



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101611063 B

(45) 授权公告日 2013. 02. 20

(21) 申请号 200780043889. X

A61L 27/20(2006. 01)

(22) 申请日 2007. 10. 25

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

US 6630457 B1, 2003. 10. 07, 全文.

0609866 2006. 11. 10 FR

US 2003096879 A1, 2003. 03. 22, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

WO 2006021644 A1, 2006. 03. 02, 说明书第 1

2009. 05. 26

页第 1 段, 第 5 页第 8-10 段, 第 6 页第 4 段-第

(86) PCT申请的申请数据

7 页第 3 段, 第 11 页第 3 段, 第 17 页倒数第 2

PCT/FR2007/052245 2007. 10. 25

段-18 页第 1 段, 第 8 页第 2 段, 第 21 页第 1-3

(87) PCT申请的公布数据

审查员 丛丽晓

W02008/056069 FR 2008. 05. 15

(73) 专利权人 施泰福实验室股份有限公司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 杰罗姆·阿西俄斯

尼古拉斯·里维耶

本内迪克特·阿西俄斯

(74) 专利代理机构 北京君尚知识产权代理事务

所(普通合伙) 11200

代理人 余功勋

(51) Int. Cl.

C08B 37/08(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

交联透明质酸及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及可通过含有下列步骤的方法生产的交联透明质酸:(a) 活化透明质酸;(b) 在 pH 8 和 12 之间的反应介质中使所述活化的透明质酸和含有寡肽或多肽的交联剂反应;(c) 将所述反应介质的 pH 值调至 5 和 7 之间;和 (d) 在有机溶剂中沉淀所述交联的透明质酸。本发明也涉及上述方法, 涉及由所述交联的透明质酸获得的水凝胶, 并涉及所述交联的透明质酸用于生产主要可用于整形手术的植入物的用途。

1. 生产交联透明质酸的方法, 含有下列步骤:
 - a. 使用耦合剂和辅助耦合剂活化透明质酸, 以获得活化的透明质酸,
 - b. 在 pH 调至 8 到 12 的范围内的反应介质中, 使所述活化的透明质酸和含有至少 50 重量%的寡肽或多肽的交联剂反应, 以获得交联的透明质酸,
 - c. 将反应介质 pH 调节至 5 到 7 的范围内的值,
 - d. 在有机溶剂中沉淀所述交联透明质酸以获得交联透明质酸纤维, 和
 - e. 选择性地, 干燥由此获得的交联透明质酸纤维。
2. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述耦合剂选自: 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC)、1- 乙基 -3-(3- 三甲氨基丙基) 碳二亚胺 (ETC)、和 1- 环己基 -3-(2- 吗啉乙基) 碳二亚胺 (CMC) 以及它们的盐和混合物。
3. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述辅助耦合剂选自: N- 羟基琥珀酸亚胺 (NHS)、N- 羟基苯并三唑 (HOBt)、3,4- 二氢 -3- 羟基 -4- 氧 -1,2,3- 苯并三唑 (HOObt)、1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑 (HAt) 和 N- 羟基磺基琥珀酸亚胺 (磺基 -NHS)、和它们的混合物。
4. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述耦合剂和所述透明质酸的羧酸单元的摩尔比在 5% 和 100% 之间, 包括极值。
5. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述辅助耦合剂和所述耦合剂的摩尔比在 1 : 1 和 3 : 1 之间, 包括极值。
6. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 用所述耦合剂活化透明质酸的反应在 3 到 6 的范围内的 pH 进行。
7. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述多肽是赖氨酸均聚物或共聚物。
8. 根据权利要求 7 的方法, 其特征在于, 所述赖氨酸均聚物是二赖氨酸。
9. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述耦合剂以相对于所述交联剂的胺官能的化学当量使用。
10. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述耦合剂以相对于所述透明质酸的羧酸官能的化学当量使用。
11. 根据权利要求 10 的方法, 其特征在于, 在第二步中使用的交联剂按交联剂的摩尔数相对于羧酸官能的摩尔数的量小于 30%。
12. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述交联反应在 8 到 10 的范围内的 pH 进行。
13. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 沉淀 pH 在 5 到 7 的范围内。
14. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 所述有机溶剂是乙醇或异丙醇。

交联透明质酸及其制备方法

[0001] 本发明涉及新的交联的透明质酸及其制备方法与用途,特别是美容用途。

[0002] 透明质酸是由葡萄糖醛酸单元和 N-乙酰-D-葡萄糖胺单元组成的多糖,其用于修复外科或眼外科或者美学领域作为填充褶皱的产品特别为人所知。特别是在后者的应用中,透明质酸因其生物适应性及其物理化学性质比其他填充产品更为优选。然而,它具有快速降解的缺点,因此需要反复注入。为了弥补这个缺点,已提出多种交联透明质酸的方法,旨在使它更少受降解因素(比如酶和/或细菌侵袭、温度和自由基)的影响,从而改进它对活体内(in vivo)降解的抗性,并由此改进其作用的持久性。这些方法尤其包括天然透明质酸的羟基和/或酸官能的醚化、酯化、或酰胺化。

[0003] 然而,现有技术用于交联透明质酸的方法(特别是通过酰胺化的交联方法)具有下列缺陷:制得的透明质酸衍生物难以在含水介质中形成及注射,和/或不足以抵抗降解因素,特别是在产品杀菌后。

[0004] 这对于根据专利申请 US 2001/0393369 通过透明质酸和活化剂(比如 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC))和亲核物(可以是聚赖氨酸)在酸性介质中反应而制备的不溶于水的透明质酸是正确的。

[0005] 事实上,在 pH 小于或等于 7 时,一般认为,预期的酰胺化反应和分子内酯化反应竞争,所述分子内酯化反应造成活化的透明质酸酯上的透明质酸载有的一级醇自交联。这样的副反应尤其通过反应混合物的粘度(固化)和浑浊度的显著增大而反映出来,因此,所述反应混合物处于水和不溶聚合物的非均相混合物的形式。那么要配制所获得的透明质酸便会变得不可能了。

[0006] 此外,专利申请 EP-1535952 公开了由交联透明质酸组成的涂层,所述交联透明质酸在 EDC 和 NHS 的存在下,在 2 到 9 的 pH 范围内,优选为 4 到 7.5 的 pH 范围内,通过使聚赖氨酸和透明质酸反应而原位(in situ)形成。具有这样的涂层的物品可特别作为用于美学外科的义肢(prosthesis)。该文件未公开在有机溶剂中沉淀的交联的透明质酸以可获得干燥形态并由此可临时形成水凝胶。

[0007] 此外,专利 US-6,630,457 描述了通过使被碳二亚胺(比如 EDC)和 N-羟基磺基琥珀酸亚胺衍生物(比如 NHS)活化的透明质酸在 7.0 到 8.5 的 pH 范围内反应而制备的改性透明质酸。所获得的化合物可在生理条件下和例如戊二醛交联,以获得水凝胶,所述水凝胶保持对糖苷酶敏感并基本上在 50 小时内彻底降解。这个降解动力学和作为细胞的载体(vector)和生长因素的考虑一致,但不适合用作例如美学外科中的填充材料。

[0008] 最后,专利申请 WO 2006/021644 描述了通过用耦合剂(比如 EDC)和催化剂(比如 NHS)活化透明质酸,然后在 4 到 10(如 4 到 6)的 pH 范围内和多肽(比如二赖氨酸(dilysine))反应,以制备交联透明质酸的方法。在反应结尾,可选择性地增大 pH 至 6 到 7 的范围内的值,以增大在沉淀阶段期间的提取产率。因此,交联在随后选择性地被中和的酸性介质中进行,或在没有后续 pH 改变的碱性介质中进行。

[0009] 申请人发现,在反应阶段期间使用酸性 pH 对酰胺化反应并非总是好的,并可能引起副反应,如上面所指出的,特别是分子内酯化反应,该反应能影响获得的产品的物理化学

性质。

[0010] 因此,需要提出这样的交联透明质酸:可以干燥形式获得,然后容易地在含水介质中再形成,以形成具有合适的物理化学性质的水凝胶,特别通过弹性模数 G 和小于 30 的损耗角 Δ 反映,所述水凝胶本身可进行热处理,特别是杀菌处理,以用于制造植入物,所述水凝胶本身相对于多种降解因素(比如酶和/或细菌侵袭、温度和自由基)充分稳定,以免在小于 4 个月内被完全活体再吸收。

[0011] 现在,申请人完全偶然地发现,和多肽交联的透明质酸在有机溶剂中的沉淀 pH 决定其流变性和对降解因素(比如温度、自由基和酶比如透明质酶)的敏感性。经许多实验后,申请人随后确定了用于获得对热降解相对不敏感的,即在沉淀的化合物再增溶和杀菌后保持其流变性的,交联的透明质酸的最佳沉淀条件。由此,所述交联透明质酸一旦再形成后,仿佛保持其在沉淀时的分子构造的“记忆”。此外,经证实这个分子排列也影响聚合物被再增溶的能力。

[0012] 不必局限于该理论,认为上述方法不仅通过和交联剂的共价键,而且借助于在沉淀时产生的离子交互作用和/或氢键,使可以稠化并固化透明质酸大分子网络。

[0013] 因此,本发明的目的在于可根据包括下列步骤的方法获得的交联透明质酸:

[0014] - 使用耦合剂和辅助耦合剂活化透明质酸,以获得活化的透明质酸,

[0015] - 在 pH 调至 8 到 12 的范围内的反应介质中,使所述活化的透明质酸和含有至少 50 重量%的寡肽或多肽的交联剂反应,以获得交联的透明质酸,

[0016] - 将反应介质 pH 调节至 5 到 7 的范围内的值,

[0017] - 在有机溶剂中沉淀所述交联的透明质酸以获得交联的透明质酸纤维,和

[0018] - 选择性地,干燥由此获得的交联的透明质酸纤维。

[0019] 根据本发明获得的交联透明质酸是可溶于水的。该措辞用于表示通过上述方法获得的 1g 所述脱水纤维在一升盐水溶液中在几分钟内解聚并在无搅拌几个小时后完全溶解。

[0020] 在上述方法中使用的透明质酸通常以天然状态使用,即天然存在于活的有机体的,或当由细菌发酵产生时由细菌分泌。通常,它由此具有 500,000 到 7,000,000 道尔顿(dalton)范围内的分子质量,且一般以钠盐的形式使用。

[0021] 交联前,透明质酸使用耦合剂和辅助耦合剂活化。

[0022] 耦合剂的实例是可溶于水的碳二亚胺比如 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、1-乙基-3-(3-三甲基氨基丙基)碳二亚胺(ETC)、和 1-环己基-3-(2-吗啉乙基)碳二亚胺(CMC)以及它们的盐和混合物。本发明优选使用 EDC。

[0023] 辅助耦合剂的实例是 N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)、N-羟基苯并三唑(HOBt)、3,4-二氢-3-羟基-4-氧-1,2,3-苯并三唑(HOObt)、1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HAt)、和 N-羟基磺基琥珀酸亚胺(磺基-NHS)、和它们的混合物。本发明优选使用 NHS,但不限于选择它。

[0024] 所述耦合剂和辅助耦合剂的作用在下文实施例 1 中说明。

[0025] 根据本发明,耦合剂和透明质酸羧酸单元的摩尔比优选在 2% 和 200% 之间,更优选在 5% 和 100% 之间。

[0026] 此外,辅助耦合剂和耦合剂的摩尔比有利地在 1:1 和 3:1 之间,优选在 1.5:1 和 2.5:1 之间,包括极值,更优选等于 2。

[0027] 用耦合剂活化透明质酸的反应可在例如 3 到 6, 优选为 4 到 5, 的 pH 范围内进行。

[0028] 反应介质中的透明质酸浓度为例如 0.1 重量%和 5 重量%之间, 例如 0.1 重量%和 1 重量%之间, 包括极值。

[0029] 交联剂含有至少 50 重量%的寡肽或多肽, 并有利地由寡肽或多肽组成, 所述多肽可以是随机、嵌段、片段、接枝或星状均聚或共聚多肽。交联剂通常是盐, 特别是氢氯化物, 选择性是氢溴化物, 或特别是三氟乙酸盐。

[0030] 本发明可用的多肽的实例是赖氨酸、组氨酸和 / 或精氨酸均聚物和共聚物, 特别是具有至少两个或甚至至少五个赖氨酸单元的聚赖氨酸 (比如二赖氨酸)、聚组氨酸和聚精氨酸, 但不限于该列举。这些氨基酸可以是 D 形式或 L 形式。本发明优选使用二赖氨酸及其盐与衍生物。

[0031] 根据本发明, 所涉及的多肽的胺官能数表示所涉及的透明质酸的羧酸官能数的 1% 到 100%, 优选为 10% 到 50%。

[0032] 在本发明的第一个优选变体中, 耦合剂以相对于交联剂的胺官能的化学当量使用。按此方式, 在根据本发明的方法的第一步的结尾, 被活化的透明质酸羧酸官能的量等于在第二步中加入的胺官能的量。

[0033] 在本发明的第二变体中, 耦合剂以相对于透明质酸的羧酸官能的化学当量使用。在此情况下, 在根据本发明的方法的第一步的结尾, 所有透明质酸羧酸官能均被活化且在第二步中使用的交联剂的量可以是, 例如小于 30%, 优选为小于 10%, 或甚至大约 5% (按交联剂的摩尔数相对于羧酸官能的摩尔数)。

[0034] 交联反应通常在对于熟练人员完全常规的温度条件和持续时间下进行, 例如在 0-45°C, 优选为 5-25°C 的温度下进行 1 到 10 小时, 优选为 1 到 6 小时。为了促进酰胺键的形成, 反应的 pH 在 8 和 12 之间的范围内, 优选在 8 和 10 之间 (包括极值)。所述 pH 可使用任何碱调节, 优选为弱亲核碱, 例如胺, 比如二异丙基乙胺 (DIEA)。

[0035] 该反应一般在溶剂中进行, 比如氯化钠水溶液。

[0036] 反应介质中的透明质酸浓度为, 例如在 0.01 重量%和 5 重量%之间, 例如在 0.1 重量%和 1 重量%之间, 包括极值。

[0037] 反应后, 在获得的交联的透明质酸沉淀前用任何酸比如盐酸将反应介质的 pH 调至 5 到 7 的范围内的值, 优选为 5.5 到 7。沉淀步骤在有机溶剂中进行, 比如乙醇、异丙醇、乙醚或丙酮、或它们的混合物, 例如, 本发明优选乙醇。溶剂有利地以表示反应介质的体积的 5 到 20 倍, 例如大约 10 倍的量使用。

[0038] 然后优选进行可选的干燥步骤, 以获得易于处理并便于储存的交联透明质酸的脱水形式。特别地, 所述储存可在负的冷冻条件下进行。

[0039] 本发明的主题也含上述生产交联透明质酸的方法。

[0040] 该方法也可含有除明确提及的步骤之外的步骤, 特别是将所述脱水的交联透明质酸和水溶液, 比如氯化钠溶液、盐水溶液或可注射的缓冲溶液 (特别是磷酸盐缓冲盐水溶液) 混合以形成水凝胶的步骤。所述水凝胶中的透明质酸浓度可在按重量 / 体积计 1% 到 4%, 优选为 1.5% 到 3% 的范围内。

[0041] 因此, 本发明的目的也在于这样的在水溶液中含有上述交联透明质酸的水凝胶。

[0042] 根据本发明, 如此获得的水凝胶在杀菌 (例如在 118-130°C 2 到 30 分钟) 后的弹

性模数 G' 为至少 100pa, 例如在 200 和 600Pa 的范围内, 包括极值, 且在 93°C 烘干 1 小时后弹性模数变化小于 30%, 优选为小于 20%。同样有利地, 它的粘性模数 G'' 在 50 到 200Pa 的范围内; 损耗角 $\delta [= \text{Inv tan}(G''/G')]$ 在 15° 到 35° 的范围内, 且粘度 η 在 1000 到 3000pa · s 的范围内。测量弹性模数、粘性模数、和损耗角可按下列方式进行: 在 25°C 的温度下用 4cm, 4° 的圆锥板几何处理水凝胶。在 1Hz 以 1% 的强制变形进行非破坏性粘弹性试验。使用 TA Instruments 公司的 AR 1000 流速计测量弹性模数。相同的设备可用于以 $5 \times 10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 的剪切梯度测量粘度。

[0043] 因此, 本发明的目的也在于含有用交联剂的交联透明质酸的杀菌的水凝胶, 所述交联剂含有至少 50 重量%的寡肽或多肽, 其特征在于, 在 93°C 烘干 1 小时后它的弹性模数变化小于 30%。

[0044] 该水凝胶有利地用于制造植入物。

[0045] 这样的植入物可特别在皮下 (皮下组织) 或皮内注入纤维组织。

[0046] 除上述水凝胶之外, 它们亦可含有载体流体, 所述载体流体含有至少一种多糖例如至少一种纤维素衍生物比如羧甲基纤维素、和 / 或至少一种糖胺聚糖比如透明质酸钠、和 / 或生物相容的, 生物可再吸收的材料比如聚乳酸 (PLA)、聚乙醇酸 (PGA)、聚 (乳-共-乙醇) 酸 (PLGA)、磷酸三钙 (TCP)、或羟基磷灰石 (HAP)、和它们的混合物的颗粒。

[0047] 这样的矿物的实例, 植入物含有所述矿物, 特别描述于专利申请 WO 2004/069090 中。

[0048] 根据本发明的植入物, 就它们能在 6 到 18 个月内在有机体中降解的意义上, 是生物可再吸收的。

[0049] 它们特别可用于:

[0050] - 补充透明质酸不足的腔体或器官 (一般在皮肤病学、美学医学、或整形外科处理中);

[0051] - 重构在外科手术期间流出的体积 (一般在眼外科中), 或

[0052] - 在正常或损坏的真皮上局部施用 (一般在美容学和皮肤病学中)。

[0053] 上述植入物特别适用于填充脸部褶皱和细线, 和 / 或人体疤痕。

[0054] 因此, 本发明的目的也在于上述交联透明质酸应用于制造美学和 / 或修复外科的可注射的植入物、或用于制造填充产品 (特别是用于填充褶皱、细线、疤痕或皮肤凹陷 (比如脂肪营养不良 (lipodystrophies)) 的产品) 的用途。

[0055] 本发明现通过下列非限制性的实施例说明。

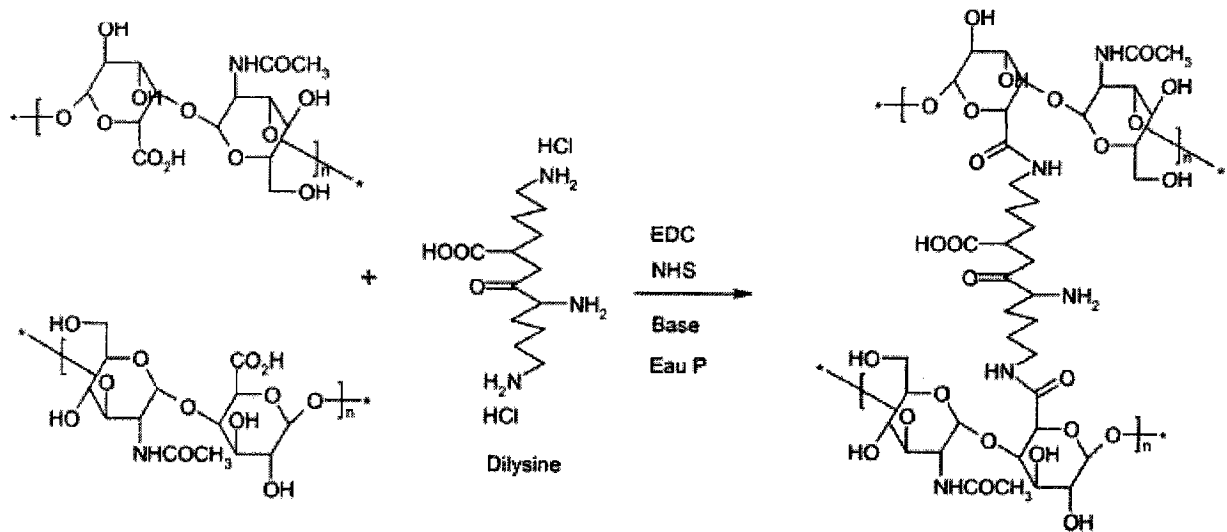
实施例

[0056] 实施例 1: 根据本发明用多肽交联的透明质酸的合成

[0057] 1. 反应流程

[0058] 所遵循的反应流程可通过下列方式说明 (以二赖氨酸为例):

[0059]



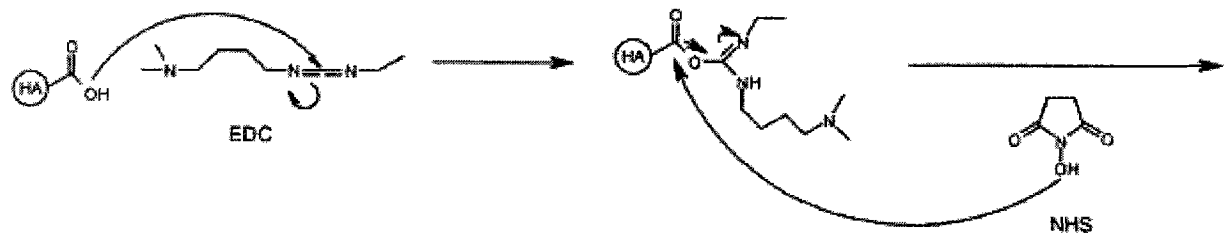
[0060] 透明质酸

交联透明质酸

[0061] 交联反应（流程 1）由两个透明质酸链的羧酸官能和二赖氨酸的胺官能之间的二肽耦合组成。所使用的耦合剂是 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酸亚胺 (NHS)。

[0062] 耦合反应的机理可按下列方式说明：

[0063]



[0064] HA = 透明质酸

[0065] 第一步由透明质酸的羧酸官能对 EDC 耦合剂的碳二亚胺官能的亲核进攻组成。然后，得到的 O-酰基脲用 NHS 取代形成更稳定的活化的酯（1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)尿素的产生）。甚至，所述 O-酰基脲可在微酸性含水介质中和在长反应时间期间内重排成惰性的 N-酰基脲。最后一步由二赖氨酸胺官能中的一个（优选端部，空间有利）对活化的酯的亲核进攻以形成酰胺键同时释放 NHS 组成。

[0066] 2. 记录

[0067] 第一步：溶胀阶段

[0068] 依次将 3g 氯化钠加入 500ml 玻璃反应器中的 300ml milliQ 水中。在超声仪中溶解氯化钠后，将 2g 透明质酸 (HTL Sar1, 批号 PH1016, $M_w = 2.6 \times 10^6$ 道尔顿, 下称 HA) 引入含有盐溶液的反应器中，用手小心地尽可能磨损 HA 纤维。用平勺搅拌该非均相介质 1 分钟后，将反应器无搅拌地置于 4°C 15 小时并用铝箔覆盖以保护反应介质。

[0069] 第二步：交联阶段

[0070] 从冷却器移走反应混合物，然后在环境温度（18-25°C）搅拌 10 分钟（视觉上，溶液应完全清澈并为均相，具有一些粘度，像流体蜂蜜）。

[0071] 搅拌为机械式，用半月形特氟隆搅拌器。转速是 60rpm。

[0072] 然后,在溶血管中制备 464mg(4.03mmol)N-羟基琥珀酸亚胺(ACROS,98%纯度,下称 NHS)在 5ml milliQ 水中的溶液,接着使其涡转以溶解所有 NHS。以 5ml/分钟的速率将该溶液逐滴加入反应介质中。

[0073] 将该混合物放置并搅拌 5 分钟,然后加入 4ml milliQ 水中的 313mg(2.02mmol)N-(3-二甲基氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺氢氯化物溶液(Sigma-Aldrich,序号 03450-5G,下称 EDC)。通过涡转进行溶解,然后以 5ml/分钟的速率进行逐滴加入。

[0074] 将混合物放置并搅拌 30 分钟,然后以 1ml/分钟的速率将二赖氨酸水溶液加入反应介质。所述溶液通过在涡转下向 1ml milliQ 水中溶解 233mg(0.67mmol)二赖氨酸氢氯化物(供应商 BACHEM,序号 G2675),然后 1302 μ l(10.08mmol)二异丙基乙胺(供应商 ACROS,序号 115225000,下称 DIEA)而制备,该整体在溶血管中。该混合物呈现两个不同的阶段,在强烈搅拌后形成可逆的乳浊液。将其加入反应介质时,尝试混合尽可能多的乳浊液。反应介质的 pH 应在 8.5 和 10.5 之间。

[0075] 将该整体放置并搅拌 3 小时。

[0076] 第三步:提纯阶段

[0077] 搅拌停止后,在沉淀前用 1M HCl 调节溶液的 pH 以将 pH 降至 5.7。

[0078] 然后制备装有机械搅拌器和耙状搅拌棒的一升反应器。将 420ml 95° 乙醇注入所述反应器中,并打开机械搅拌至超高速(大约 1000rpm)。

[0079] 然后,使用 50ml 注射器吸出 42ml 含有交联透明质酸盐的反应混合物,然后连续将其作为薄层引入所述反应器中。溶液应清澈,无色,并相当粘稠。

[0080] 加入一旦完成,再维持搅拌两分钟。然后从反应器移除搅拌棒,再使用一对镊子将获得的聚合物在孔隙率 II 的玻璃料上展开。所述聚合物在真空瓶中迅速干燥最多 15 秒,然后置于真空下的干燥器中干燥最少 12 小时。

[0081] 最终产品应完全为白色。

[0082] 第四步:再形成阶段

[0083] 为了制备 10ml 2.4% 的凝胶,将 240mg 干燥的交联的聚合物引入装有封盖(在注射器出口)的标准聚丙烯注射器。然后将 10ml 缓冲的 ** 溶液加入所述固体,然后将该整体放置,使其在 4°C 溶胀 12 到 15 小时。

[0084] 将所述注射器从冷却器移走后,使用机械搅拌器以 1000rpm 的速度快速搅拌产品。所使用的搅拌器是不锈钢匙状实验室平勺。对该产品的搅拌时间是大约 5 分钟,但可根据粘度变化。最终的凝胶应为无色且完全均相。

[0085] 实施例 2:降解或持久试验

[0086] 原理:

[0087] 熟练人员习惯于进行加速降解试验,该试验预测聚合物对多种活体内的降解因素的抗性(特别参见 FR 2861734)。

[0088] 在本实施例中,进行一个这样的试验,测量预先杀菌的交联产品的流变特性,然后经历 93°C 的加热阶段一小时。再计算加热期间的弹性模数(G')的百分比损失。该百分比越低,产品对加热的抗性越强,认为它能承受其他降解因素的能力也越强。因此,该试验就交联的透明质酸的活体内降解速率而言是具有预测性的,同时就可获得的褶皱填充的持续时间亦是具有预测性的。

[0089] 试验的产品：

[0090] 所有试验的产品均为是无菌产品。

[0091] 试验多个市售产品,连同下列产品：

[0092] - 产品 1,是如实施例 1 所述获得的透明质酸,和

[0093] - 产品 2,是如实施例 1 所述获得的透明质酸,除了使用 45mol% EDC ;90mol% NHS,和 15mol% 二赖氨酸,相当于透明质酸的 COOH 单元的摩尔数和 2.22 的 DIEA/NHS 比值。

[0094] 结论：

[0095] 下表 1 显示对多种交联透明质酸试验所获得的结果。

[0096] 表 1 :交联透明质酸降解试验

无菌样品	T0		1H00 后的 T1, 93°C		%损失 G'
	弹性模数(G')	损失角	弹性模数(G')	损失角	
PERLANE"	500	8.5	360	8.4	28%
JUVEDERM® 3OHV®	63.5	22	43.5	25	31%
ESTHELIS Basic®	89	25	43	27	52%
产品 1	262	26	224	30	14%
产品 2	206	25	199	30	3%

[0098] 由该表可知,根据本发明的改性的透明质酸比市售的交联透明质酸显示更小的弹性模数下降,证明它们对降解因素的抗性更强。

[0099] 实施例 3 :沉淀 pH 的影响

[0100] 比较基本上按实施例 1 所述合成的交联透明质酸的物理化学性质,和在多种 pH 下在乙醇中的沉淀。合成这样的化合物的方法的参数提供于下表 2 中：

[0101] 表 2 :用于合成交联透明质酸的参数

[0102]

产品	% EDC		%二赖氨酸	DIEA/NHS 比值	沉淀 pH
产品	40%	80%	13.33%	2.5	5.7
产品 A	40%	80%	13.33%	2.5	9.0
产品 B	40%	80%	13.33%	2.5	4.0
产品 3	100%	200%	5%	2.0	5.7
产品 C	100%	200%	5%	2.0	4.0

产品 4	45%	90%	15%	2.22	5.20
产品 D	45%	90%	15%	2.22	4.0

[0103] * 相当于透明质酸的羧酸官能的摩尔数

[0104] 一旦上述产品如实施例 1 所述再形成后,在 90°C 的恒温器中前后一个小时评价上述产品的物理化学性质。更具体地说,评价水凝胶的粘度并测量其弹性模数。结果示于下表 3。

[0105] 使用 1 到 5 类,其表示考虑凝胶弹性和粘度的总括评分。一般认为凝胶的弹性越好,则其评分越高。相反,非均相和 / 或流体凝胶评分则低。

[0106] 表 3 :交联透明质酸的物理化学性质

[0107]

产品	水凝胶的外观 (T0)	G' (T0)	水凝胶的外观 (T60)	G' (T60)	% 损失 G'
产品 1	清澈,稍有粒状 (5 类)	262	清澈,弹性 (5 类)	224	14%
产品 A	几乎不粘弹 (2 类)				--
产品 B	清澈,粘稠 (4 类)		清澈 (3 类)		--
产品 3	非常清澈 (5 类)	296	非常清澈 (5 类)	215	27%
产品 C	非常清澈 (5 类)	--	非常清澈 (2 类)	--	--
产品 4	清澈,稍有粒状 (5 类)	206	清澈,弹性 (5 类)	199	%
产品 D	非常清澈,粘弹 (5 类)	--	几乎不粘弹 (2 类)	--	--

[0108] 由该表可知,在碱性 pH 沉淀的交联透明质酸尽管便于再形成为水凝胶,但不能提供适用于填充褶皱的产品的的水凝胶。一般认为这样的现象源于沉淀期间离子键的不充分产生。

[0109] 此外,在过于酸性的 pH 沉淀的交联透明质酸提供具有良好粘弹性的水凝胶 (假设它们可以再形成,这并不总是可能的),但当其置于保温器中时明显降解,因此会对内生的降解因素敏感。

[0110] 事实上,似乎仅在 5 到 7 的范围内的沉淀 pH 使可以容易地形成具有非常令人满意的粘弹性的均相水凝胶,所述粘弹性在降解试验后基本上不减少。这证实在该 pH 范围内,由静电和共价键形成的大分子筛对于作为填充材料的应用是最佳的。