

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048072**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.23

(21) Номер заявки
202390089

(22) Дата подачи заявки
2021.06.21

(51) Int. Cl. *A61K 9/06* (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61L 15/00 (2006.01)

(54) СПОСОБНАЯ К НАБУХАНИЮ ЖЕЛАТИНОВАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, НАБУХШАЯ ЖЕЛАТИНОВАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 20181012.4

(32) 2020.06.19

(33) EP

(43) 2023.06.22

(86) PCT/EP2021/066847

(87) WO 2021/255295 2021.12.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УНИВЕРСИТЕЙТ ГЕНТ (BE)

(72) Изобретатель:
**Ван Влирбергхе Сандра, Ван Дамм
Лана, Денипере Бернард, Блондель
Филип (BE)**

(74) Представитель:
Кузнецова С.А. (RU)

(56) EP-A1-1961411
WO-A1-2019229140
US-A1-2018355127
WO-A1-2012164032
CHIEN-CHI LIN ET AL: "Thiol-norbornene photoclick hydrogels for tissue engineering applications", JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE, vol. 132, no. 8, 18 October 2014 (2014-10-18), pages 41563-1, XP055387302, US ISSN: 0021-8995, DOI: 10.1002/app.41563 abstract page 4, column 2 - page 5, column 1

(57) Настоящее изобретение относится к области гидрогелей. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способной к набуханию фармацевтической композиции, содержащей желатин, при этом желатин находится в сшитом состоянии перед набуханием, и при этом указанная способная к набуханию фармацевтическая композиция представлена в форме множества частиц. Настоящее изобретение дополнительно относится к набухшей фармацевтической композиции, подходящей для инъектирования, к способам получения указанных фармацевтических композиций и к вариантам их применения.

B1

048072

048072

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области желатиновых гидрогелей. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способной к набуханию и набухшей фармацевтическим композициям, содержащим сшитый желатин, которые находятся в форме множества частиц и могут подходящим образом применяться в различных областях применения, таких как пищевая промышленность, косметические средства, медицина человека и/или ветеринарная медицина, а также к способам их получения и к вариантам их применения.

Уровень техники

Желатин является природным биополимерным материалом с превосходными свойствами взаимодействия с клетками и потенциалом для формирования гидрогеля. Он имеет широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности из-за его широкой доступности и рентабельности. В результате материал стал одним из эталонов в области тканевой инженерии и биопроизводства. Однако, поскольку желатин характеризуется верхней критической температурой растворения ниже физиологической температуры (плюс или минус 30°C), природные желатиновые гидрогели являются неподходящими для биомедицинских применений, таких как тканевая инженерия. Чтобы он подходил для биомедицинских применений, необходимо повышать стабильность и механические свойства желатина при физиологических условиях. Следовательно, появлялось множество стратегий для сшивания желатина и улучшения стабильности и механических свойств желатина. Способы сшивания из уровня техники можно разделить на три категории: физические, химические и ферментативные.

Способы физического сшивания обычно включают пучок электронов высокой энергии, гамма-облучение, плазменную обработку и/или дегидротермическую обработку.

Химические способы включают применение, например, EDC/NHS, формальдегида, глутаральдегида, генипина и/или (мет)акриламида. Ферментативные способы включают, например, способы с использованием микробной трансглутаминазы. Среди этих способов способы химического сшивания обеспечивают образование ковалентных связей между полимерными цепями желатина, это приводит к более стабильным гидрогелям и более контролируемым механическим свойствам. В частности, применение стратегий фотосшивания представляет особый интерес, поскольку эти способы в общем характеризуются относительно умеренными условиями, что обеспечивает инкапсуляцию клеток в гидрогеле. Кроме того, для некоторых методик изготовления добавок (с высоким разрешением), в том числе стереолитографии и двухфотонной полимеризации (2PP), требуется фотосшивание со структурой материала. Известные стратегии фотосшивания можно в общем разделить на две основные категории в зависимости от механизма сшивания: полимеризацию с ростом цепи и ступенчатую полимеризацию.

Исторически основную часть фотоиндуцированных стратегий сшивания желатина проводят с применением полимеризации с ростом цепи (опосредованной радикалами фотополимеризации с ростом цепи). Часто упоминаемое производное желатина в этом отношении представляет собой желатин-метакриламид (Gel-MOD или Gel-MA), в котором первичные аминогруппы желатина были функционализированы с применением метакрилового ангидрида с получением сшиваемых метакриламидов. В последнее десятилетие ступенчатые гидрогели на основе тиол-енов, такие как (фото-)фиксированные гидрогели на основе тиол-енов, вызывают все больший интерес.

Несмотря на то, что обычно сшивание функционализированного желатина является предпочтительным в некоторых областях применения, поскольку это обеспечивает повышенную стабильность *in vivo* и улучшенные механические свойства, сшитый желатин является неподходящим для инъектирования из-за того, что он не приспособлен к инъектированию вследствие вязкости материала, получаемого после набухания, что препятствует введению сшитого желатина посредством инъекционной иглы.

В настоящее время некоторые типы функционализированных желатинов для областей применения в тканевой инженерии инъектируют перед сшиванием и затем сшивают *in vivo*, например, желатины с модифицированной тиол-еновой химической структурой. Возможность сшивания *in vivo* обычно обеспечивается наличием реакционных частиц, которые вызывают полимеризацию и способствуют сшиванию, например, фотоинициаторов. Кроме того, стабильные композиции на основе желатина, которые являются инъектируемыми, содержат свободные радикалы *in vivo*, что обуславливает наличие реакционных кислородсодержащих частиц после имплантации. Эти реакционные частицы могут быть вредными для клеток.

В других существующих на данный момент инъектируемых составах применяют термочувствительные полимеры с применением материалов-активаторов, характеризующихся LCST (нижней критической температурой раствора), близкой к температуре тела. Для этих инъектируемых составов их синтез обеспечивает меньший контроль их механических свойств и их времени разложения, которые, таким образом, нельзя легко подгонять в соответствии с потребностями.

Дополнительные инъектируемые составы из уровня техники содержат наполнители на основе коллагена. Такие наполнители имеют несколько недостатков. Во-первых, наполнители на основе коллагена быстро разлагаются *in vivo* из-за того факта, что физические шивки легко расщепляются. Во-вторых, сообщалось о случаях аллергических реакций после инъектирования. Желатин, полученный из коллагена, является менее иммуногенным, чем коллаген, из-за проводимой жесткой процедуры экстракции, при

которой получают желатин, обеспечивающий значительно меньше вредных аллергических реакций.

Пептиды можно применять в качестве инъеклируемых веществ, поскольку они демонстрируют эффект псевдопластичности. Однако, можно видеть, что эти небольшие цепи быстро разлагаются *in-vivo*.

Дополнительные инъеклируемые наполнители из уровня техники, такие как наполнители на основе гиалуроновой кислоты, например, Juvederm® или Restylane®, являются дорогими и не содержат последовательность RGD, также известную как трипептид аргинин-глицин-аспартат, который способствует жизнеспособности клетки в результате взаимодействия с интегринами на клеточной мембране. Наполнители на основе желатина, с другой стороны, содержат указанную последовательность RGD, но не являются инъеклируемыми, а могут даже иметь недостатки, упомянутые выше в данном документе.

Таким образом, несмотря на то, что прогресс в данной области техники обеспечил улучшенные функционализированные типы желатина и способ синтеза и инъектирования, в уровне техники нет желатиновых композиций, обеспечивающих менее инвазивный и структурно стабильный способ доставки, который также преодолевает недостатки, упомянутые выше.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение содержащих желатин композиций, обеспечивающих менее инвазивный, рентабельный и структурно стабильный способ доставки клеток. Дополнительной целью настоящего изобретения является обеспечение модифицированного желатина, который не имеет недостатков уровня техники. Дополнительной целью настоящего изобретения является обеспечение гидрогеля с контролируемым набуханием и/или водопоглощающей способностью. Дополнительной целью настоящего изобретения является обеспечение композиций на основе желатина, которые являются термически и химически стабильными. Кроме того, целью настоящего изобретения является обеспечение желатиновых композиций с улучшенной стабильностью при хранении, в частности, при повышенных значениях температуры.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения представлена способная к набуханию фармацевтическая композиция, причем способная к набуханию фармацевтическая композиция содержит желатин, который находится в сшитом состоянии перед набуханием, и при этом указанная способная к набуханию композиция представлена в форме множества частиц и содержит частицы желатина с гранями и ребрами.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, указанные частицы характеризуются средней сферичностью по Уоделлу, Φ , составляющей не более 0,80. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения, указанные частицы характеризуются средней сферичностью по Уоделлу, Φ , составляющей от 0,20 до 0,80, предпочтительно от приблизительно 0,30 до приблизительно 0,70, более предпочтительно от приблизительно 0,40 до приблизительно 0,60.

В конкретном варианте осуществления желатин в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере первую полимерную цепь со сшиваемой функциональной группой в указанном сшитом состоянии.

В дополнительном конкретном варианте осуществления указанная форма множества частиц содержит частицы с размером частиц от приблизительно 0,1 мкм до 2 мм, предпочтительно от 1 мкм до 1,5 мм, более предпочтительно от 5 мкм до приблизительно 1 мм, определенным посредством оптической микроскопии.

В соответствии со вторым аспектом, в настоящем изобретении предусматривается набухающая фармацевтическая композиция, содержащая способную к набуханию фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и по меньшей мере одно способствующее набуханию средство.

В конкретном варианте осуществления набухающая композиция характеризуется вязкостью от приблизительно более чем 0 до 200 Па·с, предпочтительно от 5 до 150 Па·с, более предпочтительно от 10 до 120 Па·с, определенной посредством реологии в зависимости от скорости сдвига, которая варьировалась в диапазоне 0,1-1000 с⁻¹.

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, таким образом предусматривается способ получения способной к набуханию фармацевтической композиции, предусматривающий стадии:

- (a) обеспечения сшиваемого желатина;
 - (b) сшивания желатина со стадии (a) с получением сшитого желатина;
 - (c) высушивания сшитого желатина, полученного на стадии (b);
 - (d) измельчения высушенного желатина, полученного на стадии (c), с получением формы множества частиц, содержащей частицы желатина с гранями и ребрами;
- с получением в результате способной к набуханию фармацевтической композиции, определенной в других вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением.

В варианте осуществления настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает стадию (d) измельчения высушенного желатина с получением в результате частиц со средней сферичностью по Уоделлу, Φ , составляющей не более 0,80, предпочтительно от 0,20 до 0,80, более предпочтительно от приблизительно 0,30 до приблизительно 0,70, более предпочтительно от приблизительно 0,40 до приблизительно 0,60.

В соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения предусматривается способ получения набухшей фармацевтической композиции, предусматривающий применение способа получения способной к набуханию фармацевтической композиции, и:

(е) добавление способствующего набуханию средства в указанную способную к набуханию фармацевтическую композицию, полученную на стадии (d), с получением таким образом набухшей фармацевтической композиции.

В конкретном варианте осуществления способ дополнительно предусматривает стадию: (f) добавления в набухшую композицию, полученную на стадии (е), компонента, выбранного из: (столовых) клеток, фармацевтически активных соединений и факторов роста или их комбинаций.

В дополнительном конкретном варианте осуществления на стадии (b) желатин сшивают в форме пленки или листа.

В дополнительном конкретном варианте осуществления на стадии (с) сшитый желатин подвергают сублимационному высушиванию.

В пятом аспекте в настоящем изобретении предусматривается применение способной к набуханию фармацевтической композиции, определенной в соответствии с другим связанным вариантом осуществления, или набухшей фармацевтической композиции, определенной в соответствии с другими связанными вариантами осуществления, в качестве лекарственного препарата в медицине человека и/или ветеринарной медицине.

В шестом аспекте в настоящем изобретении предусматривается применение способной к набуханию фармацевтической композиции, определенной в соответствии с настоящим изобретением, или набухшей фармацевтической композиции, определенной в соответствии с настоящим изобретением, в пищевой промышленности, косметических средствах, доставке лекарственных средств, и/или доставке клетки, и/или в качестве доставки фактора роста, и/или в качестве наполнителя для косметического средства, в получении крема или мази в качестве гелеобразователя или загустителя, в качестве имитатора внеклеточного матрикса, в качестве композиции в областях применения в тканевой инженерии, в частности где области применения в тканевой инженерии выбраны из эстетических процедур, реконструкции большого объема тканей, реконструкции небольшого объема тканей, пересадки жировой ткани, липофилинга, раны от ожогов, области применения в стоматологии, инженерии хрящевых и костных тканей, инженерии мягких тканей, такой как инженерия жировой ткани, ткани позвоночного столба, сердечной ткани, инженерии тканей мышц и сухожилий.

Краткое описание графических материалов

С конкретной ссылкой на фигуры, следует подчеркнуть, что подробности представлены в только качестве примера и в целях иллюстративного обсуждения различных вариантов осуществления настоящего изобретения. Они представлены с целью предоставления того, что считается наиболее полезным и доступным описанием принципов и содержательных аспектов настоящего изобретения. В связи с этим, не предпринимаются попытки изложить структурные подробности настоящего изобретения более детально, чем это необходимо для понимания принципов настоящего изобретения. Описание в сопроводении чертежей делает очевидным для специалистов в данной области техники то, как несколько вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть реализованы на практике.

Фиг. 1 демонстрирует измерения механической прочности набухших композиций в соответствии с настоящим изобретением, и как они сравниваются с Juvederm®.

Фиг. 2 демонстрирует график измерений жизнеспособности клеток для набухших композиций в соответствии с настоящим изобретением, и как они сравниваются с Juvederm®.

Фиг. 3 демонстрирует два изображения SEM, полученные при увеличении 495x, способных к набуханию частиц желатина в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 4 демонстрирует изображения, полученные с помощью оптической микроскопии, способных к набуханию частиц желатина (слева) и набухших частиц желатина (справа) в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 5 показывает изображения, полученные с помощью оптической микроскопии, способных к набуханию частиц желатина не по настоящему изобретению, полученных посредством эмульсии типа "вода-в-масле" с последующим сшиванием. Полученные частицы на фиг. 5 имеют характерную сферическую геометрическую форму. Это отличается от геометрической формы частиц по настоящему изобретению, которая не является сферической.

Фиг. 6 демонстрирует результаты измерений вязкости набухших частиц желатина в соответствии с настоящим изобретением, в различные моменты времени, сравнивая вязкость при комнатной температуре (к.т.) и при охлаждении (6-8°C).

Фиг. 7A демонстрирует результаты тестирования *in vivo* набухшей композиции, объединенной с клетками в соответствии с настоящим изобретением, причем фиг. 7B демонстрирует результаты *in vivo* тестирования Juvederm®, объединенного с клетками.

Фиг. 8 демонстрирует результаты измерений динамического модуля упругости набухших частиц желатина в соответствии с настоящим изобретением, на которые ссылаются в легенде как на частицы

(светлосерый), по сравнению со способными к набуханию частицами желатина со сферической геометрической формой (как показано на фиг. 5), на которые ссылаются в легенде как на сферы (черный).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение далее будет описано подробно. В следующих фразах различные аспекты настоящего изобретения определены более подробно. Каждый аспект, определенный таким образом, можно объединять с любым другим аспектом или аспектами, если иное явно не определено. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или преимущественный, можно объединять с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или преимущественные. При описании соединений по настоящему изобретению использованные термины следует рассматривать в соответствии со следующими определениями, если контекст явно не указывает на иное. Термин "приблизительно" или "примерно" при использовании в данном документе при ссылке на измеряемую величину, такую как параметр, количество, длительность по времени и т.д., означает охватывающую вариации $\pm 10\%$ или менее, предпочтительно $\pm 5\%$ или менее, более предпочтительно $\pm 1\%$ или менее, и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ или менее, от и до указанного значения в такой мере, что такие вариации являются подходящими для выполнения раскрытого изобретения. Следует понимать, что значение, к которому относится модификатор "приблизительно" или "примерно", само также является конкретно и предпочтительно раскрытым. При использовании в описании и приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает на иное. В качестве примера, "соединение" означает одно соединение или более одного соединения.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "способная к набуханию композиция" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на композицию, которая способна увеличивать свой объем путем абсорбции способствующего набуханию средства, например, жидкости, такой как вода, плазма.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "дробленая неупорядоченная геометрическая форма" при ссылке на геометрическую форму частицы или множества частиц сделана ссылка на геометрическую форму без явно определенной формы и, таким образом, неупорядоченную, которая является характерной для измельченного или дробленного материала. Измельченный или дробленный материал характеризуется наличием граней и ребер. В контексте настоящего изобретения следует понимать, что термин "дробленая неупорядоченная геометрическая форма" исключает сферические или сфероидальные формы, которые нельзя получить посредством измельчения или дробления.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "сферичность" сделана ссылка на свойство, описывающее то, как геометрическая форма частицы, в данном случае частицы желатина, сравнивается с геометрической формой идеальной сферы. Сферичность частицы можно рассчитывать различными способами, например, как сферичность S и сферичность по Уоделлу, Ф.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "сферичность S" при использовании в данном документе сделана ссылка на свойство, описывающее то, как геометрическая форма частицы сравнивается с геометрической формой идеальной сферы, где идеальная сфера характеризуется сферичностью S, равной 1. Сферичность S частицы определяется как отношение горизонтальной оси к вертикальной оси, где вертикальная ось меньше или равна горизонтальной оси, где наибольший диаметр частицы определяется как горизонтальная ось, а вертикальная ось является диаметром в положении, развернутом на 90° относительно горизонтальной оси. В соответствии с настоящим изобретением горизонтальную ось и вертикальную ось измеряли на основе изображений SEM указанных частиц.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "сферичность по Уоделлу, ф" сделана ссылка на свойство, описывающее то, как геометрическая форма частицы сравнивается с геометрической формой идеальной сферы, где идеальная сфера характеризуется сферичностью по Уоделлу, ф, равной 1. Сферичность по Уоделлу определяется как:

$$\phi = \frac{d_c}{D_c}$$

где d_c представляет собой диаметр наибольшей вписанной окружности, а D_c представляет собой диаметр наименьшей описанной окружности, как описано у Wadell, 1935.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "угловатость" сделана ссылка на параметр, описывающий изменения округлости в углах исследуемой частицы.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "измельчение" сделана ссылка на уменьшение чего-либо до мелких частиц или порошка путем его дробления.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "набухшая композиция" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на композицию, которая увеличилась в объеме вследствие абсорбции способствующего набуханию средства, например, жидкости, такой как вода, плазма, буферные растворы и т.п.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "желатин" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на биоматериал, обычно получаемый путем гидролиза коллагена, например, коллагена от млекопитающих и рыб, или рекомбинантный желатин.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "сшитое состояние" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на состояние, характеризующееся наличием (ковалентных) взаимодействий между полимерными цепями желатина, например, посредством химической связи. Другими словами, сделана ссылка на желатин, который является сшитым.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "форма множества частиц" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на форму, содержащую множество частиц.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "размер частиц" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на средний размер отдельных частиц, образующих форму множества частиц в случае композиций в соответствии с настоящим изобретением, при этом размер частиц рассчитывают, например, с помощью способа просеивания, при котором затем можно описать измельченные частицы более точно. Это также можно количественно определять на основе изображений SEM или μ СТ.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "сшиваемая функциональная группа" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на ситуацию с функциональной группой при полимерной цепи, способной обеспечивать взаимодействие с другой полимерной цепью. Например, сшиваемые функциональные группы в соответствии с настоящим изобретением представляют собой без ограничения метакрилат, акрилат, метакриламид, акриламид, норборнен, малеимид, тиолы, EDC, генипин, глутаральдегид, малеимид, фурурил, глицидилметакрилат, предпочтительно метакриламид, норборнен, тиолы и их комбинации.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "содержание воды" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на содержание воды, выраженное в % вес./об., что означает вес воды относительно общего объема образца, выраженный в процентах.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "степень замещения" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на количество сшиваемых фрагментов/функциональных групп при остове желатина. Это количество можно рассчитывать с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии, анализа ОРА или анализа с помощью нингидрина. Количество сшиваемых фрагментов/функциональных групп на остове желатина можно рассчитывать, как описано в J. Van Hoorick et al., 2018, A.I. Van Den Bulcke et al., 2000, или S. Van Vlierberghe et al., 2011.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "степень сшивания" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на количество сшитых фрагментов при остове желатина, что можно оценить с помощью ЯМР-спектроскопического анализа HRMAS, как описано в S. Van Vlierberghe et al., 2010.

В контексте настоящего изобретения посредством термина "способствующее набуханию средство" при использовании в данном документе, если не указано иное, сделана ссылка на средство, которое способно увеличивать объем способной к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением путем абсорбции указанного средства. Например, способствующие набуханию средства в соответствии с настоящим изобретением представляют собой без ограничения воду, сыворотку, липоаспират, внутривенные жидкости, раствор NaCl, раствор глюкозы, раствор Хартмана, раствор стволовых клеток, плазму крови, буферы, такие как DMEM, HEPES, и их комбинации.

В настоящем изобретении предусматривается способная к набуханию композиция, где способная к набуханию композиция содержит желатин, который находится в сшитом состоянии перед набуханием, и где указанная способная к набуханию композиция находится в форме множества частиц и содержит частицы желатина с дробленной неупорядоченной геометрической формой, т.е. частицы с не определенной явно геометрической формой или очертаниями. Частицы желатина в соответствии с настоящим изобретением характеризуются геометрической формой, присущей дробленным материалам, таким как дробленое стекло или дробленный камень, с ребрами, гранями и/или неровностями. Неожиданно обнаружили, что в настоящем изобретении предусматривается способная к набуханию композиция с предпочтительными свойствами, более конкретно являющаяся стабильной и обеспечивающая инъектируемость после набухания, по сравнению с уровнем техники. В частности, способные к набуханию частицы в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают вследствие своей геометрической формы более связанный гель (набухшую композицию). Считается, что набухшие частицы в соответствии с настоящим изобретением, полученные из способных к набуханию частиц по настоящему изобретению, обеспечивают более высокие силы внешнего трения по сравнению со сферическими/сфероидальными частицами, что обеспечивает более высокую стойкость относительно деформации сдвига и более высокую вязкость. Кроме того, более шероховатая поверхность и/или наличие граней будет улучшать адгезию и пролиферацию клеток. Это отличается от способных к набуханию и набухших частиц из уровня техники, которые имеют геометрическую форму, подобную сферам, которая не обеспечивает указанные выше преимущества. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, частицы желатина в способной к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением характеризуются дробленной неупорядоченной геометрической формой со средней сферичностью по Уделлу, Φ , составляющей менее чем 1, предпочтительно менее чем 0,95, предпочтительно менее чем 0,90,

предпочтительно менее чем 0,85, предпочтительно менее чем 0,80, предпочтительно менее чем 0,75, предпочтительно менее чем 0,70, предпочтительно менее чем 0,60, предпочтительно менее чем 0,55.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, указанные частицы характеризуются средней сферичностью по Уоделлу, Ф, составляющей не более 0,80. Неожиданно обнаружили, что путем обеспечения частиц желатина в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения можно обеспечивать лучшую инъецируемость после набухания по сравнению с уровнем техники. В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, указанные частицы характеризуются средней сферичностью по Уоделлу, Ф, составляющей от 0,20 до 0,80, предпочтительно от приблизительно 0,30 до приблизительно 0,70, более предпочтительно от приблизительно 0,40 до приблизительно 0,60. Неожиданно обнаружили, что путем обеспечения частиц желатина в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения можно обеспечить лучшую инъецируемость после набухания.

Кроме того, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения указанная форма множества частиц содержит частицы со средней сферичностью S, составляющей от приблизительно 1,100, предпочтительно от приблизительно 1,100 до приблизительно 1,500, предпочтительно от приблизительно 1,200 до приблизительно 1,400. Неожиданно обнаружили, что путем обеспечения частиц желатина в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения можно обеспечить лучшую инъецируемость после набухания.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения, указанные частицы характеризуются степенью угловатости, составляющей приблизительно 140.

Другими словами, в настоящем изобретении предусматривается способная к набуханию композиция в виде множества частиц, содержащая сшитый желатин. Кроме того, способная к набуханию композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть полностью высушенной, что означает, что конечная способная к набуханию композиция характеризуется содержанием воды, составляющим приблизительно 0% вес./об. Преимуществом способной к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением является то, что она является стабильной, и при контакте со способствующим набуханию средством способные к набуханию композиции обеспечивают набухшую композицию, которая характеризуется густотой и вязкостью, обеспечивающими простоту выведения из шприца, другими словами, она обеспечивает набухшую композицию, которая может проходить через иглу так, что ее надлежащее количество может быть легко инъецировано, другими словами, набухшие композиции и способная к набуханию композиция в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают улучшенную инъецируемость. Например, в случае диаметров иглолок от 21G до 30G, способные к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением можно растворять в 5-15% вес./об. воды с получением соответствующей вязкости для простоты инъецирования. Однако специалист в данной области техники способен определить идеальное содержание воды для композиций в зависимости от предполагаемого применения и/или предусмотренной вязкости.

Кроме того, способные к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением представлены в высушенной форме множества частиц и, таким образом, могут легко храниться и легко применяться вследствие того, что для них просто требуется приведение в контакт со способствующим набуханию средством, которое можно выбрать так, чтобы оно подходило для потребностей конкретного применения в пищевой промышленности, косметических средствах, медицине человека и/или ветеринарной медицине. Таким образом, способные к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением являются готовыми к применению композициями, которые не предусматривают применения и/или введения с чрезмерными усилиями. Способные к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают улучшенную стабильность при хранении, в частности, при повышенных значениях температуры. В случае способных к набуханию композиций, которые подлежат инъецированию после набухания, для способных к набуханию композиций в соответствии с настоящим изобретением не требуется стадия полимеризации *in vivo*, поскольку композиции уже являются сшитыми перед инъецированием. Это ограничивает факторы опасности композиций, поскольку сильно реактивные частицы и/или радикалы не присутствуют *in vivo*, а только в контролируемой среде *ex vivo*. Например, в случае УФ-облучения, если применяют УФ-инициаторы для сшивания желатиновых композиций *in vivo*, то сшитые композиции могут содержать свободные радикалы (кислородсодержащие радикалы), которые являются вредными для клеток. Кроме того, набухшие композиции в соответствии с настоящим изобретением являются полностью стабильными при 37°C, что обеспечивает медленное и более контролируемое разложение материала с течением времени. Кроме того, наблюдали, что сшитое состояние является таким, что некоторые сшитые композиции в соответствии с настоящим изобретением являются неразтворимыми в воде при температуре от приблизительно 0 до 70°C.

Кроме того, способная к набуханию композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит желатин, который выполняет функцию остова. Желатин содержит недорогой природный остов, который содержит RGD-последовательности, также известные как трипептид аргинин-глицин-аспартат, которые способствуют жизнеспособности клетки в результате взаимодействия с интегринами на клеточ-

ной мембране.

Дополнительным преимуществом способной к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением является то, что микрочастицы будут действовать в качестве гидрогеля путем набухания, что делает ее идеальной для *in vivo* подложки, чтобы доставлять все питательные вещества к клеткам. В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения, указанная форма множества частиц содержит частицы с размером частиц от приблизительно 0,1 мкм до 2 мм, предпочтительно от 1 мкм до 1,5 мм, более предпочтительно от 5 мкм до приблизительно 1 мм. Данный размер частиц, как обнаружили, был предпочтительным для обеспечения набухших композиций, которые можно легко инъецировать. Кроме того, небольшие размеры частиц от приблизительно 1 мкм до 200 мкм обеспечивают более быстрое/более простое набухание. Для обеспечения инъектируемости набухшей композиции через иглы малого размера, например, иглы 30G, предпочтительным является, чтобы размер частиц способной к набуханию композиции снижался до по меньшей мере 150 мкм, предпочтительно по меньшей мере 100 мкм.

Сшитое состояние, в котором представлены способные к набуханию композиции, можно получать посредством различных методов из уровня техники, таких как физическое сшивание, химическое сшивание и ферментативное сшивание. Способы физического сшивания обычно включают пучок электронов высокой энергии, гамма-облучение, плазменную обработку и/или дегидротермическую обработку, тогда как способы химического сшивания включают EDC, формальдегид, глутаральдегид, генипин и акриламид и т.д. Ферментативные способы включают способы с микробной трансглутаминазой. Среди этих способов особенно предпочтительным является применение стратегий фотосшивания.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения, желатин характеризуется степенью замещения, которую можно рассчитать/измерить, например, посредством способов, описанных выше, от приблизительно 10 до 100%.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения, желатин характеризуется степенью сшивания, которую можно рассчитать/измерить, например, посредством способов, описанных выше, от приблизительно 10 до 100%, предпочтительно от 25 до 100%, более предпочтительно от 40 до 100%.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения желатин содержит по меньшей мере первую полимерную цепь со сшиваемой функциональной группой в указанном сшитом состоянии. Указанная по меньшей мере одна полимерная цепь может обеспечивать повышенную механическую стабильность набухших конечных композиций. Применение сшиваемых функциональных групп, таких как выбранные из метакрилата, акрилата, метакриламида, акриламида, норборнена, малеимида, тиолов, EDC, генипина, глутаральдегида, малеимида, фурфурола, глицидилметакрилата, предпочтительно метакриламида, норборнена, тиолов и их комбинаций, способно обеспечивать взаимодействие между полимерными цепями. Остовы желатина в композициях в соответствии с настоящим изобретением разлагаются медленнее с течением времени, и можно обеспечивать более стабильные гидрогели и более контролируемые механические свойства.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, набухающая композиция и/или способная к набуханию композиция содержит желатин, содержащий сшиваемые функциональные группы, представляющие собой метакриламид и норборнен.

Кроме того, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, набухающая композиция и/или способная к набуханию композиция содержит желатин, содержащий сшиваемые функциональные группы, представляющие собой метакриламид и норборнен, где желатин характеризуется степенью замещения, составляющей приблизительно 66% метакриламида и 34% норборнена.

Кроме того, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, набухающая композиция и/или способная к набуханию композиция содержит желатин, содержащий сшиваемые функциональные группы, представляющие собой метакриламид и норборнен, где желатин характеризуется степенью замещения, составляющей приблизительно 39% метакриламида и 61% норборнена.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения, желатин дополнительно содержит по меньшей мере вторую полимерную цепь, выбранную из: синтетических полимеров (например, PEG), полисахаридов, белков, пептидов, факторов роста и их комбинаций. В дополнительном варианте осуществления желатин содержит множество первых и/или вторых полимерных цепей. Варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают дополнительную настраиваемость механических свойств способных к набуханию композиций, которые можно конструировать, чтобы они были более подходящими для конкретного применения. Кроме того, все из разлагаемости, механической прочности и свойств набухания можно улучшать или устанавливать в соответствии с потребностями путем настраивания материала композиций путем выбора наиболее подходящих комбинаций типов полимерных цепей и функциональных групп, прикрепленных к указанным цепям. Например, если частицы требуются для реакции *in vivo*, то желатин можно модифицировать, например, путем добавления норборненовых групп так, что частицы могут реагировать *in vivo* посредством тиолированных соединений, присутствующих, например, в плазме крови. Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением

предложенный материал способной к набуханию композиции можно обеспечивать так, что набухшая композиция разлагается *in vivo* посредством матриксных металлопротеиназ, присутствующих в ЕСМ.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение также относится к набухшим композициям, полученным путем обеспечения набухания способной к набуханию композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления. Следовательно, в настоящем изобретении предусматривается набухшая композиция, содержащая способную к набуханию композицию и способствующее набуханию средство. В частности, такими являются набухшие композиции, которые подходят для инъектирования. Набухшие композиции в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают подобную механическую прочность, что и Juvederm®.

Кроме того, набухшие композиции по настоящему изобретению можно настраивать для достижения еще большей механической прочности при необходимости и повышенной жизнеспособности инкапсулированных клеток.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, набухшая композиция характеризуется вязкостью от приблизительно более чем 0 до 200 Па·с, предпочтительно от 10 до 150 Па·с, более предпочтительно от 20 до 120 Па·с.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения, набухшая композиция характеризуется динамическим модулем упругости от приблизительно 1000 Па до приблизительно 3000 Па, предпочтительно от приблизительно 1500 Па до приблизительно 2500 Па.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, способную к набуханию композицию можно приводить в контакт со способствующим набуханию средством так, чтобы обеспечивать набухшую композицию, причем способствующее набуханию средство может быть выбрано из: воды, сыворотки, липоаспирата, внутривенных жидкостей, раствора NaCl, раствора глюкозы, раствора Хартмана, раствора стволовых клеток, плазмы крови, буферов, таких как DMEM, HEPES, и их комбинаций. Предпочтительным является липоаспират.

В соответствии с дополнительным аспектом в настоящем изобретении предусматривается способ получения способной к набуханию композиции и/или набухшей композиции, предусматривающий стадии: (а) обеспечения сшиваемого желатина. Для этой стадии желатин можно, например, модифицировать так, чтобы он включал сшиваемую функциональную группу, или обеспечивать уже модифицированным, фактически сшиваемая функциональная группа может представлять собой любую функциональную группу, которая способна сшиваться посредством химических, физических или ферментативных способов сшивания. Предпочтительно желатин модифицируют так, чтобы можно было получать химически сшитые пленки. Для достижения лучших способностей набухания, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения желатин со стадии (а) характеризуется содержанием воды от приблизительно 1 до 40% вес./об., предпочтительно от 2 до 30% вес./об., более предпочтительно от 5 до 25% вес./об. Обнаружили, что содержание воды в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения обеспечивает в дальнейшем лучшие значения способности набухания. Кроме того, было обнаружено, что чем больше % вес./об., тем сложнее полностью растворять желатин в воде, который, конечно, должен быть полностью растворен для последующего эффективного сшивания.

Дополнительная стадия представляет собой (b) сшивание желатина со стадии (а) с получением сшитого желатина; для этой стадии желатин сшивают посредством наиболее подходящего способа с получением взаимосвязей между цепями желатина. Химические способы сшивания являются предпочтительными. Предпочтительно можно применять методики цепной и ступенчатой полимеризации, вместе с другими типами исходных материалов, например, с множеством сшиваемых функциональных групп и полимерных цепей. В качестве альтернативы, желатин может обеспечиваться уже сшитым. В случае применения для химического сшивания способов с УФ-излучением было обнаружено, что предпочтительным является создавать 2D листы исходного материала для сшивания, который содержит фотоинициатор, а затем применять УФ-излучение к 2D листу для сшивания полимерного материала и, таким образом, получения сшитого желатина. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно предусматривает, что на стадии (b) желатин, обеспеченный на стадии (а), сшивают предпочтительно в форме пленки или листа. Тем не менее, также можно применять другие геометрические формы. Например, сшивание можно проводить в объеме, например, где желатин находится, например, в колбе. Композицию исходного материала можно регулировать с помощью различных методик полимеризации или изменения степени замещения желатина, так что способная к набуханию композиция и набухшая композиция в соответствии с настоящим изобретением имеет конкретные желаемые свойства.

Дополнительная стадия (с) представляет собой высушивание сшитого желатина, полученного на стадии (b). В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения, на стадии (с) сшитый желатин высушивают с применением способа, выбранного из следующего неисключительного списка методик: вакуумное высушивание, высушивание на воздухе, сублимационное высушивание, высушивание распылением. В случае высушивания распылением сшитого желатина будет требоваться стадия образования частиц. В предпочтительном варианте осуществления в соответствии с на-

стоящим изобретением сшитый желатин подвергают сублимационному высушиванию.

Кроме того, способ в соответствии с настоящим изобретением предусматривает стадию (d) измельчения высушенного желатина, полученного на стадии (c), с получением формы множества частиц с частицами желатина со средней сферичностью по Уделлу, Ф, составляющей не более 0,80, предпочтительно от 0,20 до 0,80, более предпочтительно от приблизительно 0,30 до приблизительно 0,70, более предпочтительно от приблизительно 0,40 до приблизительно 0,60; с получением таким образом способной к набуханию композиции, определенной в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления настоящего изобретения.

Измельчение в соответствии с настоящим изобретением проводят, пока не будет получен желаемый размер частиц. В предпочтительном варианте осуществления жидкий азот выливают на высушенный сшитый желатин таким образом, чтобы получить хрупкий материал, который затем можно с легкостью измельчать. Стадия (d) измельчения может происходить в присутствии или при отсутствии жидкого азота.

Посредством способа получения по настоящему изобретению можно получать способную к набуханию композицию и/или набухшую композицию, форму множества частиц, характеризующуюся несферическими частицами. В отличие от других способов из уровня техники, способ в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает получение сшитых частиц желатина, обеспечивающих улучшенную инъектируемость после набухания.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, на стадии (d) высушенный желатин измельчают до размера частиц от приблизительно 0,1 мкм до 2 мм, предпочтительно от 1 мкм до 1,5 мм, более предпочтительно от 5 мкм до 1 мм. Этот размер частиц является предпочтительным, поскольку он обеспечивает простоту введения набухшей композиции. В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно предусматривает, что стадию (d) измельчения проводят в присутствии жидкого азота.

После стадии измельчения получают способную к набуханию композицию в соответствии с настоящим изобретением. Способную к набуханию композицию, которая представлена в форме множества частиц, можно применять непосредственно с клетками или без них или можно хранить перед применением (например, с помощью фосфатно-солевого буфера, дистиллированной H₂O, аутологичной плазмы, липоаспирата и т.д.).

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, в данном документе предусматривается способ получения набухшей композиции, где способ получения способной к набуханию композиции в соответствии с настоящим изобретением дополнительно предусматривает стадию (e) добавления способствующего набуханию средства в указанную способную к набуханию композицию, полученную на стадии (d), с получением таким образом набухшей композиции. В конкретном варианте осуществления способствующее набуханию средство может быть выбрано из списка в соответствии с настоящим изобретением, содержащего без ограничения: воду, сыворотку, липоаспират, внутривенные жидкости, раствор NaCl, раствор глюкозы, раствор Хартмана, раствор стволовых клеток, плазму крови, буферы, такие как DMEM, HEPES, и их комбинации. Предпочтительно способствующее набуханию средство представляет собой липоаспират.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно предусматривает стадию (f) добавления в набухшую композицию, полученную на стадии (e), компонента, выбранного без ограничения из стволовых клеток, стромально-васкулярных фракций или их комбинаций. В набухшие композиции можно добавлять различные компоненты, например, перед инъектированием, в соответствии с настоящим изобретением для выполнения конкретной функции. Например, наиболее чувствительные компоненты, которые необходимо добавлять по отдельности, можно вводить в набухшую композицию после способствующего набуханию средства. Например, стромально-васкулярные фракции можно добавлять после того, как произошло набухание.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предусматривается применение способной к набуханию композиции, определенной в любом из предыдущих вариантов осуществления, и/или набухшей композиции, полученной из нее, например, без ограничения в пищевой промышленности, косметической промышленности, медицине человека и/или ветеринарной медицине.

В конкретном варианте осуществления в медицине человека и/или ветеринарной медицине применение способной к набуханию композиции и/или набухшей композиции на ее основе может представлять собой таковое для доставки лекарственных средств и/или доставки клетки, а также в качестве наполнителя, например, в качестве наполнителя для косметического средства. В дополнительном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способную к набуханию композицию и/или набухшую композицию на ее основе, описанную в данном документе, можно применять в получении крема или мази в качестве гелеобразователя или загустителя, например, в пищевой промышленности в качестве замены альгинатов, или в косметической промышленности в получении крема или мази, что не подразумевает как исчерпывающее ограничение ее возможных вариантов применения.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, способную к набуханию композицию и/или набухшую композицию на ее основе применяют в качестве имитатора внеклеточного матрикса.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения, таким образом предусматривается применение способной к набуханию композиции и/или набухшей композиции на ее основе в качестве композиции в областях применения в тканевой инженерии, таких как эстетические процедуры, реконструкция большого объема тканей, реконструкция небольшого объема тканей, пересадка жировой ткани, липофилинг, раны от ожогов, области применения в стоматологии, инженерия хрящевых и костных тканей, инженерия мягких тканей (жировой, позвоночного столба, сердечной и т.п.), инженерия тканей мышц и сухожилий.

Экспериментальная часть материалы и методы

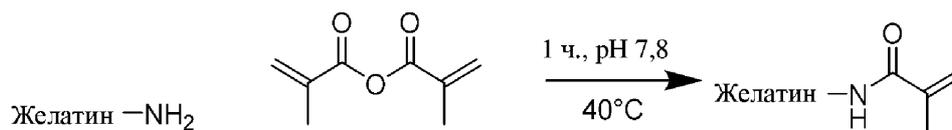
Желатин типа В (Gel-B), выделенный из шкуры быка посредством щелочного процесса, получали от Rousselot (Гент, Бельгия). 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), N-ацетилгомоцистеина тиолактон, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), 5-норборнен-2-карбоновую кислоту и метакриловый ангидрид закупали у Sigma-Aldrich (Дигем, Бельгия). Диметилсульфоксид (DMSO) и N-гидроксисукцинимид (NHS) получали от Acros (Гел, Бельгия). Диализные мембраны Spectrapor MWCO 12000-14000 Да закупали у PolyLab (Антверпен, Бельгия). Среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), GlutaMax, эмбриональную бычью сыворотку (FBS), 1% пенициллин/стрептомицин и TрупLE (состоящий из 0,025 трипсина и 0,01 EDTA) получали от Gibco, Life technologies (Калифорния, США). Кальцеин-ацетоксиметилловый сложный эфир (кальцеин-AM), йодид пропидия (PI) и краситель Bodipy получали от Sigma-Aldrich.

Оборудование: Сублимационная сушилка: Сублимационная сушилка Christ Alpha 1-5; ЯМР: Bruker WH 500 МГц.

Синтез GelMODNB.

В соответствии с примером настоящего изобретения описан синтез полимеров GELMODNB с низкой и высокой степенью замещения, в частности, описан полимер GELMODNB с DS 39/61 и GELMODNB DS 66/34 (соотношение представляет собой метакриламид/норборнен).

На первой стадии желатин метакрилируют в соответствии с протоколом, о котором впервые сообщалось у Van den Bulcke et al., 2000.



Растворяли 100 г желатина В (38,5 ммоль аминов) в 1 л фосфатного буфера при 40°C с механическим перемешиванием. Затем добавляли либо 1 (5,736 мл; 38,5 ммоль), либо 0,75 (4,302 мл; 28,875 ммоль) эквивалента метакрилового ангидрида относительно первичных аминов желатина, после чего раствор тщательно перемешивали в течение 1 ч. Через 1 ч добавляли 1 л Milli-Q в реакционную смесь. Раствор подвергали диализу с применением Milli-RO (срез Spectrapor 4: 12-14 кДа) в течение 24 ч при 40°C (воду сменяли 5 раз). Затем раствор переносили в чашки Петри при комнатной температуре для обеспечения образования геля из желатина. После образования геля чашки Петри замораживали при -20°C, обеспечивая последующее удаление льда путем лиофилизации, получая модифицированный желатин со степенью замещения 60-70%.

Затем высушенный GelMOD применяли для следующей стадии, на которой норборненовые функциональные группы будут добавлены при оставшихся свободных аминах. Для этого растворяли 1,2 эквивалента (относительно первичных аминов в желатине типа В) 5-норборнен-2-карбоновой кислоты в 50 мл DMSO при комнатной температуре, см. J. Van Hoorig et al., 2018. После полного растворения в раствор добавляли 0,75 эквивалента (относительно количества аминов, присутствующих в желатине) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) с последующей дегазацией. Через 5 мин в раствор добавляли 1,125 эквивалента N-гидроксисукцинимид (NHS). Через 25 ч реакции активированный раствор добавляли в раствор GelMOD (см. ниже) и обеспечивали протекание реакции в течение ночи таким образом, чтобы получить GelMODNB. Для получения раствора GelMOD растворяли 10 г GelMOD в 150 мл сухого DMSO при 50°C в инертной атмосфере и при условиях возврата флегмы в течение 4 ч. После добавления активированного раствора в GelMOD установку дегазировали 3 раза и помещали в атмосферу аргона. После завершения реакции получали GelMODNB. Материал осаждали в десятикратном избытке ацетона, фильтровали на бумажном фильтре с размером пор 12-15 мкм. Промывали ацетоном, повторно растворяли в milliQ и помещали на диализ (срез spectrapor 4: 12-14 кДа). Воду заменяли 5 раз в течение 24 ч. После диализа pH раствора регулировали до 7,4 с помощью 1M раствора NaOH, обеспечивало прозрачность раствора. Затем материал замораживали и лиофилизовали для удаления воды (сублимационная сушилка Christ alpha 1-5). Давление и температуру внутри сублимационной сушилки снижали до 0,37 мбар и -80°C соответственно, с целью удаления кристаллов льда внутри материала путем сублимации.

Можно получать GelMODNB с различными степенями замещения путем варьирования эквивалентов метакрилового ангидрида и/или 5-норборнен-2-карбоновой кислоты и других реагентов при необхо-

димости и, таким образом, адаптировать процедуру выше.

Определение характеристик GelMODNB.

Степень замещения (DS) первичных аминов в желатине с помощью функциональных групп норборнена и метакриламида определяли количественно с помощью ^1H -ЯМР спектроскопии в соответствии со способом, описанным в J. Van Hoorick et al., 2018, и Van Den Bulcke et al., 2000. Применяли Bruker WH 500 МГц с оксидом дейтерия (D_2O) в качестве растворителя при 40°C .

Порошок GelMODNB.

Сначала растворяли 10% вес./об. раствор синтезированного выше материала при 40°C во флаконе в milliQ. После полного растворения добавляли 0,6 ммоль фотоинициатора (фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат лития; Li-TPO). Затем материал помещали между двумя стеклянными пластинами, разделенными разделителем толщиной 1 мм и помещали под свет УФ-А ($\pm 9,5$ мВт/см 2) на 30 мин. Общая доза УФ-А, таким образом, составляла 17,1 Дж/см 2 . После УФ-отверждения образцы замораживали с последующим сублимационным высушиванием и измельчением образцов до желаемого размера частиц, составляющего 1-150 мкм. На стадии измельчения применяли жидкий азот, чтобы сделать материал более хрупким.

Механический анализ.

Применяли реометр (Physica MCR-301; Anton Paar, Синт-Мартенс-Латем, Бельгия) для определения динамического модуля упругости (G'), который обеспечивает указание упругих свойств материала. Получали 10% вес./об. раствор порошка с применением воды milliQ. Материал оценивали по сравнению с Juvederm®. Помещали 300 мкл раствора между пластинами с применением установки зазора, составляющего 0,3 мм. Затем ребра подрезали и герметично закрывали с применением силиконовой смазки (Mittelviskos) (Bayer, Sigma-Aldrich, Дигем, Бельгия) для предотвращения высыхания образца. Для определения механической прочности применяли частоту колебаний 1 Гц и натяжение 0,1%, поскольку последнее значение находится в диапазоне линейных вязкоупругих свойств, определенных с помощью изотермических измерений (37°C) динамического модуля упругости (G') и модуля потерь (G'') в зависимости от деформации при постоянной частоте (1 Гц) и переменном натяжении (0,01-10%).

Эксперименты по инкапсуляции клеток.

Жировые стромальные клетки человека или ASC, выделенные из липоаспирата, применяли для экспериментов по инкапсуляции клеток. Для этого обеспечивали набухание материала в стерильном PBS при 10% вес./об. Инкапсуляцию клеток проводили путем смешивания способной к набуханию композиции с ASC при плотности 10000 клеток/100 мкл. 96-Луночные планшеты применяли для введения 100 мкл материала, к которому добавляли еще 100 мкл среды. Материал оценивали по сравнению с Juvederm® и тканевым культуральным пластиком (TCP), в который включали 10000 клеток в 100 мкл материала, или высевали непосредственно на луночный планшет, соответственно. Луночный планшет помещали в инкубатор при 37°C и в присутствии 5% CO_2 .

Для анализов дифференциации основную культуральную среду (DMEM, 10% FBS, 1% пенициллина/стрептомицина) заменяли на липогенную среду для дифференциации (DMEM, 10% FBS, 1% пенициллина/стрептомицина, 1 μM дексаметазона, 200 μM индометацина, 10 мкг/мл инсулина, 0,5 мМ IBMX) через 48 ч. Среду обновляли каждые 2-3 дня.

Анализ жизнеспособности живых/фиксированных клеток.

Цитосовместимость инкапсулированных материалов, полученных выше, тестировали путем анализа жизнеспособности живых/фиксированных клеток с применением окрашивания ацетоксиметилловым сложным эфиром кальцеина (кальцеин-AM) и йодидом пропидия (PI). В каждый 1 мл PBS добавляли 2 мкл кальцеина-AM и 2 мкл PI. Применяли 96-луночный планшет и добавляли 0,15 мл раствора в каждую лунку. Лунки инкубировали в темноте путем их помещения под алюминиевую фольгу на 10 мин при комнатной температуре. Применяли флуоресцентный микроскоп с фильтром для зеленого флуоресцентного белка (GFP) для кальцеина для визуализации живых клеток. Применяли фильтр для тегасского красного (TxRed) для визуализации фиксированных клеток с применением PI. Количественное определение соотношения живых/фиксированных клеток реализовали с помощью программного обеспечения ImageJ, что облегчало подсчет как живых, так и фиксированных клеток. Соответствующие полученные графики результатов анализов жизнеспособности клеток показаны на фиг. 2.

Адипогенная дифференциация.

Сначала получали исходный раствор красителя Bodipy (493/503) с концентрацией 0,5 мг/мл (1,9 мМ) в этаноле (100%). Когда Bodipy полностью растворялся, исходный раствор хранили в пробирках Eppendorf, замораживали и защищали от света.

Флуоресцентное окрашивание проводили путем обеспечения оттаивания флакона Eppendorf, содержащего исходный раствор, и растворения 12 мл в 1 мл среды без сыворотки. Раствор механически эмульгировали путем тщательного перемешивания. Окрашивание клеток с помощью Bodipy осуществляли путем добавления 75 мкл раствора Bodipy к 75 мкл свежей среды в 96-луночном планшете, содержащем материал, и инкубировали в течение 15 мин. Получение изображений проводили с помощью флуоресцентного микроскопа с фильтром для GFP.

Получение изображений SEM.

Морфологию частиц желатина получали с помощью сканирующего электронного микроскопа Phenom FEI (электронная пушка с вольфрамовой шпилькой, детектор электронов обратного рассеяния). Чтобы избежать накопления заряда в образцах, наносили золотое покрытие (плазменное магнетронное ионное напыление) на поверхность образцов перед измерениями (автоматическое устройство для ионного напыления K550X с двухступенчатым центробежным лопастным насосом RV3).

Сферичность и угловатость.

Расчеты сферичности проводили с применением программного обеспечения ImageJ в отношении полученных изображений SEM. При этом сферичность S рассчитывали путем измерения наибольшего диаметра частиц и диаметра частиц в положении, развернутом на 90° . Сферичность S частицы определяется как отношение горизонтальной оси/вертикальная ось, причем вертикальная ось меньше или равна горизонтальной оси.

Сферичность по Уоделлу, ϕ , измеряли путем изображения наибольшей вписанной окружности и наименьшей описанной окружности в программном обеспечении и измерения диаметра этих полученных окружностей. Сферичность по Уоделлу определяется как:

$$\phi = \frac{d_c}{D_c}$$

Где d_c представляет собой диаметр наибольшей вписанной окружности, а D_c представляет собой диаметр наименьшей описанной окружности. Угловатость частиц получали с помощью способа, впервые описанного Lees et al., 1964, где она определяется следующим образом:

$$A_i = (180^\circ - \alpha) \frac{x}{r}$$

Где a представляет собой измеренный угол, x - расстояние вершины угла от центра максимальной вписанной окружности, а r - радиус максимальной вписанной окружности. Все измерения сферичности по Уоделлу, ϕ , сферичности S и угловатости проводили на 25 частицах.

Данные стабильности.

Применяли реометр (Physica MCR-301; Anton Paar, Синт-Мартенс-Латем, Бельгия) для определения динамического модуля упругости (G') и вязкости в заранее определенные моменты времени. Получали 10% вес./об. раствор порошка с применением воды milliQ. Помещали 300 мкл раствора помещали между пластинами с применением установки зазора, составляющего 0,3 мм. Для определения механической прочности применяли частоту колебаний 1 Гц и деформацию 0,1%. Вязкость измеряли в зависимости от скорости сдвига, которая варьировалась в диапазоне 0,1-1000 с^{-1} . Измерения стабильности проводили в трех повторностях.

Данные in vivo.

Использовали швейцарских "голых" мышей для выполнения субмаммарной инъекции набухшей композиции в присутствии стромально-васкулярной фракции и адипоцитов, полученных из липоаспирата человека, по сравнению с Juvederm®, объединенным с клетками. Через 3 месяца мышей умерщвляли и проводили гистологию ex vivo. Все образцы фиксировали в течение ночи в 4% параформальдегиде, дегидратировали в серии спиртов с растущей концентрацией, очищали толуолом и заключали в парафин. С применением микротомы (Reichert-Jung 2040) образцы разделяли на слои толщиной 5 мкм и затем депарафинировали, регидратировали и окрашивали. Для оценки общей морфологии проводили окрашивание гематоксилин/эозин (HE) (VWR, ThermoFisher) в соответствии со стандартными протоколами.

Данные сравнения - Сферические частицы по сравнению с таковыми по настоящему изобретению.

Далее фиг. 8 демонстрирует сравнительные результаты измерений динамического модуля упругости набухших частиц желатина в соответствии с настоящим изобретением, на которые в легенде ссылаются как частицы (светло-серый), по сравнению со способными к набуханию частицами желатина со сферической геометрической формой, полученными с помощью эмульсии типа "вода-в-масле" (как показано на фиг. 5), применяли реометр (Physica MCR-301; Anton Paar, Синт-Мартенс-Латем, Бельгия) для определения динамического модуля упругости (G'), что обеспечивает указание на упругие свойства материала. Получали 10% вес./об. раствор порошка с применением воды milliQ. Материал оценивали по сравнению со сферическими частицами, полученными с помощью эмульсии типа "вода-в-масле" из того же исходного материала, что и для частиц, описанных в настоящем изобретении. Для определения механической прочности применяли частоту колебаний 1 Гц и деформацию 0,1%.

Результаты.

Результаты механического анализа.

Полученные гели сравнивали с Juvederm® в отношении механических свойств, и здесь можно увидеть, что полученные гели GelMODNB, т.е. GelMODNB DS39/61 (желатин со степенью замещения 39% метакриламида и 61% норборнена), GelMODNB DS66/34 (желатин со степенью замещения 66% метакриламида и 34% норборнена) и GelMODNB DS66/34 сывороткой, характеризуются подобной механической прочностью по сравнению с эталоном Juvederm®, причем вариант GelMODNB DS66/34 является наиболее успешным. См. фиг. 1.

Фиг. 1 показывает, что механическая прочность гелей GelMODNB является сравнимой с таковой для Juvederm®, который является уже четко определенным как коммерчески доступный наполнитель для косметического средства. В зависимости от жидкости, в которой материал набухает, и сшиваемых фрагментов, можно увидеть, что есть отличия в механических свойствах (например, между вариантом DS39/61 и вариантом DS66/34). Эти различия показывают, что число сшиваемых фрагментов является важным для получения надлежащим образом инъекцируемой системы наполнителя.

Результаты анализа в отношении жизнеспособности клеток и адипогенной дифференциации.

Жизнеспособность инкапсулированных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, оценивали для TCP, Juvederm®, GelMODNB DS66/34 и GelMODNB DS66/34 с сывороткой, на основе окрашивания живых/фиксированных клеток с кальцеином-AM и йодидом пропидия в различные моменты времени (в 1-й день, 3-й день, 7-й день). Здесь авторы настоящего изобретения наблюдали четкую морфологию клеток на своих материалах с клеточной пролиферацией и превосходной жизнеспособностью по сравнению с эталоном Juvederm®. См. фиг. 2 для графиков. Фиг. 2 показывает на графике значительное повышение жизнеспособности клеток по сравнению с Juvederm®. % жизнеспособности клетки показывает явное превосходство материала в соответствии с настоящим изобретением на 3-й день и особенно на 7-й день.

Изображение, относящееся к жизнеспособности клетки (не показано), связанное с анализом, представленным на фиг. 2, дополнительно демонстрирует, что GelMODNB DS66/34 и GelMODNB DS66/34 с сывороткой обеспечивают лучшую жизнеспособность клетки, в частности, видимое увеличение числа клеток, присутствующих в данном материале, по сравнению с Juvederm. Лучшая жизнеспособность клетки обеспечивает возможность преимущественного применения материалов в соответствии с настоящим изобретением, например, для целей тканевой инженерии. Изображение дополнительно показывает, что материал будет выступать в качестве имитатора ECM в течение времени, когда клетки могли начать развивать свой собственный ECM.

Дополнительное изображение, касающееся адипогенной дифференциации (не показано), демонстрирует, что инкапсулированные клетки в материалах в соответствии с настоящим изобретением распределяются по их правильной морфологии и характеризуются высоким потенциалом пролиферации, который можно объяснить как биосовместимостью материала, так и наличием последовательностей RGD. Кроме того, изображение дифференциации демонстрирует дифференциацию полученных из жировой ткани стволовых клеток в адипогенной линии. Окрашивание с помощью Bodipy применяли для оценки, что внутриклеточные липидные капли присутствовали только в (пре-)адипоцитах. Здесь можно наблюдать, что в GelMODNB DS 66/34 присутствуют более дифференцированные клетки по сравнению с Juvederm, что, вероятнее всего, связано с низкой жизнеспособностью на 7-й день клеток, инкапсулированных в Juvederm.

Изображения SEM и сферичность.

Как можно увидеть на изображении SEM, фиг. 3, получали частицы неправильной геометрической формы с поверхностью с гранями и высокой степенью угловатости. В связи с этим, сферичность по Уодделлу рассчитывали и среднее значение $0,46 \pm 0,28$ получали для частиц в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, их геометрическая форма была дополнительно измерена как характеризующаяся средней сферичностью S, составляющей $1,302 \pm 0,2159$. Наконец, среднюю угловатость A; образцов рассчитывали на уровне $406,6 \pm 271,9$. Кроме того, фиг. 4, демонстрирует изображения из оптического микроскопа способных к набуханию частиц желатина (слева) и набухших частиц желатина (справа) в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, фиг. 5 демонстрирует изображения с оптического микроскопа способных к набуханию частиц желатина не в соответствии с настоящим изобретением, полученных посредством эмульсии типа "вода-в-масле" с последующим сшиванием. Сферичность по Уодделлу этих сферических частиц, полученных посредством эмульсии типа "вода-в-масле", также измеряли, и получали значение средней сферичности по Уодделлу, составляющее $0,93 \pm 0,04$. Различие в сферичности по Уодделлу явно показывает, что частицы желатина, полученные посредством эмульсии типа "вода-в-масле", имеют геометрическую форму, похожую на таковую сферы, в отличие от частиц желатина в соответствии с настоящим изобретением.

Стабильность.

Высушенные частицы хранили в течение множества месяцев в сухом состоянии либо при комнатной температуре, либо в холодильнике (6-8°C). Полученные значения динамического модуля упругости можно наблюдать в таблице в данном документе ниже.

	Механические свойства (Па)	
	Холодильник	Комнатная температура
Месяц 1	3430 ± 568	3120 ± 369

Месяц 3	3240 ± 247	2846 ± 485
Месяц 6	3330 ± 342	3159 ± 147
Месяц 9	2930 ± 232	2597 ± 587
Месяц 12	3156 ± 477	2987 ± 236
Месяц 15	3867 ± 355	3548 ± 422

Никакой значительной разницы не наблюдали ни с течением времени, ни между обоими способами консервации. Таким образом, можно было сделать вывод, что способная к набуханию композиция является стабильной с течением времени. Измерения вязкости набухших композиций показаны на фиг. 6.

Данные *in vivo*.

Из-за большей стойкости к деформации сдвига набухшая композиция оставалась локализованной, как можно увидеть на фиг. 7А. Кроме того, по сравнению с уровнем Juvéderm (фиг. 7В) можно наблюдать надлежащую васкуляризацию, а также множество кластеров адипоцитов.

Данные сравнения - частицы со сферической геометрической формой по сравнению с таковыми по настоящему изобретению.

Далее фиг. 8 демонстрирует сравнительные результаты измерений динамического модуля упругости набухших частиц желатина в соответствии с настоящим изобретением, на которые в легенде ссылаются как на частицы (светло-серый), по сравнению со способными к набуханию частицами желатина со сферической геометрической формой, полученными посредством эмульсии типа "вода-в-масле" (как показано на фиг. 5), на которые в легенде ссылаются как на сферы (черный). Данные результаты демонстрируют положительный эффект, который дробленная неупорядоченная геометрическая форма частиц желатина обеспечивает набухшей композиции, по сравнению с набухшей композицией, содержащей сферические частицы. Набухшая композиция по настоящему изобретению характеризовалась большей механической прочностью по сравнению с этими сферическими частицами. Поскольку основной материал, содержание воды и степень сшивания являются подобными, увеличение динамического модуля упругости можно пояснить большей внешней силой трения, что обеспечивает более связанный гель. Такие высокие силы трения будут непосредственно коррелировать с большей стойкостью к деформации сдвига.

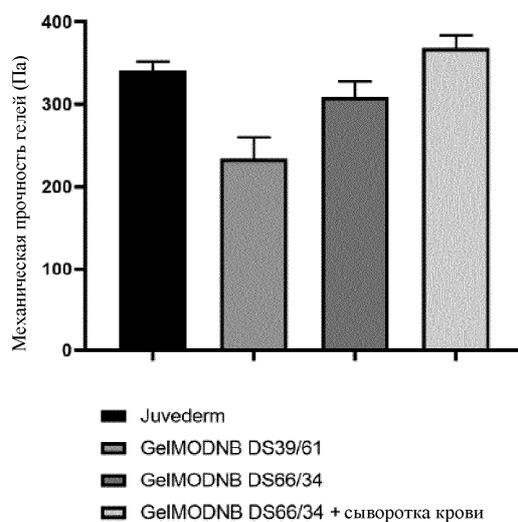
Ссылки.

1. J. Van Hoorick, P. Gruber, M. Markovic, M. Rollot, G.J. Graulus, M. Vagenende, M. Tromayer, J. Van Erps, H. Thienpont, J.C. Martins, S. Baudis, A. Ovsianikov, P. Dubruel, S. Van Vlierberghe, Highly reactive thiol-norbornene photo-click hydrogels: toward improved processability, *Macromol. Rapid Commun.* 39 (2018) 1–7, <https://doi.org/10.1002/marc.201800181>
2. A.I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E.H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels, *Biomacromolecules* 1 (2000) 31–38, <https://doi.org/10.1021/bm990017d>.
3. S. Van Vlierberghe, E. Schacht, P. Dubruel, Reversible gelatin-based hydrogels: Finetuning of material properties, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 1039–1047, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.02.015>.
4. Van Vlierberghe, S., Fritzing, B., Martins, J. C., & Dubruel, P. (2010). Hydrogel Network Formation Revised: High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance as a Powerful Tool for Measuring Absolute Hydrogel Cross-Link Efficiencies. *Applied Spectroscopy*, 64(10), 1176–1180. <https://doi.org/10.1366/000370210792973550>.
5. Wadell, H. (1935). Volume, Shape, and Roundness of Quartz Particles. *The Journal of Geology*, 43(3), 250–280. doi:10.1086/624298.
6. LEES, G. (1964), A new method for determining the angularity of particles. *Sedimentology*, 3: 2-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.1964.tb00271.x>

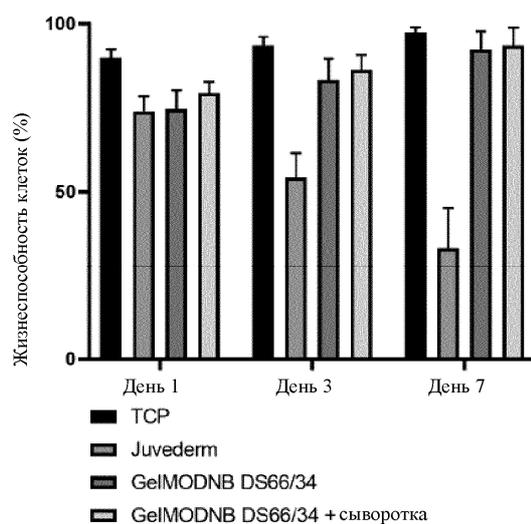
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способная к набуханию фармацевтическая композиция, содержащая: желатин, который находится в сшитом состоянии перед набуханием, и при этом указанная способная к набуханию фармацевтическая композиция представлена в форме множества частиц и содержит частицы желатина с гранями и ребрами.
2. Способная к набуханию фармацевтическая композиция по п.1, где указанные частицы характеризуются средней сферичностью по Уделлу, ϕ , составляющей не более 0,80.
3. Способная к набуханию фармацевтическая композиция по п.2, где указанные частицы характеризуются средней сферичностью по Уделлу, ϕ , составляющей от 0,20 до 0,80, предпочтительно от приблизительно 0,30 до приблизительно 0,70, более предпочтительно от приблизительно 0,40 до приблизительно 0,60.
4. Способная к набуханию фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, где желатин содержит по меньшей мере первую полимерную цепь со сшиваемой функциональной группой в указанном сшитом состоянии.
5. Способная к набуханию фармацевтическая композиция по пп.1-4, где указанная форма множества частиц содержит частицы с размером частиц от приблизительно 0,1 мкм до 2 мм, предпочтительно от 1 мкм до 1,5 мм, более предпочтительно от 5 мкм до приблизительно 1 мм, определенным с помощью оптической микроскопии.
6. Набухшая фармацевтическая композиция, содержащая способную к набуханию фармацевтическую композицию по любому из пп.1-5 и по меньшей мере одно способствующее набуханию средство.
7. Набухшая фармацевтическая композиция по п.6, где набухшая фармацевтическая композиция характеризуется вязкостью от приблизительно более чем 0 до 200 Па·с, предпочтительно от 5 до 150 Па·с, более предпочтительно от 10 до 120 Па·с, определенной с помощью реологии в зависимости от скорости сдвига, которая варьировалась в диапазоне 0,1-1000 с⁻¹.
8. Способ получения способной к набуханию фармацевтической композиции по любому из пп.1-5, предусматривающий стадии:
 - (а) обеспечения сшиваемого желатина;
 - (б) сшивания желатина со стадии (а) с получением сшитого желатина;
 - (с) высушивания сшитого желатина, полученного на стадии (б);
 - (д) измельчения высушенного желатина, полученного на стадии (с), с получением формы множества частиц, содержащей частицы желатина с гранями и ребрами;с получением таким образом способной к набуханию фармацевтической композиции по любому из пп.1-5.
9. Способ получения способной к набуханию фармацевтической композиции по п.8, где стадия (д) дополнительно предусматривает измельчение высушенного желатина с получением таким образом частиц со средней сферичностью по Уделлу, ϕ , составляющей не более 0,80, предпочтительно от 0,20 до 0,80, более предпочтительно от приблизительно 0,30 до приблизительно 0,70, более предпочтительно от приблизительно 0,40 до приблизительно 0,60.
10. Способ получения набухшей фармацевтической композиции, предусматривающий применение способа по п.8 или 9, и
 - (е) добавление способствующего набуханию средства в указанную способную к набуханию фармацевтическую композицию, полученную на стадии (д), с получением таким образом набухшей фармацевтической композиции.
11. Способ по п.10, дополнительно предусматривающий стадию:
 - (ф) добавления в набухшую фармацевтическую композицию, полученную на стадии (е), компонента, выбранного из: клеток, стволовых клеток, фармацевтически активных соединений, факторов роста или их комбинаций.
12. Способ по п.10 или 11, где на стадии (б) желатин сшивают в форме пленки или листа.
13. Способ по любому из пп.10-12, где на стадии (с) сшитый желатин подвергают сублимационному высушиванию.
14. Применение способной к набуханию фармацевтической композиции по любому из пп.1-5 или набухшей фармацевтической композиции по любому из пп.6-7 в качестве лекарственного препарата в медицине человека и/или ветеринарной медицине.
15. Применение способной к набуханию фармацевтической композиции по любому из пп.1-5 или набухшей фармацевтической композиции по любому из пп.6-7 в пищевой промышленности, косметических средствах, доставке лекарственных средств, и/или доставке клетки, и/или в качестве доставки фактора роста, и/или в качестве наполнителя для косметического средства, в получении крема или мази в качестве гелеобразователя или загустителя, в качестве имитатора внеклеточного матрикса, в качестве композиции в областях применения в тканевой инженерии, в частности, где области применения в тканевой инженерии выбраны из эстетических процедур, реконструкции большого объема тканей, реконструкции небольшого объема тканей, пересадки жировой ткани, липофилинга, раны от ожогов, области

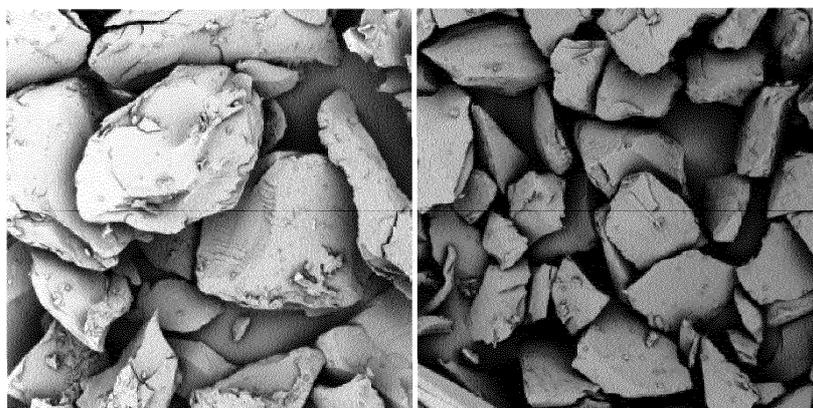
применения в стоматологии, инженерии хрящевых и костных тканей, инженерии мягких тканей, такой как инженерия жировой ткани, ткани позвоночного столба, сердечной ткани, инженерии тканей мышц и сухожилий.



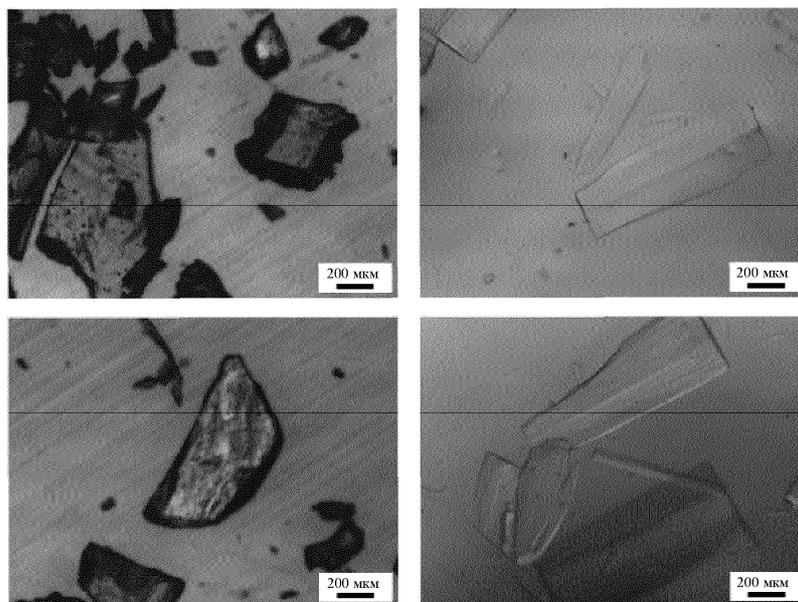
Фиг. 1



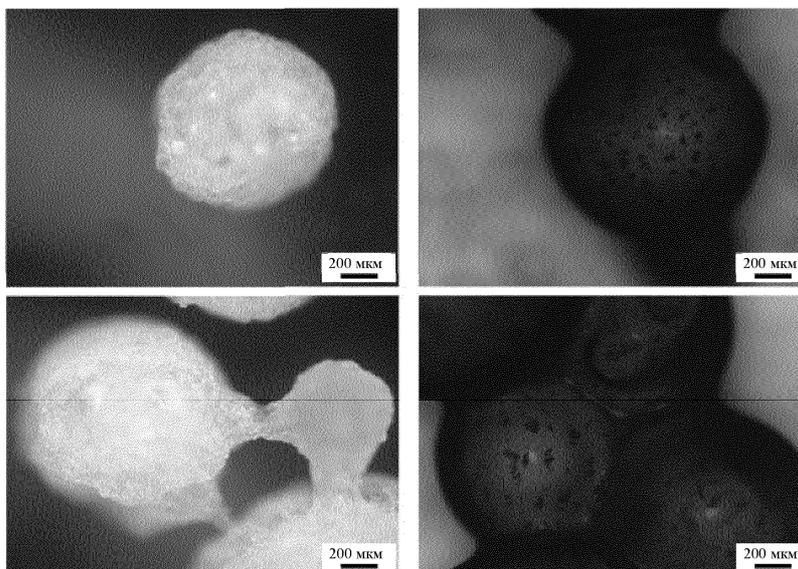
Фиг. 2



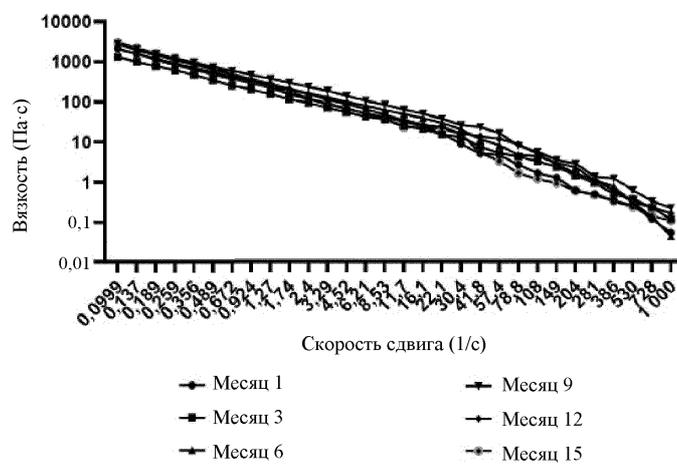
Фиг. 3



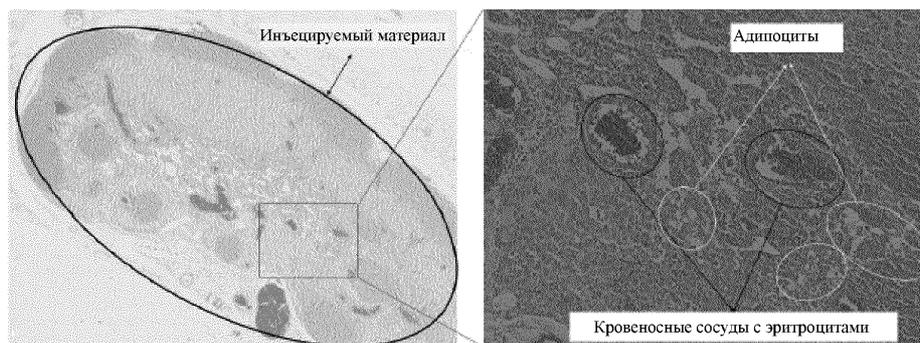
Фиг. 4



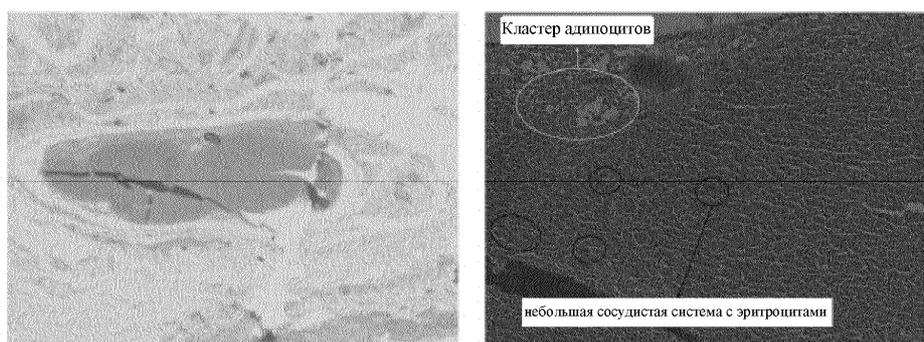
Фиг. 5



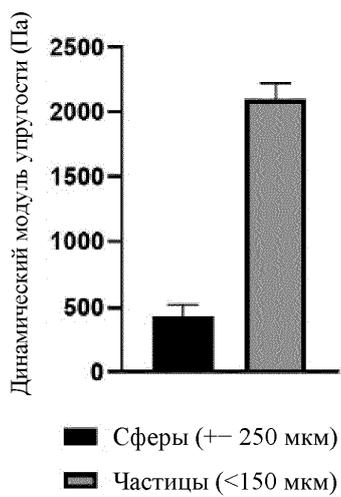
Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8