 10 мг/мл. Каждая из контрольных смесей была без добавки гидролизата коллагена.

### 1.3. Удвоение популяции

Клеточные культуры выращивали на протяжении 8 недель, при этом еженедельно определяли удвоение популяции (УП) за один пассаж.

Кумулятивное УП указано в последующих таблицах для стандартных условий и для окислительных условий.

Кумулятивное УП за один пассаж в стандартных условиях:

ГК [мг/мл]	0	0,01	0,1	1	10
Неделя 1	3,2	2,9	2,6	3,4	2,6
Неделя 2	6,7	6,5	6,8	6,8	6,2
Неделя 3	10,2	9,7	10,1	10,3	9,5
Неделя 4	13,5	13,2	13,9	13,7	12,6
Неделя 5	16,8	16,2	16,8	16,5	15,9
Неделя 6	19,5	18,4	19,7	19,5	18,7
Неделя 7	23,1	22,5	23,2	23,2	22,5
Неделя 8	25,2	24,7	25,2	24,8	24,5

Кумулятивное УП за один пассаж в окислительных условиях:

ГК [мг/мл]	0	0,01	0,1	1	10
Неделя 1	3,2	2,9	2,9	2,7	2,7
Неделя 2	6,2	5,9	6,2	5,4	6,0
Неделя 3	9,2	8,9	9,5	8,7	8,5
Неделя 4	8,7	11,9	12,3	12,6	11,4
Неделя 5	13,6	13,5	14,3	14,3	13,2
Неделя 6	15,3	16,7	16,9	14,4	14,7
Неделя 7	18,1	20,0	20,0	16,5	18,2
Неделя 8	19,8	21,0	21,0	17,5	19,5

Как и ожидалось, удвоение популяции в окислительных условиях без  
исключения ниже, чем в стандартных условиях. Присутствие же гидролизата  
5 коллагена не оказывает никакого значительного влияния на УП, т.е. гидролизат  
коллагена не влияет на клеточный рост как таковой.

#### 1.4. Определение длины теломер и скорости их укорочения

Длину теломер определяют методом флуоресцентной гибридизации *in situ*  
(сокращенно FISH от англ. "fluorescence in situ hybridization"). Для этого  
10 используют зонд на основе пептидно-нуклеиновой кислоты с флуоресцентной  
меткой, гибридизированный с тремя повторяющимися теломерными  
последовательностями. Интенсивность флуоресценции данной теломеры  
пропорциональна ее длине, при этом количественная оценка осуществляется с  
помощью контрольных клеток с известной длиной теломер.

15 Во всех исследовавшихся культурах клеток длину теломер определяли  
через 4 недели и через 8 недель, а для контрольной смеси определяли также в  
начале культивирования (неделя 0). Клетки фиксировали и лизировали  
пепсином, при этом каждый раз при определении длины теломер выполняли по  
пять лизисов клеток из расчета на каждую культуру клеток. ДНК окрашивали  
20 4',6-диамидин-2-фенилиндолом (ДАФИ) и осуществляли гибридизацию теломер  
с зондом.

Затем флуоресцентным микроскопом определяли местоположение  
клеточных ядер, окрашенных ДАФИ, и количественно регистрировали  
флуоресценцию гибридизированных теломер, при этом для каждой смеси  
25 (лизиса клеток) анализировали 15 разных фрагментов изображения. Длину  
теломер и ее распределение вычисляли с помощью соответствующего

программного обеспечения и статистически анализировали с применением t-критерия Стьюдента.

### 1.5. Результаты

#### 1.5.1. Длина теломер

5 На основании данных, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, для каждой культуры клеток через 4 недели и через 8 недель вычисляли медианное значение длины теломер, 20-й процентиль (в каждом случае в тысячах пар нуклеотидов, т.п.н.), а также долю "коротких теломер" (длиной менее 3 т.п.н.). Полученные результаты представлены в последующих

10 таблицах. В каждой из них указаны также p-значения согласно t-критерию, если соответствующую пробу сравнивают с соответствующей пробой контрольной смеси без гидролизата коллагена. При значениях p меньше 0,05 различие между смесью с гидролизатом коллагена и контрольной смесью статистически значимо, и эти значения выделены жирным шрифтом.

15 Длина теломер в стандартных условиях:

ГК мг/мл	Неделя	Медианная длина		20-й процентиль		Доля теломер длиной менее 3 т.п.н.	
		т.п.н.	p-значение	т.п.н.	p-значение	%	p-значение
0	0	7,726	-	4,063	-	12,8	-
0	4	6,878	-	3,342	-	17,3	-
0,01	4	7,082	<b>0,02</b>	3,464	0,08	16,7	0,1
0,1	4	7,051	0,08	3,433	0,2	16,9	0,4
1	4	6,921	0,6	3,351	0,9	17,3	1,0
10	4	7,264	<b>0,001</b>	3,757	<b>0,0004</b>	14,6	<b>0,0008</b>
0	8	5,578	-	2,489	-	24,2	-
0,01	8	5,900	<b>0,0003</b>	2,736	<b>0,006</b>	22,0	<b>0,005</b>
0,1	8	5,884	<b>0,003</b>	2,862	<b>0,002</b>	21,0	<b>0,002</b>
1	8	5,830	<b>0,002</b>	2,875	<b>0,0002</b>	20,9	<b>0,0003</b>
10	8	5,846	0,1	2,905	<b>0,009</b>	20,6	<b>0,008</b>

Длина теломер в окислительных условиях:

ГК мг/мл	Неделя	Медианная длина		20-й процентиль		Доля теломер длиной менее 3 т.п.н.	
		т.п.н.	р-значение	т.п.н.	р-значение	%	р-значение
0	4	6,947	-	3,507	-	16,3	-
0,01	4	6,747	0,08	3,152	<b>0,01</b>	18,8	<b>0,01</b>
0,1	4	6,831	0,3	3,126	<b>0,01</b>	18,9	<b>0,01</b>
1	4	6,864	0,5	3,288	0,08	18,0	0,07
10	4	6,770	0,1	3,313	0,06	17,6	0,06
0	8	5,900	-	2,655	-	22,6	-
0,01	8	6,117	<b>0,009</b>	3,049	<b>0,0001</b>	19,5	<b>0,0001</b>
0,1	8	6,322	<b>0,002</b>	3,207	<b>0,0003</b>	18,1	<b>0,0002</b>
1	8	6,214	<b>0,004</b>	3,076	<b>0,0006</b>	19,3	<b>0,0003</b>
10	8	5,371	<b>0,002</b>	2,674	0,9	23,2	0,6

Эти данные свидетельствуют о существенном влиянии гидролизата коллагена на длину теломер, по меньшей мере по истечении времени культивирования фибробластов длительностью 8 недель. Данный эффект проявляется как в стандартных условиях, так и в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а также при всех исследовавшихся концентрациях гидролизата коллагена.

#### 1.5.2. Скорость укорочения теломер

Для вычисления скорости укорочения теломер для каждой культуры клеток длину теломер через 4, соответственно 8 недель за вычетом длины теломер в начале культивирования делили на соответствующее значение УП (см. п. 1.3). Тем самым данная величина скорости отражает среднее укорочение теломер за одно удвоение популяции.

Полученные результаты приведены в последующих таблицах, при этом и в данном случае при значении р менее 0,05 имеется статистическая значимость при сравнении с контрольной смесью.

Скорость укорочения теломер в стандартных условиях:

ГК [мг/мл]	Неделя	Скорость [пар оснований/УП]	p-Значение
0	4	63,1	-
0,01	4	49,0	<b>0,03</b>
0,1	4	48,5	<b>0,05</b>
1	4	59,0	0,5
10	4	36,6	<b>0,002</b>
0	8	85,2	-
0,01	8	73,8	<b>0,0007</b>
0,1	8	73,1	<b>0,003</b>
1	8	76,6	<b>0,005</b>
10	8	76,8	1,0

Скорость укорочения теломер в окислительных условиях:

ГК [мг/мл]	Неделя	Скорость [пар оснований/УП]	p-Значение
0	4	89,4	-
0,01	4	82,4	0,5
0,1	4	73,0	0,2
1	4	68,5	0,1
10	4	84,1	0,6
0	8	92,1	-
0,01	8	76,7	<b>0,0001</b>
0,1	8	66,8	<b>0,0006</b>
1	8	86,4	0,2
10	8	120,7	<b>0,001</b>

5 Эти данные свидетельствуют о существенном влиянии гидролизата коллагена на скорость укорочения теломер, по меньшей мере по истечении времени культивирования фибробластов длительностью 8 недель. Данный эффект проявляется как в стандартных условиях, так и в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а также при всех исследованных концентрациях гидролизата коллагена.

## 10 2. Влияние гидролизата коллагена на активность теломеразы

### 2.1. Культуры клеток

Исследование проводили на первичных культурах фибробластов взрослого человека. Культуральной средой служила DMEM-среда (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) с высоким содержанием глюкозы, дополненная 10% фетальной телячьей сыворотки, пенициллином в количестве 100 ед./мл и стрептомицином в количестве 1000 ед./мл.

Активность теломеразы определяли в начале культивирования и через 24 ч.

## 2.2. Гидролизат коллагена

В данном случае использовали тот же гидролизат коллагена, что и для определения длины теломер (см. п. 1.2). Его добавляли в культуральную среду в количестве 0,01 мг/мл, 0,1 мг/мл, 1 мг/мл или 10 мг/мл. К контрольной смеси гидролизат коллагена не добавляли.

## 2.3. Определение активности теломеразы

Активность фермента – теломеразы – определяют TRAP-методом (от англ. "telomeric repeat amplification protocol", протокол амплификации теломерных повторов). Для этого лизируют клетки и экстрагируют белки. Далее добавляют олигонуклеотидный субстрат, который удлиняется экстрагированной теломеразой соответственно естественным теломерам.

Продукты реакции теломеразы амплифицируют путем количественной ПЦР в реальном времени. Измеряемой величиной служит количество циклов, после которых флуоресценция впервые становится выше порогового значения (Ct-значение). Путем калибровки с помощью клеток HeLa в разных концентрациях можно вычислить относительную теломеразную активность (ОТА) в пробе.

## 2.4. Результаты

Относительную теломеразную активность в фибробластах в начале культивирования и для различных концентраций ГК по истечении 24 ч определяли по три раза. В последующей таблице приведены средние значения и стандартные отклонения (СО), а также р-значения согласно t-критерию для соответствующего сравнения с контрольной смесью (без ГК). При значении р менее 0,05 имеется статистическая значимость.

Относительная теломеразная активность:

ГК [мг/мл]	Часы	Среднее значение ОТА	СО	р-Значение
0	0	1,9	0,3	-
0	24	1,4	0,4	-
0,01	24	0,9	0,2	0,6
0,1	24	1,6	0,5	<b>0,03</b>
1	24	2,5	0,4	0,3
10	24	2,1	1,0	0,2

Эти данные свидетельствуют о повышении активности теломеразы в фибробластах в результате добавления гидролизата коллагена в концентрациях 0,1, 1 или 10 мг/мл, даже когда повышение статистически значимо при концентрации ГК лишь 0,1 мг/мл.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(для рассмотрения на региональной фазе)

5 1. Гидролизат коллагена для применения в качестве действующего вещества для замедления старения соматических клеток у человека или животных.

10 2. Гидролизат коллагена для применения по п. 1 для замедления старения кожи, при этом соматическими клетками являются фибробласты.

3. Гидролизат коллагена для применения по п. 1 или 2, при этом применение является нетерапевтическим, прежде всего косметическим.

15 4. Гидролизат коллагена для применения по п. 1 или 2, при этом применение является терапевтическим для предупреждения и/или лечения возрастных заболеваний.

20 5. Гидролизат коллагена для применения по одному из предыдущих пунктов, при этом он противодействует укорочению теломер в соматических клетках и прежде всего снижает скорость укорочения теломер.

6. Гидролизат коллагена для применения по п. 5, при этом он активирует в соматических клетках фермент – теломеразу.

25 7. Гидролизат коллагена для применения по одному из предыдущих пунктов, при этом он предназначен для перорального введения в организм.

30 8. Гидролизат коллагена для применения по п. 7, при этом он предназначен для перорального введения в организм в виде порошка, раствора, геля, таблетки или капсулы.

9. Гидролизат коллагена для применения по одному из предыдущих пунктов, при этом он предназначен для введения в организм в суточной дозе от примерно 0,5 до примерно 20 г, предпочтительно от примерно 2 до примерно 15

г, более предпочтительно от примерно 3 до примерно 10 г, прежде всего от примерно 4 до примерно 8 г.

5 10. Гидролизат коллагена для применения по одному из предыдущих пунктов, при этом он имеет среднюю молекулярную массу от 500 до 15000 Да, предпочтительно от 1000 до 8000 Да, более предпочтительно от 1500 до 5000 Да, наиболее предпочтительно от 1800 до 2200 Да.

10 11. Гидролизат коллагена для применения по одному из предыдущих пунктов, при этом он получен путем ферментативного гидролиза коллагенсодержащего исходного материала.

15 12. Гидролизат коллагена для применения по п. 11, при этом коллагенсодержащий исходный материал выбран из группы, включающей шкуры и кости позвоночных животных, преимущественно млекопитающих, птиц или рыб, прежде всего шкуры крупного рогатого скота или свиней.

20 13. Гидролизат коллагена для применения по п. 11 или 12, при этом он получен путем последовательного воздействия по меньшей мере двух эндопротеаз с различающейся между собой специфичностью, прежде всего по меньшей мере двух разных металлопротеаз и/или серинпротеаз.

25 14. Гидролизат коллагена для применения по п. 13, при этом металлопротеазы и/или серинпротеазы выбраны из ферментов из микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus melleus*.

30 15. Гидролизат коллагена для применения по п. 13 или 14, при этом по меньшей мере 50% его N-концевых аминокислот представляют собой гидрофобные аминокислоты, прежде всего аланин, лейцин и изолейцин.

16. Гидролизат коллагена для применения по одному из пп. 1-10, при этом он получен путем рекомбинантной экспрессии генов.

17. Гидролизат коллагена для применения по одному из предыдущих пунктов, при этом он предназначен для введения в организм в комбинации с по меньшей мере одним дальнейшим действующим веществом, которое противодействует укорочению теломер в соматических клетках.

5

18. Гидролизат коллагена для применения по п. 17, при этом указанное по меньшей мере одно дальнейшее действующее вещество выбрано из экстрактов растений родов *Astragalus* (астрагал), *Cimicifuga* (клопогон), *Dendropanax* и *Caraphycus*.

10

19. Гидролизат коллагена для применения по одному из пп. 1-16, при этом он предназначен для введения в организм в составе композиции, которая кроме гидролизата коллагена не содержит никакие другие действующие вещества.

15

20. Гидролизат коллагена для применения по п. 19, при этом вводимая в организм композиция в основном полностью состоит из гидролизата коллагена.