(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112334166 A
(43)申请公布日 2021.02.05

(21)申请号 201980039819.X

(22)申请日 2019.06.14

(30)优先权数据
18178097.4 2018.06.15 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/065754 2019.06.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/238953 EN 2019.12.19

(71)申请人 克罗马药品有限责任公司
地址 奥地利莱奥本多夫

(72)发明人 马丁·普林茨 拉尔夫·霍劳斯 罗伯特·萨赫森霍夫

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201
代理人 杜德海

(51)Int.Cl.
A61L 27/20(2006.01)
A61L 27/50(2006.01)
A61L 27/52(2006.01)
A61L 27/60(2006.01)
A61K 8/73(2006.01)
A61Q 19/08(2006.01)

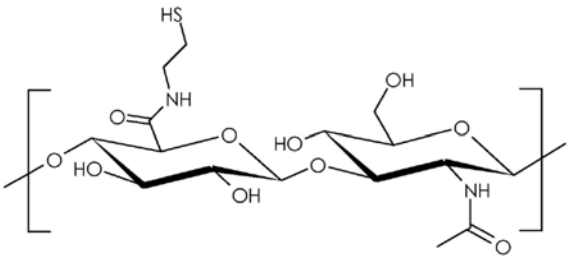
权利要求书2页 说明书23页 附图1页

(54)发明名称

包含交联聚合物的水凝胶组合物

(57)摘要

包含交联聚合物的无菌水凝胶组合物,其中所述交联聚合物是巯基修饰的透明质酸的氧化产物,并且其中所述巯基修饰的透明质酸的巯基部分对透明质酸的修饰度大于约80μmol/克聚合物,其中所述巯基修饰的透明质酸的巯基部分对透明质酸的修饰度小于约280μmol/克聚合物,并且其中所述巯基修饰的透明质酸的平均分子量为至少400kDa。



CN 112334166 A

1.一种包含交联聚合物的无菌水凝胶组合物，

其中所述交联聚合物是巯基修饰的透明质酸的氧化产物，

其特征在于，

所述巯基修饰的透明质酸的巯基修饰度大于约80μmol/克聚合物、优选大于约105μmol/克聚合物、更优选大于约120μmol/克聚合物，

所述巯基修饰的透明质酸的巯基修饰度小于约280μmol/克聚合物、优选小于约240μmol/克聚合物、更优选小于200μmol/克聚合物，并且

其中所述巯基修饰的透明质酸的平均分子量为至少400kDa、优选至少500kDa、更优选至少600kDa。

2.根据权利要求1所述的组合物，其中所述交联聚合物的平均还原灭菌后分子量大于约250kDa、优选大于约300kDa、更优选大于约350kDa，其中所述平均还原灭菌后分子量被定义为在将所述交联聚合物暴露于还原条件后来自所述无菌水凝胶组合物的还原的巯基修饰的透明质酸的平均分子量。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的组合物，其中所述巯基修饰的透明质酸以至多14mg/mL、优选至多12mg/mL、更优选至多10mg/mL的浓度包含在所述组合物中。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物，其中所述巯基修饰的透明质酸以至少3mg/ml、更优选至少4mg/ml的浓度包含在所述组合物中。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的组合物，其中所述组合物还包含局部麻醉剂，优选利多卡因。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的组合物，其中所述巯基修饰的透明质酸是通过酰胺键与透明质酸连接的修饰剂的缀合物，其中所述修饰剂选自包含以下的组：谷胱甘肽，包含C_2-C_6线性或支化烷基链的氨基烷基硫醇，半胱氨酸，高半胱氨酸，半胱胺、半胱氨酸和高半胱氨酸的氨基酸衍生物，高半胱氨酸的羧酸酯和半胱氨酸的羧酸酯。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的组合物，其中所述巯基修饰的透明质酸是透明质酸-半胱胺缀合物(HA-半胱胺)。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的组合物，其中所述组合物还包含未修饰的聚合物，所述未修饰的聚合物选自生物相容性多糖的组，优选未修饰的透明质酸。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的组合物，其中相对于所述巯基修饰的透明质酸的修饰度，所述组合物的残留巯基含量小于20％、优选小于15％。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的组合物，其特征在于比挤出力为30N或更低，其中所述比挤出力是在以12mm/min的挤出速率将所述组合物从具有测量为30G的规格(G)的内腔的皮下注射针的标准1mL玻璃注射器挤出期间测量的。

11.用于注射的施用单元，包括注射器和至少一个皮下注射针，其中所述注射器填充有根据权利要求1至10中任一项所述的水凝胶组合物。

12.根据权利要求11所述的施用单元，其中所述至少一个皮下注射针的特征在于测量为至少27G、优选27G至32G的规格的内腔。

13.根据权利要求11至12中任一项所述的施用单元，其中所述施用单元包括至少两个皮下注射针，所述两个皮下注射针的内腔彼此不同。

14.根据权利要求1至10中任一项所述的组合物或根据权利要求11至13中任一项所述

的施用单元的美容用途。

15.根据权利要求14所述的组合物的美容用途，其中所述组合物作为软组织填充物施用。

16.根据权利要求14或15所述的美容用途，用于填充皱纹、皮肤缺陷，恢复面部或身体的损失体积，减小蜂窝织炎中的凹陷，塑造面部或身体轮廓。

17.美容方法，包括皮下、骨膜上或皮内注射根据权利要求1至10中任一项所述的组合物的步骤。

18.根据权利要求1至10中任一项所述的组合物，用于作为药物使用。

19.根据权利要求18使用的所述组合物，其中所述组合物作为软组织填充物施用。

20.根据权利要求18使用的所述组合物，其中所述组合物被用于组织增强。

21.根据权利要求18至20中任一项使用的所述组合物，用于在治疗或预防选自由以下组成的组的疾病中使用：跖骨痛、小便或大便失禁、外阴阴道萎缩、声带损伤、静脉瓣膜功能不全、面部脂肪萎缩、衰竭性瘢痕或形态不对称或变形。

包含交联聚合物的水凝胶组合物

[0001] 本发明涉及包含交联聚合物的无菌水凝胶组合物及其用途和用于制备其的方法，其中所述交联聚合物是巯基修饰的透明质酸的氧化产物。

背景技术

[0002] 透明质酸(Hyaluronan,缩写为HA,也称为hyaluronic acid)及其盐(例如透明质酸钠)是天然存在的阴离子非硫酸化的糖胺聚糖,其具有重复的由D-葡糖醛酸和N-乙酰基-D-葡萄糖胺构成的二糖。

[0003] 高分子量的透明质酸天然存在于皮肤中,并以其粘弹性和非常高的吸水性而著称。其性质在很大程度上促进了皮肤的弹性。鉴于其性质及其生物相容、耐受和无毒的特性,已经在医学和美容领域,特别是在美容手术的许多应用中利用该化合物的优点超过10年。例如,透明质酸被用于通过直接注射到所考虑区域的真皮中来填充皱纹(用作皮肤填充物)。

[0004] 生物发酵来源的高度纯化的未修饰的HA具有极好的生物相容性,并且与内源性透明质酸相同。然而,尽管具有与人体组织高度相容、与水具有高亲和力并且发挥强力保湿功能的优点,但是HA不具有足够的生物力学性质。当将HA注射到皮肤组织中时,其通过人体组织中存在的透明质酸酶(酶降解)和自由基(化学降解)在体内迅速降解。

[0005] 已经提出了许多解决方案来减慢HA在体内的降解并改变其化学、物理和生物学性质,另外提供制剂对储存过程中的降解、对热以及因此对灭菌的提高的抗性。

[0006] 这些方法通常涉及HA的化学修饰,包括例如通过化学、酶促或光化学方法使HA交联。这些交联透明质酸凝胶可以通过多种制备方法获得。通常,这些方法需要两个主要步骤,第一步由使透明质酸水合以使其转化为水溶液(水凝胶)组成,并且第二步旨在在能够诱导其交联的试剂(也称为“交联剂”)的存在下使所述水溶液的HA分子交联。交联剂的实例包括甲醛、二乙烯基砜、双碳二亚胺和环氧化物。

[0007] 为了生产皮肤填充物,交联剂最通常选自环氧化物如1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)或1,2,7,8-二环氧辛烷(DEO)、醛、或聚乙烯基砜如二乙烯基砜(DVS),因此本质上是合成的。

[0008] 遗憾的是,化学修饰会导致利用天然具有低免疫原性并且没有毒性的未修饰的HA时未观察到的副作用和异物反应。在大多数市售的HA软组织填充物中,BDDE被用作交联剂。由于BDDE中存在的环氧基的反应性质,皮肤填充物中残留的未反应BDDE可能具有遗传毒性作用。因此,必须将皮肤填充物中的BDDE保持在痕量(<百万分之2),因此在生产过程中需要昂贵的额外纯化和测试程序。尽管BDDE交联的填充物的安全性特性得到了长期临床经验的支持(De Boulle,Glogau等人,2013,A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid soft tissue fillers,Dermatol Surg(39):1758-1766),BDDE仍可能引起一些安全性担忧(Choi,Yoo等人,2015,Modulation of biomechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking agents,J Biomed Mater Res Part A(103A):3072-3080)。

[0009] 由于与BDDE相关的遗传毒性风险，可能对患者终生施用的皮肤填充物产品(例如Juvederm®)的年剂量被限制为每年20ml。市售皮肤填充物产品Restylane®的施用被限制为每次施用6ml的体积。类似的限制适用于包含DVS交联的透明质酸的皮肤填充物。

[0010] 化学修饰的另一个问题是透明质酸在交联反应中实现期望的交联度而须要经历的必要的严苛反应条件，例如碱性pH值和高温(高于50℃)。已知由于在暴露于酸性(pH低于4)或碱性pH(pH高于10)期间的水解降解，HA的分子量降低。此外，透明质酸在高于40℃的较高温度下降解(Troncoso等人，2016，A kinetic study of the degradation of Hyaluronic acid at high concentrations of sodium hydroxide，学生论文，通过http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:954372/FULLTEXT01.pdf在线访问；Stern等人，2007.The many ways to cleave hyaluronan，Biotechnology Advances(25):537-557；Tokita和Okamoto，1996，Degradation of hyaluronic acid-kinetic study and thermodynamics，Eur.Polym.J.(32):1011-1014)。还已知分子量小于约200kDa的低分子量透明质酸片段具有促炎作用(Naor，2016，Editorial:Interaction Between Hyaluronic Acid and Its Receptors(CD44，RHAMM)Regulates the Activity of Inflammation and Cancer，Frontiers in immunology 7:39；Monslow等人，2015，Hyaluronan-a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment，Frontiers in immunology 6:231)。

[0011] Shu等人最早描述了二硫化物交联的透明质酸水凝胶(Biomacromolecules 3，1304-1311，2002)。

[0012] 巯基修饰的透明质酸(HA-SH)的二硫化物交联衍生物可以通过自交联机制获得。交联透明质酸聚合物的网络在巯基之间形成二硫键(HA-S-S-HA)时建立。形成二硫键的巯基可以连接共同的HA骨架分子或相邻的HA分子的侧基，即交联可以分别是分子内或分子间的。由游离巯基形成二硫键是氧化反应，该氧化反应可以例如由于普遍存在的氧自发地发生或在添加氧化剂之后发生。

[0013] WO 2004/037164进一步研究了用3,3'-二硫代双(丙二酰肼)(DTP)或4,4'-二硫代双(丁二酰肼)(DTB)修饰的透明质酸。评价了通过二硫化物形成和使用巯基反应剂如聚乙二醇二(甲基)丙烯酸进行交联获得的凝胶在组织工程(即作为用于生长和培养用于植入的细胞的骨架)中的潜力。在WO 2005/056608中，采用相同的技术使巯基化酰肼修饰的羧甲基透明质酸交联以获得大分子细胞骨架。Serban等人描述了2-硫代乙基醚透明质酸衍生物的合成(Biomaterials 29，1388-1399；2008)，但是其不适合通过所研究的交联剂进行交联。EP2103631描述了其中通过酰肼偶联法引入巯基的巯基修饰的大分子，包括透明质酸，及其交联产物。交联产物用交联剂或通过二硫化物形成而获得。

[0014] Kafedjiiski等人也描述了巯基化透明质酸的合成及其在药物递送、伤口愈合和组织修复中的潜在用途(Int J Pharm 343，48-58；2007)。CN101367884A公开了包含游离巯基和二硫化物基团二者的HA-半胱胺缀合物的合成。EP 2614828描述了具有低修饰度的巯基修饰的生物相容性聚合物衍生物及其交联的材料。WO 2008/077172描述了用于组织增强的巯基化透明质酸。在一个实例中，WO 2008/077172描述了具有2g含巯基的透明质酸(巯基修饰的透明质酸)的无菌水凝胶制剂的皮内施用，其中由含巯基的透明质酸形成的储库可以在两周内在触觉上能够被检测到；然而，该文献未提及在该实施例中使用的巯基修饰的

透明质酸的具体特征。

[0015] 公知的是,具有高弹性(也称为刚度或稠度)的基于透明质酸的软组织填充物,其包含高度交联的透明质酸和/或大颗粒和/或由高分子量透明质酸制成和/或包含高浓度的交联透明质酸,倾向于在体内持续更长时间(长至6个月或更长时间)。具有高刚度(弹性)的软组织填充物已成功用于矫正面部区域如鼻唇沟,用于恢复面部体积和塑造面部轮廓,矫正较深的皱纹和褶皱,并且治疗例如面部脂肪萎缩、衰竭性瘢痕或形态不对称。这些软组织填充物被皮下、骨膜上注射或注射到真皮深层。注射具有高弹性的"刚性"水凝胶通常需要具有更大内腔的针,即,通过较低规格值(例如21G、23G或26G)表征的较粗针。

[0016] 通常还认可的是,如果基于透明质酸的软组织填充物具有以下特征中的一种或多种,则其在体内具有较短停留时间:

[0017] -低粘度和/或低弹性,

[0018] -没有或仅有中等程度的交联,

[0019] -没有或仅有小颗粒,

[0020] -低分子量透明质酸

[0021] -低浓度的交联透明质酸。

[0022] 同时,这些相对"光滑"的低粘度水凝胶可以通过细针注射,即具有高规格值(例如27G至32G)的针。在敏感皮肤区域(例如眶周区域、外阴阴道区域、口周区域和嘴唇)或在整个皮肤区域(例如手背)中治疗细纹、皱纹和浅表皮肤缺陷需要使用"光滑"的皮肤填充物产品,以避免在这些区域形成肿块或隆起。由于可能需要多次小体积注射以获得结果,因此水凝胶应易于通过细针(例如29G、30G或32G针)注射,以最大程度地减少患者的不适、出血和瘀伤(Lim,Adrian C.,Hyaluronic acid filler injections with a 31-gauge insulin syringe,Australasian Journal of Dermatology(2010)51,74-75)。

[0023] 由于效果持续时间短,目前用于改善细纹外观的可注射治疗方案需要多个治疗环节(treatment session)(例如,间隔3周的3个治疗环节或间隔4周的2个治疗环节,然后是每2个月的维持治疗)。已经证明难以开发既易于通过高规格针(即细针)注射又在体内具有延长持续时间的基于透明质酸的软组织填充物。

[0024] 本发明的发明人研究了自交联巯基修饰的透明质酸作为软组织填充物的潜力。然而,利用基于自交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶制剂进行的初始体内研究显示了植入物的小于2个月的短停留时间。当测试用于细纹处理的两个市售皮肤填充物产品时,得出了类似的发现。

[0025] 因此,本发明的目的是提供包含交联聚合物的组合物,其中该交联聚合物是巯基修饰的透明质酸的氧化产物,其具有改善的性能,尤其是在用作通过细针可注射的光滑软组织填充物时。

发明内容

[0026] 本发明提供包含交联聚合物的无菌水凝胶组合物,

[0027] 其中所述交联聚合物是巯基修饰的透明质酸的氧化产物,

[0028] 其中所述巯基修饰的透明质酸的巯基修饰度大于约80μmol/克聚合物、优选大于约105μmol/克聚合物、更优选大于约120μmol/克聚合物,

[0029] 其中所述巯基修饰的透明质酸的巯基修饰度小于约280μmol/克聚合物、优选小于约240/克聚合物、更优选小于200μmol/克聚合物，并且

[0030] 其中所述巯基修饰的透明质酸的平均分子量(MMW)为至少约400kDa、优选至少约500kDa、更优选至少约600kDa。

[0031] 根据本发明的无菌水凝胶组合物是基于具有巯基的修饰的透明质酸(HA-SH)的水凝胶，其中所述透明质酸通过修饰的透明质酸的巯基之间的二硫键交联(巯基修饰的透明质酸的氧化产物)。氧化产物是由未修饰的透明质酸的部分和修饰的透明质酸的部分组成的共聚物，修饰的透明质酸通过二硫键连接。水凝胶不含任何其它外部双官能交联剂，例如二乙烯基砜。水凝胶组合物的特征在于包含初始修饰度在约80μmol巯基/克聚合物至约280μmol巯基/克聚合物之间的巯基修饰的透明质酸的氧化产物。

[0032] 发明人发现，巯基对透明质酸的修饰度是影响无菌水凝胶的体内停留时间的重要特征。对于软组织填充物，期望植入的水凝胶在长的时间段内保留在植入部位，并且因此由于缓慢的降解而获得可持续的效果。包含交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶组合物充当软组织填充物，用于在仅单次治疗环节之后持续长的一段时间，例如持续至少约3个月，从而消除了进行多次重复治疗以维持效果的持续时间的需要。

[0033] 在下面的实施例8和9中举例说明了表征无菌水凝胶组合物的体内性能的研究。计算相对于起点以％表示的储库体积，以补偿施用体积中的潜在差异。在t＝0时(植入后即刻)的储库体积对应于100％。可以例如通过磁共振成像(MRI)扫描来监测储库容积。将理解的是，优选地在动物模型中确定的作为生物学参数的储库体积具有大的个体变异。因此，单个数据点的信息性较小，并且仅平均值(考虑多个施用部位和/或多个研究对象)才给出结论性数据。当然，性能将进一步取决于诸如植入部位的组织类型、用于测量储库体积的所用方法以及所研究的生物体的物种等因素。数据的定量可转移性(例如在人类中的应用)可能会受到限制。但是，在另一项小鼠体内研究中观察到了与大鼠中的数据相当的结果(数据未显示)。因此，体内表征提供了用于评估各个水凝胶组合物并对各个水凝胶组合物彼此之间进行比较的有价值的工具。停留时间可以用作描述一段时间期间可检测的储库的存在的参数，优选一段时间期间约50％(甚至更大)的平均相对储库体积的存在的参数。优选地，在单次施用后的最初3至4周期间，更优选长至3个月或更长时间，可检测到约50％(或更大)的相对储库体积。在示例的研究条件下，根据本发明的水凝胶组合物在注射后显示7周的停留时间(在第52天测量)。因此，根据本发明的水凝胶组合物显示出期望的体内性能，有望用作例如人中的软组织填充物。此外，交联聚合物的性质提供了良好的毒理学安全特性，并且与其它稳定化的透明质酸填充物相比可以施用更大的体积(每次施用量超过50mL)。

[0034] 影响水凝胶组合物的体内性能的最关键参数是“巯基修饰度”，其表示每克(g)巯基修饰的透明质酸的巯基的初始量(通常以μmol给出)，并且缩写为DoM。该巯基的量是巯基修饰的透明质酸原料的特征，并且指示在组合物的生产过程中可用于交联的巯基的量。巯基基团或部分也可以称为巯基(mercapto或mercapto group)。基于各种实例，发明人确定了修饰度的最佳范围为约80μmol/g聚合物至约280μmol/g聚合物。一方面，大于80μmol/g聚合物的修饰度对于生产具有植入后超过12周的丰盈效果(volumizing effect)的组合物是必要的。令人惊讶地，另一方面，使用具有更高修饰度的巯基修饰的透明质酸确实导致84天后较低的储库体积(例如，350μmol/g聚合物，如实施例9，ID10所示)。因此，巯基对巯基修饰

的透明质酸的初始修饰度被确定为关键因素，其与聚合物浓度和聚合物分子量相互作用以影响无菌水凝胶组合物的流变性和体内性质。只有用包含初始修饰度在80至280、优选100至240、更优选120至200μmol巯基/g聚合物的窄范围的交联巯基修饰的透明质酸的组合物才获得了植入到软组织中之后期望的停留时间。

[0035] 除了修饰度之外，显著影响水凝胶的流变学和体内性质的参数是交联巯基修饰的透明质酸的浓度以及透明质酸链的分子量分布。

[0036] 优选地，交联聚合物的平均还原灭菌后分子量(mean reduced post-sterilisation molecular weight)大于约200kDa，例如大于约250kDa，优选大于约300kDa，更优选大于约350kDa，其中平均还原灭菌后分子量定义为在将所述交联聚合物暴露于还原条件后，来自所述无菌水凝胶组合物的还原的巯基修饰的透明质酸的平均分子量。交联聚合物的“平均还原灭菌后分子量”被认为是影响植入后水凝胶的停留时间的另一个关键因素，并且在下文中将缩写为MRPMW。MRPMW被确定为其中将水凝胶组合物的交联聚合物暴露于还原条件的制备步骤之后交联巯基修饰的透明质酸(交联聚合物)的分子量。在水凝胶中，交联聚合物代表复杂的网络，其分子量可能无法确定。因此，在确定分子量之前需要还原交联聚合物，即裂解交联二硫键。MRPMW是与水凝胶组合物中交联聚合物的聚合物链的平均分子量有关的值。MRPMW定义为来自无菌水凝胶组合物的还原的巯基修饰的透明质酸的平均分子量(MMW)，即在灭菌后和还原后在组合物中确定或从组合物可获得的巯基修饰的透明质酸级分的MMW。通常，当与用于生产相应组合物的原料(即巯基修饰的透明质酸)的平均分子量(MMW)相比，确定的来自无菌水凝胶组合物的巯基修饰的透明质酸的MRPMW较低(参见表1)。与原料的MMW相比，MRPMW的降低被认为是水凝胶生产过程(包括灭菌)的结果。因此，与使用原料的MMW相比，使用交联聚合物的MRPMW更适合表征水凝胶组合物。

[0037] 然而，发明人发现，当使用平均分子量(MMW)为至少约400kDa、优选至少约500kDa、更优选至少约600kDa、例如约700kDa的巯基修饰的透明质酸时，对于水凝胶组合物的生产，水凝胶组合物中交联聚合物的MRPMW为约250kDa或更高。例如，实施例中概述的以约600kDa的巯基修饰的透明质酸开始的生产程序导致水凝胶组合物的交联聚合物的MRPMW在约350kDa或更高的最优选的区域。反之亦然，约200或250kDa或更高的MRPMW是相应的巯基修饰的透明质酸的MMW为至少约400kDa的证据，尽管定量关系取决于生产程序。

[0038] 在根据本发明的组合物中，交联聚合物的MRPMW优选为约250kDa或更高。包含MRPMW小于100kDa，例如90kDa的交联聚合物的示例性组合物没有显示出在足够长的时间段内的皮内停留时间，而包含MRPMW为约410kDa并且初始巯基修饰度在相同数量级的交联聚合物的示例性组合物在持续170天显示了大于50％的平均相对储库体积。根据发明人了解，现有技术没有关于MRPMW及其作用或巯基修饰的透明质酸的MMW在植入软组织后影响水凝胶的体内性能的报道。

[0039] MRPMW通过相当间接的测量表征水凝胶组合物中的交联聚合物，即非均匀网络。因此，结果通常显示±10％或者有时甚至更高的偏差是不足为奇的。实施例5指定了确定MRPMW的示例性方法。本领域技术人员将认识到，其它方法可以为该参数获得可比较值。例如，琼脂糖凝胶电泳可用于使用水平凝胶室和作为标准参照物的透明质酸分子量梯状物在琼脂糖凝胶中分离透明质酸的不同MW级分。然后对染色的凝胶进行光密度分析，然后进行

分子量计算。

[0040] 在另一个实施方案中，交联巯基修饰的透明质酸以至多14mg/mL、优选至多13mg/mL的浓度包含在组合物中，即相对于无菌水凝胶组合物的体积按重量计。浓度优选地是指交联巯基修饰的透明质酸的盐(例如钠盐)的浓度。因此，提供了等量的巯基修饰的透明质酸用于制备水凝胶。认为更高的浓度是不合适的，因为其产生了具有高弹性但是没有可接受的注射性的水凝胶组合物。3mg/mL或更低的浓度被认为是不合适的，因为对于这种水凝胶组合物观察到低的弹性模量G'。在约4mg/mL至约14mg/mL的范围内，例如在5、9或12mg/mL，观察到良好的流变性。

[0041] 本发明还提供了用于制备根据本发明的无菌水凝胶组合物的方法，包括以下步骤：

[0042] a)在水溶液中提供巯基修饰的透明质酸，

[0043] 其中所述巯基修饰的透明质酸的巯基修饰度大于约80μmol/克聚合物，优选大于约105μmol/克聚合物，更优选大于约120μmol/克聚合物，

[0044] 其中所述巯基修饰的透明质酸的巯基修饰度小于约280μmol/克聚合物，优选小于约240/克聚合物，更优选小于200μmol/克聚合物，并且

[0045] 其中所述巯基修饰的透明质酸的平均分子量为至少400kDa，优选至少500kDa，更优选至少600kD，

[0046] b)通过将先前获得的水溶液暴露于允许所述巯基修饰的透明质酸形成二硫化物交联的聚合物的条件来氧化所述巯基修饰的透明质酸，其中或由此所述水溶液变成水凝胶，

[0047] 任选地，c)向先前获得的水凝胶或先前获得的溶液中添加未修饰的聚合物，所述未修饰的聚合物选自生物相容性多糖的组，

[0048] 任选地，d)筛分先前获得的水凝胶以获得具有特定粒径分布的水凝胶，

[0049] e)将先前获得的水凝胶填充到容器中，优选注射器中，并且将填充的容器暴露于允许对水凝胶灭菌的条件，

[0050] f)获得容器中包含交联聚合物的无菌水凝胶组合物。

[0051] 在用于制备无菌水凝胶的方法中，步骤可以以不同的顺序进行。尤其是，交联(氧化)、添加未修饰的聚合物和筛分的步骤可以以不同的顺序进行，而不会必然影响水凝胶的质量。优选地，步骤以顺序a)、c)、b)、d)、e)和f)进行，其中溶液的制备(步骤a)和未修饰的聚合物的添加(步骤c)可以同时进行，并且任选地，同一时间可以添加另外的组分(例如局部麻醉剂)。

[0052] 在另一方面，本发明提供根据本发明的组合物用于作为药物使用，特别是用于在治疗和预防软组织疾病中使用。此外，本发明涉及根据本发明的组合物的美容用途。这样的用途(治疗或美容)可以涉及根据本发明的组合物作为软组织填充物或用于组织增强的用途。这样的用途优选包括例如通过注射或植入施用于人类，而适用性不限于人物种。

[0053] 在另一个方面，本发明涉及方法，其中该方法包括在特定的软组织部位引入根据本发明的组合物，优选通过从注射器注射。该方法涉及组合物作为软组织填充物或用于细纹处理以用于治疗和美容目的的用途。

[0054] 在一个实施方案中，根据这些方面的用途或方法包括，将水凝胶组合物从注射器

通过皮内、骨膜上或皮下注射到人类中来引入组织部位。

[0055] 此外，本发明提供用于注射的施用单元，包括注射器和至少一个皮下注射针，其中所述注射器填充有根据本发明的水凝胶组合物。

附图说明

[0056] 图1示出了透明质酸-半胱胺亚结构的示意图。

[0057] 图2示出了示例性的巯基修饰的透明质酸的示意图，即透明质酸-高半胱氨酸亚结构(A)、透明质酸-甘氨酰-半胱胺亚结构(B)和N-巯基-正丁基透明质酰胺亚结构(C)和HA-DGDTPDH亚结构(D)。

[0058] 发明详述

[0059] 根据本发明的无菌水凝胶的性质受到巯基修饰的透明质酸(尤其是其修饰度)的严重影响。用于确定修饰度的已建立方法包括Ellman方法或测量2,2'-二硫代二吡啶与含巯基的试剂反应时发色性硫酮的释放(参见实施例1)。本领域技术人员还将知晓产生相似值的替代方法。在本文中，修饰度以每克聚合物中巯基的μmol给出。替代地，修饰度可以表示为百分比，其中修饰的重复单元的量除以聚合物(D-葡糖醛酸和N-乙酰基-D-葡萄糖胺)中HA-重复单元的总量。通过考虑到HA重复单元的400g/mol的分子量，可以将以每克聚合物中巯基的μmol计的修饰度转化为百分比。在这种转化中，通常忽略了由修饰引起的分子量变化。因此，对于根据本发明的组合物中的巯基修饰的透明质酸指示的修饰度可以表示为3.2％至12.0％，优选4.0％至11.2％或4.8％至10％。

[0060] “巯基修饰的透明质酸”(HA-SH)是透明质酸(HA)的含巯基的衍生物。其以如上所述的修饰度为特征，并且通过已知的合成方法可以得到，该方法从以不同的分子量(或分子量范围)可以获得的透明质酸开始。在科学和专利文献中可以找到用带有巯基的配体进行HA修饰的许多实例:Griesser等人提供了巯基化透明质酸聚合物的综述(Griesser等人，Polymers 10(2018)243)。Aeschlimann(EP 1115433B1)描述了HA官能化的方法，其不损害HA的分子量，并且进一步提供了在体内具有良好耐受性且可生物降解的HA分子。该方法用于产生具有用于交联的不同末端官能团(例如巯基)的HA。使用活性酯中间体，通过含(受保护)巯基的伯胺或含二硫键的二氨基或二酰肼配体与葡糖醛酸部分的羧基的碳二亚胺介导的偶联将这些侧链引入HA。然后还原具有二硫键的中间产物，然后通过除去保护基团使具有受保护巯基的中间产物脱保护。Bulpitt等人(US 6,884,788)描述了另一种方法，包括HA羧基与含二硫键的碳二亚胺(例如2,2'-二硫代双(N-乙基-(N'-乙基碳二亚胺))直接反应，然后用还原剂还原二硫键。WO 2008/008857 A2公开了2-硫代乙基醚衍生的透明质酸的合成方法。EP 0587715公开了如何合成水不溶性阴离子多糖，其通过以下进行:将至少一种聚阴离子多糖(例如HA)溶解在水性混合物中;用活化剂(例如二酰亚胺，如EDC或ETC或BOP)活化聚阴离子多糖;用修饰化合物(例如1-羟基-苯并三唑水合物(HOBt)或1-羟基-苯并三唑一水合物)修饰活化的聚阴离子多糖;和使活化的聚阴离子多糖与合适的亲核试剂(例如氨基硫醇)反应以形成期望的不溶性组合物。发明人指出，聚阴离子多糖的BOP活化的一个主要优点是，在与亲核试剂偶联后聚阴离子多糖的分子量不会降低。EP 1790665 B1描述了水溶性修饰的透明质酸，其通过在非质子极性溶剂中使用BOP缩合剂通过酰胺键将取代基引入到透明质酸的葡糖醛酸的羧基中而制备。具有二硫键的二胺在列出的取代基中。Borke等

人描述了用DMT-MM进行的三嗪介导的酰胺化，用于用半胱胺对透明质酸进行有效和受控的官能化，其中与其它偶联剂(例如EDC介导的取代)相比，温和的反应条件和多糖链的最小程度降解被列为使用这组偶联剂的优点(Borke等人，Carbohydrate Polymers 116(2015)42-50)。Liang等人描述了在CDMT和NMM的存在下通过侧羧酸盐与胱胺的酰胺化反应然后与DTT的还原反应将巯基引入HA的方法(Liang等人Carbohydrate Polymers 132(2015)472-480)。Kafedjiiski等人(Int J Pharm 343,48-58;2007)描述了通过双催化体系碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺用1-半胱氨酸乙酯盐酸盐对HA进行的巯基修饰。在WO 2004/037164中，用3,3'-二硫代双(丙二酰肼)(DTP)或4,4'-二硫代双(丁二酰肼)(DTB)修饰透明质酸。用还原剂如DTT还原后，得到相应的巯基化HA衍生物HA-DTPH和HA-DTBH。EP 2103631也描述了通过酰肼偶联方法通过HA的羧基引入带有巯基的配体。合成了不同的巯基化HA聚合物(HA-DGDTPDH、HA-DPDTPDH、HA-DSCDH)。

[0061] 根据本发明，巯基修饰的透明质酸优选是与透明质酸连接的修饰剂的缀合物。

[0062] 优选地通过在透明质酸的葡糖醛酸部分的羧基与修饰剂之间形成酯键、酰胺键或酰肼键来引入修饰剂。在合成过程中，修饰剂可以包含二硫键形式的巯基或作为受保护巯基。

[0063] 在一个优选的实施方案中，修饰剂通过酰胺键与透明质酸中的葡糖醛酸部分的羧基连接。因此，修饰剂包含至少一个能够与透明质酸中的葡糖醛酸部分的羧基形成酰胺键的氨基，并且修饰剂包含巯基。例如，巯基修饰的透明质酸是透明质酸-半胱胺缀合物，其中半胱胺通过酰胺键与透明质酸连接(见图1)。

[0064] 类似地，其它带有巯基的修饰剂可以用于通过在修饰剂的氨基(伯氨基或仲氨基，优选伯氨基)与透明质酸中的葡糖醛酸部分的羧基之间的酰胺键形成来合成巯基修饰的透明质酸。

[0065] 利用其独特的巯基保护作为硫代内酯，通过高半胱氨酸硫代内酯对透明质酸钠的酰胺化合成透明质酸-高半胱氨酸缀合物(图2A)。随后在还原剂的存在下通过碱水解成功地释放了游离的巯基，以避免由二硫化物形成引起的不希望的胶凝。

[0066] 其它修饰剂包括例如半胱胺、半胱氨酸或高半胱氨酸的衍生物，其中半胱胺、半胱氨酸或高半胱氨酸的N-末端与氨基酸的羧基偶联。这些衍生物优选地通过半胱胺、半胱氨酸或高半胱氨酸酰胺对N-保护的氨基酸的酰胺化来合成，其使用常规肽偶联剂，优选能够容易地进行产物纯化的那些，例如通过在反应发生后进行水提取来除去反应物和副产物(见实施例14A-带有巯基的修饰剂的合成)。替代地，使半胱胺、半胱氨酸或高半胱氨酸与N-保护的氨基酸的相应的活性酯在有机溶剂(例如琥珀酰亚胺酯)中反应。透明质酸-甘氨酰-半胱胺缀合物(图2B)是通过这种方法合成的巯基修饰的透明质酸的实例。

[0067] 优选低分子量的修饰剂，以尽可能保留透明质酸的独特物理化学性质。为了获得可用于根据本发明组合物的可交联巯基修饰的透明质酸，合适的低分子量修饰剂优选地进一步选自包含以下的组：谷胱甘肽、半胱氨酸、包含线性或支化C_2-C_6烷基链的氨基烷基硫醇、高半胱氨酸、高半胱氨酸的羧酸酯(例如高半胱氨酸的C_2-C_6烷基酯，优选高半胱氨酸乙酯)和半胱氨酸的羧酸酯(例如半胱氨酸的C_2-C_6烷基酯，优选半胱氨酸乙酯)。

[0068] 氨基烷基硫醇接头可通过相应的对称二胺方便地引入，该对称二胺包含作为一种类型的固有保护基团的二硫键，其是在用透明质酸进行酰胺合成后开发的。继而可以从N保

护的氨基醇开始获得二硫化物:在例如按照Mitsunobu方案引入硫酯部分之后,在氧化条件下对硫酯进行皂化得到期望的目标化合物(例如实施例14C)。N-巯基正丁基透明质酸酰胺(图2C)是通过这种方法合成的巯基修饰的透明质酸的一个实例(实施例15)。

[0069] 在另一个优选的实施方案中,修饰剂通过酰肼键与透明质酸中的葡糖醛酸部分的羧基连接。因此,修饰剂包含至少一个能够与透明质酸中的葡糖醛酸部分的羧基形成酰胺键的酰肼基,并且修饰剂包含巯基。例如,巯基修饰的透明质酸是透明质酸-3-巯基-丙酸酰肼缀合物(HA-DTPH)或透明质酸-2-巯基-乙基-羰基-氨基-乙酸酰肼缀合物(HA-DGDTPDH;参见实施例14B、图2D)。

[0070] 二硫键的形成(交联)在氧(例如通过周围空气供应或溶解在水溶液中)的存在下在生理pH值下自然发生。添加另外的氧化剂可有利于加速二硫化物的形成。合适的并且建立良好的氧化剂是例如过氧化氢(或其它过氧化物)、抗坏血酸、二甲基亚砜和次氯酸(次氯酸钠)。在超压条件下,可以使用纯氧气或高氧气混合物来增加氧的浓度,然后将其用作聚合物水溶液中的氧化剂。

[0071] 巯基修饰的透明质酸的交联(即二硫键的形成)应主要在水凝胶被进一步加工(即经历进一步的加工步骤,例如筛分、均质化、填充到注射器中和灭菌)之前完成,以产生具有可再现和稳定特性(例如流变性质)的水凝胶。然而,一小部分巯基可能由于诸如空间位阻等因素而不能用于二硫键形成。交联聚合物中未交联巯基的分数可以通过以μmol/g聚合物表示的残留巯基含量来确定。高交联度(通过巯基的氧化)被认为有利于获得具有适合用于软组织填充物的弹性的水凝胶。

[0072] 因此,在一个优选的实施方案中,相对于巯基修饰的透明质酸的修饰度,根据本发明的水凝胶组合物的残留巯基含量小于20%,优选小于15%。这对应于在水凝胶生产过程中巯基修饰的透明质酸中超过80%、优选超过85%的巯基被氧化。

[0073] 本文所用的术语“无菌的”应根据本领域理解为指示符合如针对美容或药物产品所定义的微生物标准如美国药典(USP)、欧洲药典(Ph.Eur.)或其它国家标准的组合物。典型地,透明质酸凝胶在填充到注射器中之后灭菌。用高压灭菌器进行湿热灭菌是标准方法之一,其包括使HA凝胶经受121℃的高压饱和蒸汽持续约15至20分钟。较短时间段(例如,约1分钟至5分钟)和较高温度(例如,约130℃至135℃)的高压灭菌可能会更好地保留凝胶中HA分子的分子量(参见M.L.Bernuzzi,A.Giori,“An innovative way to thermally sterilize hyaluronic acid pre-filled syringes”,2016白皮书,可在以下获得:https://www.fedegari.com/wp-content/uploads/2019/03/WP-Fedegari-Thermal-sterilization-PFS-with-Hyaluronic-Acidv-2.pdf,US 2016/0220729)。其它高压灭菌参数(例如确保产品快速冷却)的优化对于保留聚合物的分子量可能也是有利的(http://www.steriflow.com/en/news/Sterilization-hyaluronic-acid)。

[0074] 本文所用的术语“水凝胶”应理解为描述兼具固体和流体(液体)特性的组合物。一方面,水凝胶可以是可注射的,即其表现出流体样行为。另一方面,水凝胶可以足够坚硬(或刚性)以保持某种形式,例如水凝胶可以以预成型的植入物、线或细丝的形式提供。因此,单独的术语水凝胶不以定量方式限制组合物的流变性质。

[0075] 然而,在一个实施方案中,水凝胶的使用1Hz剪切速率的流变仪在约25℃测量的弹性模量G’为至少50Pa(50,000mPa)。水凝胶的弹性模量G’受以下因素直接影响

[0076] -交联度(由临界修饰度定义,即根据本发明的特性),

[0077] -交联聚合物的浓度,和

[0078] -MRPMW(取决于巯基修饰的透明质酸的平均分子量)。

[0079] 具有至少1,000Pa的弹性模量G'的水凝胶显示出丰盈效果和长期停留时间。另一方面,对于作为光滑填充物的应用,较低的弹性模量G'可能是优选的。实施例表明利用具有约90Pa或400Pa的G'的水凝胶组合物ID5和ID6也获得了长的停留时间。因此,根据本发明的水凝胶的弹性模量G'可以为至少80Pa或至少350Pa,或甚至至少600Pa。并且,在一些实施方案中,水凝胶的弹性模量G'为至多1,600Pa,优选至多1,000Pa,更优选至多900Pa。

[0080] 在优选实施方案中,根据本发明的可注射水凝胶组合物的挤出力优选小于30N,如使用标准的1mL玻璃注射器用30G针以12mm/min的挤出速率测量的。

[0081] 在另外的优选实施方案中,所述组合物还包含选自生物相容性多糖的组的未修饰的聚合物。优选地,未修饰的多糖是未修饰的透明质酸(HA)。未修饰(未交联)的或也称为游离透明质酸可以补充水凝胶组合物。通常将未修饰的HA作为润滑剂添加到软组织填充物中,以通过降低通过针或套管注射产品所需的挤压力来确保易于注射。优选地,用于生产组合物的游离透明质酸原料的分子量的范围为约500kDa至约3,500kDa。然而,由于不稳定的透明质酸的快速降解,本领域技术人员将理解,组合物作为软组织填充物的体内性能在很大程度上受交联聚合物和背后的巯基修饰的透明质酸的性质驱动。组合物的总聚合物含量中未修饰的多糖的分数优选小于2/3。优选地,未修饰的多糖的以等于或低于交联聚合物的浓度被包含。示例性地,未修饰的透明质酸以3mg/mL至9mg/mL,例如5或7mg/mL的浓度被包含在组合物中,其中该浓度优选是指盐(透明质酸钠)的浓度。

[0082] 水凝胶组合物可包含局部麻醉剂和/或选自以下多种其它组分的一种或多种组分,例如生长因子、维生素、多元醇、碱金属卤化物、矿物质、抗氧化剂、氨基酸、辅酶、陶瓷颗粒(例如羟基磷灰石钙颗粒)、聚合物颗粒、聚合物(例如聚乙二醇、糖胺聚糖、润滑素(lubricin)、多糖及其衍生物)、蛋白质(例如弹性蛋白、胶原蛋白、角蛋白、丝素蛋白(silk fibroin))、抗脂肪剂(anti-cellulite agent)、抗瘢痕形成剂、抗炎剂、抗刺激剂、血管收缩剂、抗出血剂(例如止血剂和抗纤维蛋白溶解剂)、张力剂、抗痤疮剂、色素沉着剂、抗色素沉着剂、消炎剂、抗风湿剂、抗病毒剂、抗感染剂、防腐剂、化学治疗剂、细胞抑制剂、抗过敏剂、抗静脉曲张剂、镇痛剂、抗生素、抗真菌剂、解痉剂、抗组胺剂、治疗痔疮的药剂、治疗皮肤的药剂和保湿剂。

[0083] 考虑到其减轻注射时的疼痛的能力,向水凝胶组合物中添加局部麻醉剂是特别期望的。优选地,麻醉剂是利多卡因,例如酸加成盐的形式,例如盐酸利多卡因。

[0084] 在用于生产水凝胶的方法中,可以在不同的生产步骤期间添加局部麻醉剂和/或一种或多种组分,即,在一个实施方案中,在任选的步骤c)期间添加局部麻醉剂和/或一种或多种组分,或者在另一个实施方案中,独立于添加未修饰的聚合物,例如在步骤a)期间将其添加到溶液中或步骤c)或d)中获得的水凝胶中。在一个优选的实施方案中,在步骤a)期间或步骤c)期间添加麻醉剂,例如盐酸利多卡因。在一个实施方案中,其中步骤c)在步骤b)之前,即其中在交联之前添加未修饰的透明质酸,则优选地在交联步骤之前还包含局部麻醉剂和/或一种或多种其它组分。

[0085] 此外,将理解的是,水凝胶组合物的主要组分是水。优选地,使用注射用水或纯净

水生产组合物。此外，将认识到，可以缓冲组合物以具有在6.7至7.8范围内的生理可接受的pH。合适的缓冲剂是本领域技术人员已知的，并且包括例如磷酸盐缓冲剂。该组合物还具有生理学上可接受的渗量(osmolality)，这与待治疗的受试者(例如人)中细胞外液的正常渗量类似。因此，该组合物可以具有在250-350mOsm/kg范围内的渗量，并且可以包括其它溶质以调节渗量，例如氯化钠、氯化钙和/或氯化钾。

[0086] 将包含生物材料(例如稳定的透明质酸)的软组织填充物递送至其中期望借助可注射的水凝胶组合物来增强的组织部位。涉及软组织填充的用途或方法的目的包括增强软(皮肤)组织，矫正先天性异常、获得性缺陷或美容缺陷。

[0087] 水凝胶组合物的主要作用是纯粹物理的，因为其具有基于植入物的原始体积和膨胀的填充作用。因此，在没有任何生理或药理学相互作用的情况下，该用途可以被分类为美容，并且该组合物可以被认为是美容或医疗装置。其中可以将根据本发明的水凝胶组合物的用途视为美容的应用包括，例如，减少年龄的痕迹，例如：

[0088] -应用于外阴和阴道组织，以用于非手术的女性生殖器恢复目的

[0089] -应用于真皮、皮下或骨膜上的应用。

[0090] 示例性地，水凝胶组合物可用于美容目的(方法)，例如用于填充皱纹、治疗皮肤缺陷、恢复面部或身体(例如乳房、耳垂)的损失体积、减小蜂窝织炎中的凹陷、治疗泪槽畸形、塑造面部或身体轮廓(例如臀部增大、臀部增强、小腿增强)、用于阴茎增大(阴茎周长增大、龟头增大)。

[0091] 在另一些情况下，软组织的填充和增强可导致疾病的治疗或预防，即，其中疾病症状的减少、减轻和/或预防(再)发生。由软组织缺损引起的疾病可受益于所施用的水凝胶对周围组织的暂时和/或局部结构填充、阻尼(damping)、支撑或增强。其中水凝胶组合物可用于治疗或预防的疾病包括例如

[0092] -跖骨痛，即跖骨球的脂肪垫的疼痛疾病，对于该用途，可以将根据本发明的水凝胶施用于跖骨球软组织的脂肪垫，

[0093] -小便或大便失禁，对于该适应症，可以将根据本发明的水凝胶施用于限定括约肌的组织，

[0094] -外阴阴道萎缩(也是更年期生殖泌尿综合症)，对于该适应症，可以通过注射到阴道粘膜和前庭而将根据本发明的水凝胶施用于外阴阴道区域，和/或用于大阴唇增强，其中重建大阴唇将确保两个大阴唇之间紧密接触，以保护外阴的内部结构

[0095] -声带受损，

[0096] -静脉瓣膜功能不全，或

[0097] -面部脂肪萎缩、衰竭性瘢痕或形态不对称或变形(先天性或由于创伤或手术(例如胸部或面部)所致)，对于该适应症，可以施用水凝胶以用于重建目的。

[0098] 对于包括填充有根据本发明的水凝胶组合物的注射器的施用单元，优选的是，该单元包括使用说明书，例如描述美容或医学应用。皮下注射针优选具有测量为至少27G、优选27G至32G的规格(G)的内腔。在一个实施方案中，施用单元包括至少两个皮下注射针，两个皮下注射针的内腔彼此不同。后者允许提供试剂盒，其中使用者(例如医务人员)可以根据预期的应用在不同的针之间进行选择。在该实施方案中，优选地，使用说明书描述了不同针对于不同美容或医学应用(例如，不同注射部位)的适用性。

实施例

[0099] 实施例1-修饰度的确定

[0100] 对用作制备水凝胶组合物的原料的巯基修饰的透明质酸(HA-SH)中的巯基的定量是基于使用2,2'-二硫代二吡啶(DTDP)的湿化学方法。与聚合物骨架共价键合的游离巯基部分与DTDP进行巯基-二硫化物交换反应,而释放出一当量的发色硫酮。在缓冲的酸性介质(pH＝4)中,可以在343nm处以光度法测量所得硫酮的吸光度。

[0101] 精确称量约420mg的巯基修饰的透明质酸,并在连续磁力搅拌下持续2-3小时以溶解在于30g的0.01N HCl中,以制备储备溶液。然后,精确称取约310mg的储备溶液,并在eppendorf管中与4200mg pH 4的乙酸盐缓冲液混合,以制备样品溶液。从每个储备溶液制备三个样品溶液。精确称量25.0mg N-乙酰半胱氨酸并溶解在25.0mL的乙酸盐缓冲液(pH4)中。然后将该溶液用乙酸盐缓冲液(pH 4)进一步稀释以制备校准曲线。乙酸盐缓冲液用作空白值。将500μL含0.125mg/mL DTDP的乙酸盐缓冲液(pH 4)溶液添加到500μL的每个样品溶液中(校准曲线、样品溶液和空白值)。将溶液短暂地均质化并在室温下孵育30分钟。最后,将每个样品(校准曲线、样品溶液和空白值)转移到微比色皿中,并在分光光度计中于342nm处相对于空白值进行测量。

[0102] 实施例2-残留巯基含量的确定

[0103] 为了确定水凝胶组合物中的交联聚合物的残留巯基含量(即交联和生产组合物后的HA-SH聚合物),使用如上所述的类似方法。

[0104] 精确称量约50mg的每个样品水凝胶,并与1.3mL含0.125mg/mL DTDP的乙酸盐缓冲液(pH 4)溶液混合。精确称量25.0mg N-乙酰半胱氨酸并溶解在200.0mL乙酸盐缓冲液(pH 4)中。然后将该溶液用乙酸盐缓冲液(pH 4)进一步稀释以制备校准曲线。乙酸盐缓冲液用作空白值。将500μL含0.125mg/mL DTDP的乙酸盐缓冲液(pH 4)溶液加到校准曲线和空白的各500μL样品中。将所有样品在室温连续搅拌下孵育120分钟。将所有样品离心后,分别用500μL乙酸盐缓冲液进一步稀释500μL每个上清液,并在分光光度计中于342nm处相对于空白值进行测量。

[0105] 实施例3-制备水凝胶组合物的方法

[0106] 方法A

[0107] 溶解:将巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因同时溶解在水溶液中。

[0108] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0109] 筛分:任选地,将包含交联巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0110] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0111] 方法B

[0112] 溶解:将巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因同时溶解在酸性水溶液中。

[0113] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧化剂和氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0114] 筛分:任选地,将包含交联巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0115] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0116] 方法C

[0117] 溶解:将巯基修饰的透明质酸溶解在水溶液中;制备在磷酸盐缓冲液(pH 6.8-7.6)中包含未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的单独溶液。

[0118] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0119] 筛分:将包含交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0120] 均质化:将包含交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶和包含未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的溶液均质化,并且任选地压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0121] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0122] 方法D

[0123] 溶解:将巯基修饰的透明质酸溶解在水溶液中;制备在磷酸盐缓冲液(pH 6.8-7.6)中包含未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的单独溶液。

[0124] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧化剂和氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0125] 筛分:将包含交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0126] 均质化:将包含交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶和包含未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的溶液均质化,并且任选地压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0127] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0128] 方法E

[0129] 溶解:将巯基修饰的透明质酸和盐酸利多卡因溶解在水溶液中;制备在磷酸盐缓冲液(pH 6.8-7.6)中包含未修饰的透明质酸的单独溶液。

[0130] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0131] 筛分:将包含交联巯基修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0132] 均质化:将包含交联巯基修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶和包含未修饰的透明质酸的溶液均质化,并且任选地压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0133] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0134] 方法F

[0135] 溶解:将巯基修饰的透明质酸和盐酸利多卡因溶解在酸性水溶液中;制备在磷酸盐缓冲液(pH 6.8-7.6)中包含未修饰的透明质酸的单独溶液。

[0136] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧化剂和氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0137] 筛分:将包含交联巯基修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶压过具有限定筛

孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0138] 均质化:将包含交联巯基修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶和包含未修饰的透明质酸的溶液均质化,并且任选地压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0139] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0140] 方法G

[0141] 溶解:将巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因相继溶解在水溶液中。

[0142] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0143] 筛分:任选地,将包含交联巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0144] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0145] 方法H

[0146] 溶解:将巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因相继溶解在酸性水溶液中。

[0147] 交联:将pH调节至约6.8至7.6后,通过氧化剂和氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0148] 筛分:任选地,将包含交联巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0149] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0150] 方法I

[0151] 溶解溶液1:将巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因同时溶解在水中。

[0152] 交联溶液1:将pH值调节至约6.8至7.6后,通过氧化剂和氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0153] 溶解溶液2:将巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和任选的盐酸利多卡因同时溶解在水中。

[0154] 交联:将溶液2的pH值调节至约6.8至7.6,然后立即将等份的交联溶液1和溶液2混合。通过氧化剂和氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0155] 筛分:任选地,将包含交联巯基修饰的透明质酸、未修饰的透明质酸和盐酸利多卡因的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0156] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0157] 方法J

[0158] 溶解:将巯基修饰的透明质酸和未修饰的透明质酸溶解在水溶液中;制备包含盐酸利多卡因的单独溶液。

[0159] 交联:将pH调节至约6.7至7.8后,通过氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0160] 筛分:将包含交联巯基修饰的透明质酸和未修饰的透明质酸的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0161] 均质化:将包含交联巯基修饰的透明质酸和未修饰的透明质酸的水凝胶和包含盐酸利多卡因的溶液均质化,并且任选地压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0162] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0163] 方法K

[0164] 溶解:将巯基修饰的透明质酸和未修饰的透明质酸溶解在水溶液中;制备包含盐酸利多卡因的单独溶液。

[0165] 交联:将pH调节至约6.7至7.8后,通过氧化剂和氧将巯基氧化为二硫桥而使巯基修饰的透明质酸交联。

[0166] 筛分:将包含交联巯基修饰的透明质酸和未修饰的透明质酸的水凝胶压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0167] 均质化:将包含交联巯基修饰的透明质酸和未修饰的透明质酸的水凝胶和包含盐酸利多卡因的溶液均质化,并且任选地压过具有限定筛孔尺寸的滤板(一次或多次)。

[0168] 灭菌:将水凝胶填充到注射器中后进行高压灭菌。

[0169] 实施例4-弹性模量G'的确定

[0170] 使用具有锥板系统的Anton Paar MCR 102流变仪进行所有组合物的振荡流变学测量。经27G针(或在指出没有针的情况下)通过注射将组合物转移至流变仪。在频率测试期间,在25℃的温度和1Hz的频率下利用水凝胶的线性粘弹性区内的恒定变形获得弹性模量。

[0171] 实施例5-分子量的确定

[0172] 使用Viscotek TDAmax温度受控的多检测器SEC系统进行测量,该系统包括串联的高灵敏度检测器——光电二极管阵列UV、光散射(RALS和LALS二者)、折射率和粘度计。折射率检测器记录样品的浓度,得到各自的分布曲线。结合光散射检测器,确定分子量(MW)。对于尺寸排阻色谱(SEC)分析,将样品用PBS稀释,得到的最终聚合物浓度为0.1mg/mL。

[0173] 在此测试期间发生的错误或波动通常会导致约10%的偏差。

[0174] 通过将约200mg的所研究的无菌水凝胶组合物分散在1.8mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并在室温下孵育2小时来制备用于确定样品的平均还原灭菌后分子量(MRPMW)。通过离心将交联巯基修饰的透明质酸与游离透明质酸分离。将残留物重新分散在PBS中。反复提取/离心步骤后,将残留的凝胶用还原剂(TCEP.HCl(三(2-羧乙基)膦盐酸盐))处理3小时以裂解二硫桥,然后用5N HCl酸化所得溶液(还原)。将还原的巯基修饰的透明质酸用乙醇沉淀,并通过离心回收(来自无菌水凝胶组合物的巯基修饰的透明质酸)。将沉淀物溶解在4mL的水溶液中,该水溶液包含浓度为2mg/ml的用于游离巯基部分的封端剂(2-(2-氨基乙基二硫烷基)吡啶-3-羧酸)。室温下孵育3小时之后,用PBS进一步稀释样品。

[0175] 替代地,通过减法确定交联聚合物的MRPMW。两种方法得到了类似的值。在对包含交联聚合物和游离透明质酸的水凝胶组合物进行灭菌之后,将还原剂添加至水凝胶中以定量地破坏二硫键。然后同时确定其还原形式的巯基修饰的透明质酸和游离透明质酸的MW分布(M_W(总))。另外,确定游离透明质酸的MW:将200mg所研究的无菌水凝胶组合物分散在1.8mL的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,并在室温下孵育2小时。离心后,将上清液用于游离透明质酸的WM(M_W(HA))的SEC分析。

[0176] 通过确定游离透明质酸的分子量(M_W(HA))以及游离透明质酸和还原的巯基修饰的透明质酸的总分子量(M_W(总)),可以根据等式(I)计算MRPMW(此处为M_W(HA-SH)),其中C_{HA}

和C_{HA-SH}分别代表游离透明质酸和还原的巯基修饰的透明质酸的分数：

[0177] $$M_W(\text{HA-SH}) = \frac{M_W(\text{总}) - M_W(\text{HA})\frac{C_{HA}}{C_{HA}+C_{HA-SH}}}{\frac{C_{HA-SH}}{C_{HA}+C_{HA-SH}}} \qquad (I)$$

[0178] 表1中给出了用于水凝胶生产的HA-SH原料的相应平均分子量(MMW)的比较结果。通常,MRPMW低于MMW。水凝胶组合物的产生影响分子量分布。

[0179] 实施例6-挤出力的测量

[0180] 将30G针连接至包含水凝胶组合物的1mL注射器。用Mecmesin力测试系统和12mm/min的挤出速率测量挤出力。至少一式三份进行测量。表1中列出了每个被测试的水凝胶组合物和其它水凝胶组合物的计算的平均挤出力(EF)。

[0181] 实施例7-无菌水凝胶组合物

[0182] 表1中列出了多种组合物及其特性,其中各组合物之间的主要区别在于作为HA-半胱胺的氧化产物的交联聚合物的浓度和特性。以类似的方法(比较上述方法A、B和I)制备包含交联HA-半胱胺、未修饰的透明质酸钠和3mg/mL盐酸利多卡因的无菌水凝胶组合物。

[0183] 用MMW为150kDa且修饰度为118μmol/g的透明质酸-半胱胺聚合物制备水凝胶组合物ID 1至ID 4。水凝胶组合物ID 1至ID 3包含3mg/mL未修饰的透明质酸钠并且分别包含6mg/mL(ID 1)、9mg/mL(ID 2)和13mg/mL(ID3)的交联透明质酸-半胱胺。水凝胶组合物ID 4包含4mg/mL未修饰的透明质酸钠和13mg/mL交联透明质酸-半胱胺。

[0184] 用MMW为730kDa且修饰度为151μmol/g的透明质酸-半胱胺聚合物制备水凝胶组合物ID 5和ID 6。水凝胶ID 5和ID 6包含3mg/mL未修饰的透明质酸钠(MMW 2.41MDa)并且分别包含5mg/mL(ID 5)和9mg/mL(ID 6)的交联透明质酸-半胱胺钠盐。

[0185] 用MMW为780KDa且修饰度为149μmol/g的透明质酸-半胱胺聚合物制备水凝胶组合物ID 7和ID 8。水凝胶组合物ID 7包含3mg/ml未修饰的透明质酸钠(MMW 1.94MDa)和7mg/ml交联透明质酸-半胱胺钠盐。水凝胶组合物ID 8包含3mg/ml的未修饰的透明质酸钠(MMW 1.94MDa)和13mg/ml交联透明质酸-半胱胺钠盐。

[0186] 如上所述确定巯基修饰的透明质酸的MMW及其修饰度(DoM)、无菌水凝胶组合物的弹性模量G'和挤出力(EF)、无菌水凝胶组合物中交联聚合物的MRPMW和残留巯基含量。

[0187] 所有无菌水凝胶组合物的pH在6.7至7.8的范围内,并且渗量在250至350mOsm/kg的范围内。

[0188] 表1:包含具有不同分子量性质的交联聚合物的无菌水凝胶组合物的特性

[0189]

水凝胶组合物ID	HA-SH聚合物MMW	弹性模量G'	EF	MRPMW	DoM	残留巯基含量	制备方法

[0190]

	kDa	mPa	N	kDa	μmol/g	μmol/g	
1*	150	33,987	6	84	118	0	B
2*	150	140,218	11	81	118	0	B
3*	150	475,046	25	n.d.	118	n.d.	B
4*	150	258,226	15	n.d.	118	n.d.	I
5	730	88,290	5	681	151	0	A
6	730	390,540	10	414	151	0	A
7	780	183,557[a]	5	n.d.	149	1	B
8	780	817,850[a]	n.d.	n.d.	149	2	B

[0191] 星号(*)表示未落入权利要求的范围但是被纳入以用于比较的那些实例。缩写n.d.表示“未确定”。[a]为了确定弹性模量G’,将水凝胶组合物直接从注射器(无针附接)施加至流变仪。

[0192] 通过测量交联聚合物的残留巯基含量并与巯基修饰的透明质酸的初始修饰度进行比较来监测二硫键的形成。已发现相对于巯基修饰的透明质酸的修饰度,根据本发明的所有水凝胶组合物的残留巯基含量小于15%。

[0193] 交联聚合物的浓度和MRPMW二者都影响水凝胶的弹性性质。与包含相同浓度但具有小于100kDa的低MRPMW的交联聚合物的组合物(例如水凝胶组合物ID 2)相比,包含MRPMW大于约400kDa的交联聚合物的组合物(例如水凝胶组合物ID 6)具有提高的弹性性质。无论交联聚合物的MRPMW如何,与包含浓度为5或6mg/mL的交联聚合物的组合物相比,包含浓度范围在9至13mg/mL的交联聚合物的组合物具有提高的弹性性质。水凝胶组合物ID 3*和ID 8的弹性模量的比较表明,用于交联的巯基修饰的透明质酸的MMW对无菌组合物的弹性性质具有积极影响。水凝胶组合物ID 3*的巯基修饰的透明质酸的MMW为150kDa,而水凝胶组合物ID 8的巯基修饰的透明质酸的MMW为780kDa。除此之外,两个水凝胶组合物均包含13mg/ml交联的透明质酸-半胱胺、3mg/ml未修饰的透明质酸钠和3mg/ml盐酸利多卡因,并且两个水凝胶组合物通过相同的制备方法制备。

[0194] 实施例8-植入的水凝胶组合物的体内表征

[0195] 利用磁共振成像(MRI)研究了根据本发明的多个组合物以及对比组合物在通过注射皮内植入之后平均储库体积随时间的发展。

[0196] 测试了八个不同的无菌水凝胶组合物(水凝胶特性参见表1)和两个用于细纹处理的市售皮肤填充物Belotero® soft(COMP1)和Profhilo® (COMP2)。COMP1包含在磷酸盐缓冲液中的20mg/mL BDDE交联的透明质酸和3mg/mL盐酸利多卡因。COMP2包含在磷酸盐缓冲液中的16mg/mL高MW透明质酸和16mg/mL低MW透明质酸。

[0197] 将组合物皮内注射到雌性Sprague Dawley大鼠的背部皮肤中。注射体积为约50μL。每只大鼠施用最多8个储库,每个组合物ID 5、ID 6、ID 7和ID 8总共施用12次,每个组合物ID 1、ID 2和COMP1施用14次,每个组合物ID 3和ID 4施用5次,并且每个COMP2施用8次。在长至170天的总时间段的不同时间点,通过MRI(Siemens Espree 1.5T MRT装置)监测皮内水凝胶储库的体积。根据MRI扫描计算各个储库体积(mm^3),并随时间进行监测。将计算的体积相对于第0天(施用后立即)获得的结果进行归一化,并以百分比(%)表示。表2中列出了不同组合物在不同时间点的平均相对储库体积。每个时间点允许在一定天数范围内。对

于每个水凝胶组合物,在同一天确定所有储库体积。

[0198] 表2:平均相对储库体积(%)随时间的发展

[0199]

	平均相对储库体积 (%)								
水凝胶组合物 ID	第 7 天	第 14 天	第 21-24 天	第 28-30 天	第 53-56 天	第 81-84 天	第 107-112 天	第 133-140 天	第 168-170 天
1*	14.1	0.0	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2*	27.3	6.9	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3*	n.d.	n.d.	n.d.	15.9	4.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4*	n.d.	n.d.	n.d.	10.1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	n.d.	n.d.	67.6	n.d.	54.9	49.2	48.3	41.5	39.5
6	n.d.	n.d.	108.1	n.d.	85.7	85.7	75.8	75.3	75.9
7	n.d.	n.d.	n.d.	93.2	93.1	77.4	75.0	67.8	63.6
8	n.d.	n.d.	n.d.	136.7	114.1	103.7	98.0	94.5	85.2
COMP1*	5.2	0.0	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
COMP2*	n.d.	n.d.	0.0	n.d.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0200] 星号(*)表示未落入权利要求的范围但是被纳入以用于比较的那些实例。缩写n.d.表示“未确定”。

[0201] 对比水凝胶组合物在施用后不到2个月内迅速降解。在一些情况下,水凝胶储库在植入之后2周(COMP1和组合物ID 1)和约3周(COMP2和组合物ID 2)是无法检测到的。通过使初始MMW在730至780kDa范围内的巯基修饰的透明质酸交联制备的水凝胶组合物ID 5、ID 6、ID 7和ID 8显示了超过1个月且长至5个月的长停留时间。水凝胶组合物ID 5和ID 6的交联巯基修饰的透明质酸的MRPMW大于400kDa。水凝胶组合物ID 3*和ID 8的停留时间的比较表明,用于交联的巯基修饰的透明质酸的MMW对无菌组合物的停留时间具有积极影响。水凝胶组合物ID 3*的巯基修饰的透明质酸的MMW为150kDa,并且水凝胶组合物ID 3*的储库在植入之后3个月是无法检测到的。组合物ID 8的巯基修饰的透明质酸的MMW为780kDa,并且在整个研究期间水凝胶组合物ID 8的储库是可以被检测到的。两个水凝胶的组合物在其它方面相当;它们包含13mg/ml交联的透明质酸-半胱胺、3mg/ml未修饰的透明质酸钠和3mg/ml盐酸利多卡因,并且两个组合物通过相同在的制备方法制备。

[0202] 实施例9-修饰度和交联巯基修饰的透明质酸的MRPMW不同的被植入水凝胶组合物的体内表征

[0203] 表3中列出了包含交联巯基修饰的透明质酸的多个无菌水凝胶组合物。各组合物之间的主要区别在于巯基修饰的透明质酸的特性,即修饰度和交联聚合物的MRPMW。用类似方法(比较上述方法B和方法H)制备水凝胶。所有无菌水凝胶组合物均包含浓度为17mg/mL的交联的透明质酸-半胱胺、5mg/mL未修饰的透明质酸钠(游离HA)和3mg/mL盐酸利多卡因。如上所述确定水凝胶组合物中交联聚合物的MRPMW和残留巯基含量,以及巯基修饰的透明质酸原料的MMW和修饰度(DoM)。

[0204] 表3:包含具有不同修饰度的交联聚合物的无菌水凝胶组合物的特征

[0205]

水凝胶组合物ID	HA-SH 聚合物 MMW	弹性模量 G'	MRPMW	DoM	残留巯基含量
	kDa	mPa	kDa	μmol/g	μmol/g
9	628 ± 8	1,384,803	480 ± 10	119	0.88
10*	1201 ± 15	714,068	610 ± 16	43	0.32
11	1335 ± 18	1,543,920	710 ± 70	130	1.06
12*	957 ± 13	2,408,693	560 ± 19	350	4.4

[0206] 星号(*)表示未落入权利要求的范围但是被纳入以用于比较的那些实例。缩写n.d.表示“未确定”。

[0207] 使用25G针通过皮内注射将各组合物植入雌性Sprague Dawley大鼠的背部皮肤中。注射体积为约50μL。每只大鼠施用最多8个储库,每个测试组合物施用12次。在施用当天(第0天)然后以定期的时间间隔通过磁共振成像(MRI)监测水凝胶储库的降解动力学。根据每个时间点的MRI扫描计算各个储库体积(mm^3)。将计算的体积相对于在第0天获得的结果(对应于100%)进行归一化。表4中列出了不同水凝胶组合物在第84天的平均相对储库体积。

[0208] 表4:在第84天测得的平均相对储库体积,以百分比表示。

[0209]

水凝胶组合物 ID	DoM [μmol/g]	MRPMW [kDa]	第 84 天的平均相对储库体积[%]
9	119	480	151.5
10*	43	610	5.0
11	130	710	184.7
12*	350	560	37.2

[0210] 在第84天,只有包含DoM在中等范围(119-130μmol/g)的交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶组合物ID 9和ID 11的平均相对储库体积大于100%。考虑到这些水凝胶组合物更高的聚合物浓度,这些发现对应于实施例7和实施例8中对水凝胶组合物ID 5和ID 6测量的停留时间。

[0211] 在第84天,其中用于交联的巯基修饰的透明质酸的DoM为43μmol/g的水凝胶组合物ID 10*明显降解。快速降解归因于低DoM(因此低交联度),因为MRPMW介于水凝胶组合物ID 9和ID 11的值之间。令人惊讶的是,包含具有350μmol/g的高DoM(并且因此高交联度)的交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶组合物ID 12*的储库也在施用之后12周内降解了超过60%。包含浓度为5mg/mL的交联巯基修饰的透明质酸的水凝胶组合物ID 5在施用之后80天的相对储库方面优于该水凝胶组合物(参见实施例8)。

[0212] 实施例10-无菌水凝胶组合物的配制和表征

[0213] 根据方法B制备包含11mg/mL交联的HA-半胱胺、3mg/mL盐酸利多卡因和9mg/mL未修饰的透明质酸钠的无菌水凝胶组合物。简单地说,将1650mg HA-半胱胺(干重,MMW700kDa,修饰度132μmol/g聚合物)、450mg盐酸利多卡因(干重)和1350mg透明质酸钠(干重,MW 2238kDa)溶解在130g 10mM磷酸盐缓冲液pH 7.1(包含88mM NaCl)中,在室温下机械

搅拌持续约17小时。用1M氢氧化钠溶液将pH调节至约pH 7.1后，添加10mM磷酸盐缓冲液pH 7.1(包含88mM NaCl)至最终量为150g组合物。将该溶液均质化持续约60分钟。然后，添加1.2mL的0.307％(v/v)的过氧化氢溶液。在室温下孵育过夜后，将交联凝胶填充到1mL玻璃注射器中，并通过高压灭菌法进行灭菌。无菌水凝胶组合物的pH为6.97，并且渗量为266mOsm/kg。

[0214] 如上所述确定修饰度(DoM)、MMW、MRPMW、挤出力和弹性模量G'，并且总结在表5中。

[0215] 表5:无菌水凝胶组合物的特征

[0216]

水凝胶组合物ID	HA-SH 聚合物 MMW	弹性模量 G'	MRPMW	DoM	EF
	kDa	mPa	kDa	μmol/g	N
13	700	712,733	534	131	23.4

[0217] 实施例11-无菌水凝胶组合物的配制和表征

[0218] 根据方法B制备包含11mg/mL交联的透明质酸-半胱胺、3mg/mL盐酸利多卡因和5mg/mL未修饰的透明质酸钠的无菌水凝胶组合物。简单地说，将1650mg HA-半胱胺(干重，MMW 700kDa，修饰度132μmol/g聚合物)、450mg盐酸利多卡因(干重)和750mg透明质酸钠(干重，MW 2238kDa)溶解在130g 10mM磷酸盐缓冲液pH 7.1(包含88mM NaCl)中，在室温下机械搅拌持续约17小时。用1M氢氧化钠溶液将pH调节至约pH 7.1后，添加10mM磷酸盐缓冲液pH 7.1(包含88mM NaCl)至最终量为150g组合物。将该溶液均质化持续约60分钟。然后，添加1.2mL的0.307％(v/v)的过氧化氢溶液。在室温下孵育过夜后，将交联凝胶填充到1mL玻璃注射器中，并通过高压灭菌法进行灭菌。无菌水凝胶组合物的pH为6.94，并且渗量为252mOsm/kg。

[0219] 如上所述确定修饰度(DoM)、MMW、MRPMW、挤出力和弹性模量G'，并且总结在表6中。

[0220] 表6:无菌水凝胶组合物的特征

[0221]

水凝胶组合物ID	HA-SH 聚合物 MMW	弹性模量 G'	MRPMW	DoM	EF
	kDa	mPa	kDa	μmol/g	N
14	700	707,257	464	131	17.5

[0222] 实施例12-无菌水凝胶组合物的配制和表征

[0223] 根据方法B制备包含7mg/ml交联的透明质酸-半胱胺钠盐(MMW 790kDa，修饰度140μmol/g)、3mg/ml盐酸利多卡因和3mg/ml透明质酸钠(MMW 2.44MDa)、105mM NaCl和10mM磷酸盐缓冲液的无菌水凝胶组合物(ID 15)。简单地说，制备包含HA-半胱胺钠盐、透明质酸钠、盐酸利多卡因和氯化钠的水溶液。通过添加包含过氧化氢的磷酸盐缓冲液来引发交联。在室温下孵育2天后，测得的残留巯基含量小于初始修饰度的10％，这表明在水凝胶生产过程中，巯基修饰的透明质酸中超过90％的巯基被氧化。筛分后，将水凝胶填充到注射器中并在121℃下灭菌15分钟。

[0224] 无菌水凝胶组合物的pH为7.08，并且渗量为293mOsm/kg。如上所述确定弹性模量G'和挤出力。为了确定弹性模量G'，将水凝胶组合物直接从注射器(无针附接)施加至流变

仪。弹性模量为147,877mPa。挤出力为6N。

[0225] 实施例13-无菌水凝胶组合物的配制和表征

[0226] 根据方法B制备包含13mg/mL交联的透明质酸-半胱胺钠盐(MMW 720kDa,修饰度148μmol/g)、3mg/mL盐酸利多卡因和3mg/mL透明质酸钠(MMW 1.94MDa)、100mM NaCl和10mM磷酸盐缓冲液的无菌水凝胶组合物(ID 16)。简单地说,通过将各组分溶解在0.01M HCl中来制备160g包含HA-半胱胺钠盐、透明质酸钠、盐酸利多卡因和氯化钠的水溶液。通过添加20g的100mM磷酸盐缓冲液(pH 11.9)将pH值调节至7.3,然后添加用20g注射用水中的19,6μL 30%(v/v)过氧化氢溶液制备的20g溶液来引发交联。在室温下孵育22小时后,测得的残留巯基含量为3μmol/g,对应于低于初始修饰度的5%,并且并表明巯基修饰的透明质酸的超过95%的巯基在水凝胶生产过程中被氧化。通过350μm滤板筛分后,将水凝胶填充到1ml玻璃注射器中,并通过高压灭菌法进行灭菌。

[0227] 无菌水凝胶组合物的pH为7.3,并且渗量为287mOsm/kg。如上所述确定无菌水凝胶组合物的弹性模量G'和挤出力。为了确定弹性模量G',将水凝胶直接从注射器(无针附接)施加至流变仪。弹性模量为701,583mPa。挤出力为16.4N。

[0228] 实施例14-带有巯基的修饰剂的合成

[0229] A.双(甘氨酰)-胱胺二盐酸盐的制备:

[0230] 向胱胺二盐酸盐(1g,4.44mmol)和N-(叔丁氧基羰基)甘氨酸(1.59g,9.10mmol)在无水二氯甲烷:THF=1:1(20mL)中的混合物中首先添加三乙胺(1270μL,9.16mmol),然后添加EDC*HCl(1.75g,9.10mmol)的二氯甲烷溶液。将反应溶液在环境温度下搅拌5小时,然后在减压下蒸发挥发物。将残余物收集到乙酸乙酯(250mL)中,并用1N HCl(2x 50mL)、半饱$NaHCO_3$(50mL)和水(50mL)洗涤。有机层经Na_2SO_4干燥,在减压下蒸发挥发物,得到作为无色油状物的N-Boc保护的双(甘氨酰基)-胱胺。产量:1.575g(88%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ6.97(s,1H,NH),5.53(s,1H,NH),3.81(d,J=5.8Hz,2H,α-CH_2),3.58(aq,J=6.3Hz,2H,-CH_2-NH-),2.82(t,2H,-CH_2-S-),1.45(s,9H,-CH_3 t-Bu);m/z=467.1$[M+H]^+$,489.1$[M+Na]^+$。

[0231] 向N-Boc保护的双(甘氨酰)-胱胺(300mg,0.64mmol)的MeOH(5mL)溶液中添加乙酰氯(300μL,4.20mmol)。放热反应停止后,将混合物在密封烧瓶中于环境温度下搅拌5小时,然后添加甲苯(2mL)并将蒸发挥发物,直至产物沉淀出来。将白色固体通过抽滤分离,并用正戊烷(2x 5mL)洗涤。产量:146mg(67%)。m.p.=184℃(分解);^1H NMR(400MHz,D_2O)δ3.81(s,2H,α-CH_2),3.59(at,J=6.3Hz,2H,-CH_2-NH),2.88(at,2H,-CH_2-S-);m/z=266.9$[M+H]^+$,288.9$[M+Na]^+$。

[0232] 这种修饰剂允许制备透明质酸-甘氨酰-半胱胺缀合物(图2B)。

[0233] B.二硫代二乙烷二基二羰基二氨基二乙酸二酰肼(DGDTPDH)的制备:

[0234] 向3,3'-二硫代二丙酸(2g,9.5mmol)和甘氨酸乙酯盐酸盐(2.66g,19.0mmol)在无水二氯甲烷:THF=1:1(20mL)中的混合物中添加三乙胺(2,78μL,20.0mmol),然后添加EDC*HCl(3.83g,20.0mmol)的二氯甲烷溶液。将反应在环境温度下搅拌5小时,然后用乙酸乙酯(400mL)稀释。将有机层用1N HCl(2x 50mL)、半饱和$NaHCO_3$(50mL)和水(50mL)洗涤,然后经Na_2SO_4干燥,并在减压下蒸发挥发物,得到作为白色固体的二硫代二乙烷二基二羰基二氨基二乙酸二乙酯。产量:1.69g(47%);m.p.=121℃;^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ6.50(s,1H,NH),4.21(q,J=7.1Hz,2H,-O-CH_2-),4.04(d,J=5.3Hz,2H,α-CH_2-N),2.99(t,J=7.0Hz,2H,-

CH_2-S-),2.67(t,2H,α-CH_2-CH_2-),1.28(t,3H,-CH_3);m/z＝381.0[M+H]$^+$,403.0[M+Na]$^+$。

[0235] 将二乙酯(500mg,1.32mmol)和80％水性水合肼(0.5mL,12.7mmol)在96％EtOH中的混合物回流5小时。冷却至室温后,产物结晶,并通过抽滤收集,并用冷EtOH(2x 15mL)充分洗涤。产量:335mg(72％),白色针状物。m.p.＝197℃(分解)^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δ9.02(s,1H,-NH),8.20(t,J＝5.7Hz,1H,-NH),4.19(s,2H,-NH_2),3.64(d,J＝5.8Hz,2H,α-CH_2-N),2.87(t,J＝7.2Hz,2H,-CH_2-S-),2.53(t,2H,α-CH_2-CH_2-);m/z＝353.1[M+H]$^+$,375.1[M+Na]$^+$。

[0236] 这种修饰剂允许制备透明质酸-2-巯基-乙基-羰基-氨基-乙酸酰肼缀合物(图2D)。

[0237] C.4,4'-二硫代双[1-丁胺]二盐酸盐的制备

[0238] 根据文献报道的方案(Aufort,M.等人,ChemBioChem,12(4),583-592,2011),由4-氨基丁-1-醇制备4,4'-二硫代双[1-丁胺]二盐酸盐,最后采用N-Boc脱保护并且用MeOH/HCl进行,以得到作为二盐酸盐形式的产物:向二氨基甲酸酯(550mg,1.35mmol)的甲醇(6mL)溶液中滴加乙酰氯(0.6mL,8.4mmol)。当放热反应停止时,将混合物回流5小时。然后添加甲苯(6mL),并将混合物在减压下浓缩。将粗产物与甲苯(6mL)反复共沸,然后通过抽滤分离并用正戊烷(2x 6mL)洗涤。产量:340mg(90％),白色固体。m.p.＝249℃(分解);^{1}H NMR(400MHz,D2O+DSS)δ3.02(t,J＝7.1Hz,4H,CH_2-N),2.78(t,J＝6.7Hz,4H,-CH_2-S-),1.83-1.71(m,8H,C-CH_2-CH_2-C);m/z＝209.0[M+H]$^+$。

[0239] 这种修饰剂允许制备N-巯基-正丁基透明质酸酰胺(图2C)。

[0240] 实施例15-无菌水凝胶组合物交联的N-巯基-正丁基透明质酸酰胺的配制和表征

[0241] 根据方法B在不添加盐酸利多卡因的情况下制备包含9mg/mL交联的N-巯基-正丁基透明质酸酰胺和3mg/mL未修饰的透明质酸钠的无菌水凝胶组合物。简单地说,将450mg N-巯基-正丁基透明质酸酰胺(干重,MMW 767kDa,修饰度98μmol/g聚合物,图2C)和150mg透明质酸钠(干重,MMW 2.4MDa)溶解在44g 0.01M HCl(包含NaCl)中,在室温下机械搅拌持续约5小时。向41.48g该溶液中添加4.609mL的含有0.015％H_2O_2的100mM磷酸盐缓冲液pH 11.81,这使得pH调节至约pH 7.4。将混合物在环境温度下均质化15分钟,然后放置过夜以完成交联。将交联凝胶填充到1mL玻璃注射器中,并通过高压灭菌法进行灭菌。无菌水凝胶的pH为约7.2,并且渗量为305mOsm/kg。

[0242] 如上所述确定水凝胶组合物的修饰度(DoM)、MMW、残留巯基含量、挤出力和弹性模量G'。为了确定弹性模量G',将无菌水凝胶直接从注射器(无针附接)施加至流变仪。平均残留巯基含量为1μmol/g,并且弹性模量G'为252,569mPa。平均挤出力为11.9N。

[0243] 实施例16-包含交联的透明质酸-甘氨酰-半胱胺的水凝胶组合物的配制和表征

[0244] 根据方法B在不添加盐酸利多卡因的情况下制备包含17.9mg/mL交联的透明质酸-甘氨酰-半胱胺钠盐(HA-GLYC)和5mg/mL的未修饰的透明质酸钠的水凝胶组合物。简单地说,将537mg HA-GLYC(干重,MMW 610kDa,修饰度162μmol/g聚合物,图2B)和150mg透明质酸钠(干重,MMW 2.4MDa)溶解在26g 0.01M HCl(包含NaCl)中,在室温下机械搅拌持续约5小时。向19.02g该溶液中添加2.115mL的100mM磷酸盐缓冲液pH 11.85,这使得pH调节至约pH 7.4。然后添加273μL的0.3％H_2O_2溶液,将混合物在环境温度下均质化15分钟,然后放置过夜以进行交联。将交联水凝胶填充到1mL玻璃注射器中,并通过高压灭菌法进行灭菌。无菌水

凝胶的pH为约7.2。

[0245] 如上所述确定残留巯基含量和弹性模量G'。为确定弹性模量G'，将水凝胶直接从注射器(无针附接)施加至流变仪。弹性模量G'为1,260,467mPa。平均残留巯基含量为0μmol/g。

[0246] 实施例17-包含交联的透明质酸-高半胱氨酸的水凝胶组合物的配制和表征

[0247] 根据方法A在不添加盐酸利多卡因的情况下制备包含17.9mg/mL交联的透明质酸-高半胱氨酸钠盐(HA-HCYS)和5mg/mL的未修饰的透明质酸钠的水凝胶组合物。简单地说，将537mg HA-HCYS(干重，MMW 610kDa，修饰度136μmol/g聚合物，图2A)和150mg透明质酸钠(干重，MMW 2.4MDa)溶解在26g 0.01M HCl(包含NaCl)中，在室温下机械搅拌持续约5小时，然后静置1小时以除去气泡。向23.68g该溶液中添加2.63ml 100mM磷酸盐缓冲液pH 12.04，这使得溶液的pH调节至约pH 7.2。将混合物在室温下放置48小时以进行交联，然后将交联水凝胶填充到1mL玻璃注射器中，并通过高压灭菌法进行灭菌。无菌水凝胶的pH为约7.0。

[0248] 如上所述确定残留巯基含量和弹性模量G'。为确定弹性模量G'，将水凝胶直接从注射器(无针附接)施加至流变仪。弹性模量G'为1,759,900mPa。平均残留巯基含量为0μmol/g。

[0249] 实施例18-包含交联的透明质酸-2-巯基-乙基-羰基-氨基-乙酸酰肼的水凝胶组合物的配制和表征

[0250] 根据方法B在不添加盐酸利多卡因的情况下制备包含17.9mg/mL交联的透明质酸-2-巯基-乙基-羰基-氨基-乙酸酰肼钠盐(HA-DGDTPDH)和5mg/mL的未修饰的透明质酸钠的水凝胶。简单地说，将537mg HA-DGDTPDH(干重，MMW 770kDa，修饰度134μmol/g聚合物，图2D)和150mg透明质酸钠(干重，MMW 2.4MDa)溶解在26g 0.01M HCl(包含192mg NaCl)中，在室温下机械搅拌持续约5小时。向20.20g该溶液中添加含有0.041％H_2O_2的2.25mL的100mM磷酸盐缓冲液pH 12.07，这使得溶液的pH调节至约pH 7.0。然后将混合物在室温下放置18小时以进行交联。将交联水凝胶填充到1mL玻璃注射器中，并通过高压灭菌法进行灭菌。无菌水凝胶的pH为约7.0并且渗量为326mOsm/kg。

[0251] 如上所述确定残留巯基含量和弹性模量G'。为确定弹性模量G'，将水凝胶直接从注射器(无针附接)施加至流变仪。弹性模量G'为698,860mPa。平均残留巯基含量为0μmol/g。

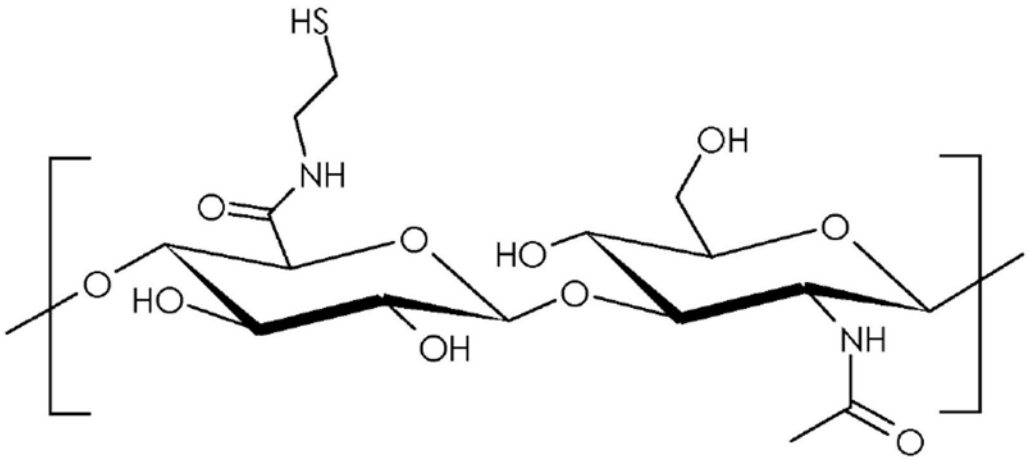

HS
NH
O
O
HO
O
OH
O
HO
OH
O
NH
O

图1

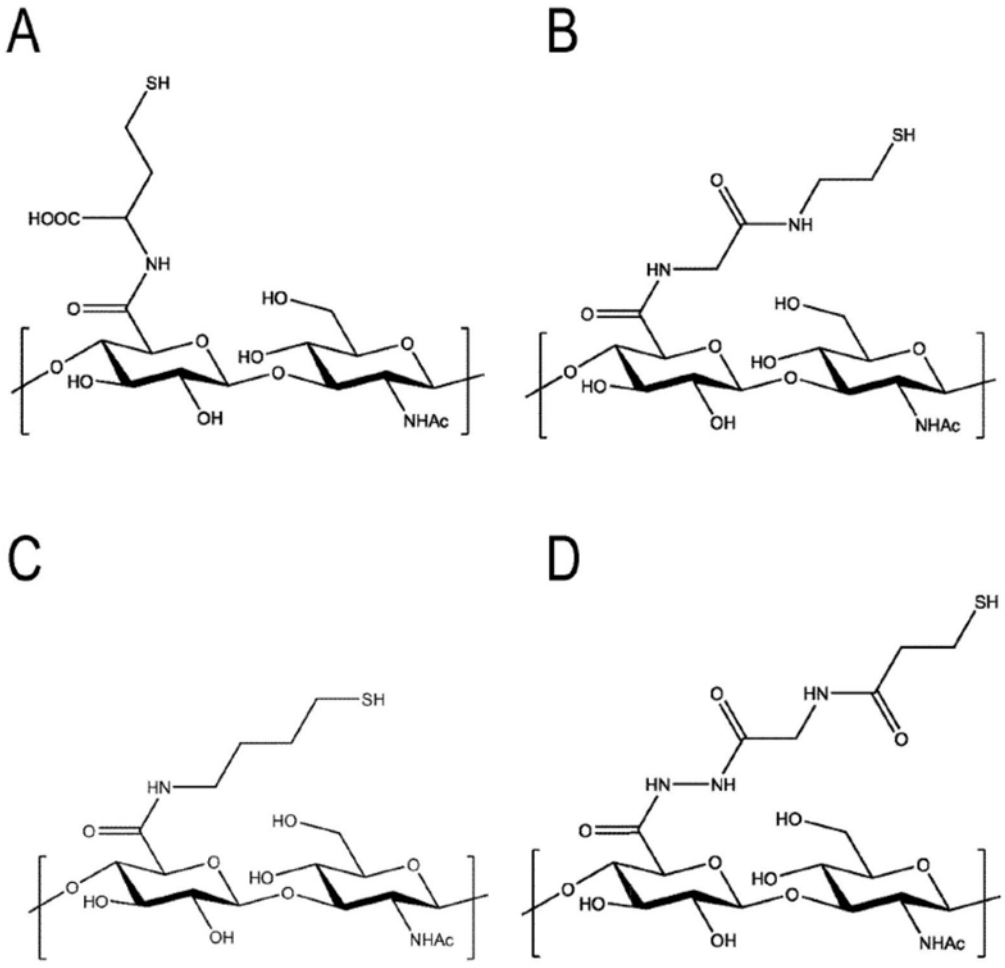

A
SH
HOOC
NH
O
HO
O
HO
O
HO
O
OH
NHAc
B
SH
O
NH
HN
O
HO
O
HO
O
HO
O
OH
NHAc
C
SH
HN
O
HO
O
HO
O
HO
O
OH
NHAc
D
SH
HN
O
O
HN
NH
O
HO
O
HO
O
HO
O
OH
NHAc

图2