



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202005656 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 01 日

(21) 申請案號：108123948

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 08 日

(51) Int. Cl. :

*A61K31/728 (2006.01)**A61K31/738 (2006.01)**A61L31/14 (2006.01)**A61K9/00 (2006.01)**C08B37/00 (2006.01)**C08J3/075 (2006.01)*

(30) 優先權：2018/07/06 南韓

10-2018-0078989

(71) 申請人：南韓商 L G 化學股份有限公司 (南韓) LG CHEM, LTD. (KR)

南韓

(72) 發明人：張澈 JANG, CHEOL (KR)；李忠 LEE, CHUNG (KR)；金玖淵 KIM, GOO YOUN (KR)；金志宣 KIM, JI SUN (KR)；鄭現太 JUNG, HYUN TAE (KR)；李昌泫 LEE, CHANG HYUN (KR)；蘇震彥 SO, JINEON (KR)；李華娟 REE, HWAYOUN (KR)

(74) 代理人：林志剛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：1 共 33 頁

(54) 名稱

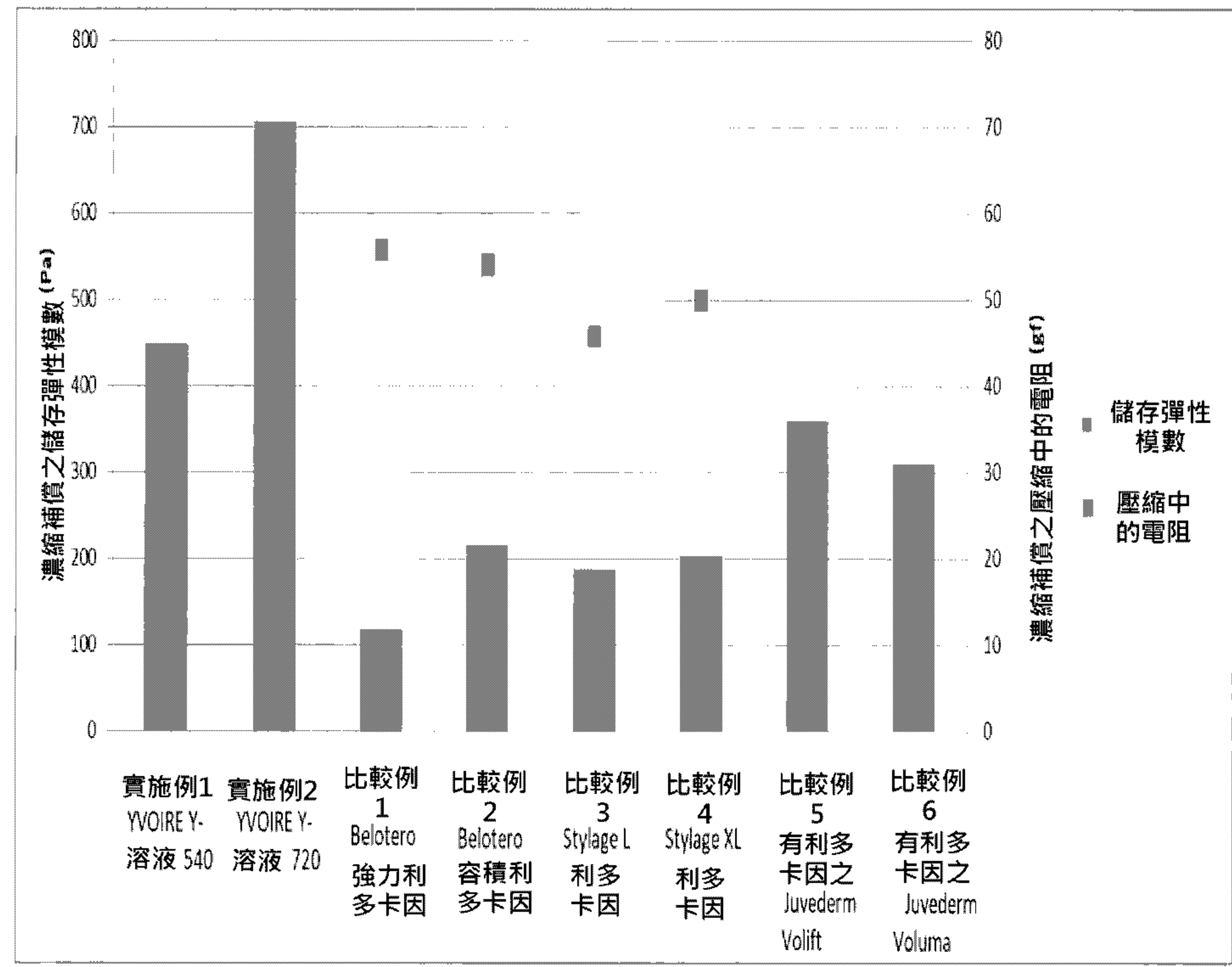
同時具有高度黏彈性和內聚性之玻尿酸填料

(57) 摘要

根據本發明之玻尿酸填料呈現改良的高度黏彈性流動特性，並同時具有單相玻尿酸填料和雙相玻尿酸填料的優點，並因此在注入皮膚中時可保持形狀且具有低移動可能性，及因此其當用於改善皺紋、增大軟組織諸如臉頰、胸部、鼻子、嘴唇和臀部等等，及校正輪廓時為極佳的，及在人體中的持續時間增加且副作用小，即使是在製備方法中使用少量交聯劑的情況。

The hyaluronic acid filler according to the present invention exhibits improved high viscoelastic flow characteristics, and has advantages of monophasic hyaluronic acid fillers and biphasic hyaluronic acid fillers together, and therefore it maintains the shape while having low moving possibility when injecting into skin, and thus it is excellent when used for improving wrinkles, augmentation of soft tissues such as cheeks, chest, nose, lips and hips, etc., and correcting contours, and the duration time in the human body is increased and side effects are small, even if a small amount of crosslinking agent is used during the preparation process

指定代表圖：



【圖 1】



202005656

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

同時具有高度黏彈性和內聚性之玻尿酸填料

### 【英文發明名稱】

HYALURONIC ACID FILLER HAVING HIGH VISCOELASTICITY  
AND COHESIVITY SIMULTANEOUSLY

### 【中文】

根據本發明之玻尿酸填料呈現改良的高度黏彈性流動特性，並同時具有單相玻尿酸填料和雙相玻尿酸填料的優點，並因此在注入皮膚中時可保持形狀且具有低移動可能性，及因此其當用於改善皺紋、增大軟組織諸如臉頰、胸部、鼻子、嘴唇和臀部等等，及校正輪廓時為極佳的，及在人體中的持續時間增加且副作用小，即使是在製備方法中使用少量交聯劑的情況。

## 【 英文 】

The hyaluronic acid filler according to the present invention exhibits improved high viscoelastic flow characteristics, and has advantages of monophasic hyaluronic acid fillers and biphasic hyaluronic acid fillers together, and therefore it maintains the shape while having low moving possibility when injecting into skin, and thus it is excellent when used for improving wrinkles, augmentation of soft tissues such as cheeks, chest, nose, lips and hips, etc., and correcting contours, and the duration time in the human body is increased and side effects are small, even if a small amount of crosslinking agent is used during the preparation process

【指定代表圖】第(1)圖。

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

同時具有高度黏彈性和內聚性之玻尿酸填料

### 【英文發明名稱】

HYALURONIC ACID FILLER HAVING HIGH VISCOELASTICITY  
AND COHESIVITY SIMULTANEOUSLY

### 【技術領域】

[相關申請案之交互參照資料]

本申請案主張根據2018年7月6日申請之韓國專利申請案第10-2018-0078989號之優先權的權益，且併入對應韓國專利申請案中所揭示之全部內容作為本說明書的一部分。

本發明關於玻尿酸填料，且更具體地說，關於同時具有單相玻尿酸(HA)填料的高度內聚性和雙相玻尿酸填料的高度彈性之玻尿酸填料及其製備方法。

### 【先前技術】

人體皮膚的組織藉由細胞外基質(包括蛋白質諸如膠原蛋白、彈性蛋白等等和糖胺聚多醣)維持其結構，但是當由於外部衝擊、疾病或衰老等等原因而發生軟組織缺損時，組織增加諸如軟組織增加已經用於醫學和美容目的。此增加已藉由整形外科手術進行，或者以非手術方式藉由

將生物組織或合成聚合物化學品注入該區域來增加和擴展軟組織的體積而恢復和校正其形狀。此外，一種物質，稱為軟組織增大(soft tissue augmentation)材料，且通常稱為皮膚填料，為一種與皮膚組織相似的組分且被插入特定部位以擴張軟組織，並藉此美容上擴大臉頰、嘴唇、胸部、臀部等等的體積及透過減少皮膚細皺紋和深層皺紋而用於抗皺紋或輪廓校正。主要研發與此填料有關的第一代皮膚填料包括藉由萃取衍生自動物(即牛或豬等等)之動物蛋白而製備的 Zyderm 和 Zyplast，及使用人類膠原蛋白之 Cosmoderm 或 Cosmoplast 等等，但因為作用期間短且在手術前一個月進行皮膚過敏性試驗的不便，所以最近彼等很少被實施。

第二代填料為玻尿酸(在下文中，也稱為‘HA’)填料並具有比膠原蛋白填料長的作用期間，且由與人體組分相似的多醣、N-乙醯基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸組成，因此其副作用少和易於操作及移除，且可能藉由吸引水來保持皮膚的水分、體積和彈性，並因此其具有作為皮膚之填料的適當優點。

然而，玻尿酸本身顯示在人體中只有幾個小時的短半衰期，並因此在應用上受到限制，因此進行研究以透過交聯來增加半衰期(內部持久性)。例如，美國專利案 4,582,865 號揭示一種使用二乙烯基砒(DVS)作為交聯劑交聯之玻尿酸衍生物，且其水凝膠形式已以商品名 Hyalfrom® 銷售，及美國專利第 5,827,937 號揭示一種使用

多官能性環氧化合物作為交聯劑以製備玻尿酸衍生物的交聯產物之方法，及其中，Restylane®，使用1,4-丁二醇二環氧丙基醚(BDDE)作為交聯劑而製備之玻尿酸交聯產物的氫形式已被U.S. FDA批准且以用於組織增加的填充劑在全球上市。

此類交聯玻尿酸填料包括由單相製成的填料(單相HA填料)和由雙相製成的填料(雙相HA填料)。單相玻尿酸填料係使用包含交聯玻尿酸的均勻液體狀水凝膠製備，且因此其通常具有低度彈性和高度內聚性。因此，當將單相玻尿酸填料注入皮膚時，不太可能偏離注入部位，但是有注入形式不可能長時間保持及該注入程序後的形狀(形式)保持期僅為約2個月的問題。

雙相玻尿酸填料係藉由混合交聯玻尿酸粒子單獨或與接近液體之非交聯玻尿酸(未經處理的非交聯玻尿酸(線性HA))組合而製備，且因此其通常具有高度彈性和低度內聚性。因此當注入雙相HA填料時，其可保持形狀很長一段時間，但是有高度可能從注射部位偏離的問題。雙相HA填料之代表性實例為上述Restylane®(Galderma產品)。

如此，單相HA填料和雙相HA填料分別具有優點和缺點，且傳統上，有一為了具有單相玻尿酸填料和雙相玻尿酸填料之所有性質而混合上述填料的實例，但在此情況下，單相玻尿酸填料和雙相玻尿酸填料的優點均被稍為減低，並因此不適合作為填料。因此，需要一種能夠長時間保持其形狀而又不易偏離注入部位的填料。

**【發明內容】****[技術問題]**

為了解決上述問題，提出本發明，且本發明之一目的為提供一種具有如單相HA填料和雙相HA填料的優點之高度黏彈性和內聚性的填料，亦即，可長時間保持形狀且同時不太可能從注入部位逸出且可注入人的皮膚中以用於改善皺紋和整形的填料。

本發明之另一目的為提供一種製備該類填料之方法。

**[技術解決方案]**

已經發明本申請案來解決上述先前技術的問題，且當玻尿酸符合條件諸如特定分子量和交聯度時，則其同時具有單相填料的高度內聚性和雙相填料的高度黏彈性，且因此證實：當其注入皮膚中時，可很容易地製成所需的形式且可保持所需的時間，從而完成本發明。

因此，本發明之一態樣係關於一種具有高度黏彈性和內聚性從而顯示單相填料和雙相填料的性質之玻尿酸填料、一種填充有填料之預填充注射器、一種用於軟組織增大的含有填料之生物材料或一種改善皺紋之方法，其包含將其注入生物組織中。

包含在本發明填料中的玻尿酸(在下文中，也稱為‘HA’)為生物聚合物材料，其中由N-乙醯基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸組成的重複單元係線性連接，且其廣泛存在

於眼睛的玻璃體、關節的滑液、雞冠等等中，及其已廣泛用於醫療和醫療設備諸如眼科手術輔助設備、關節功能改善劑、藥物輸送材料、眼藥水、抗皺劑或化妝品，因為其具有極佳的生物相容性。具體而言，包含在本發明填料中的玻尿酸除了玻尿酸之外亦可意指其鹽。玻尿酸之鹽包括例如無機鹽諸如玻尿酸鈉、玻尿酸鉀、玻尿酸鈣、玻尿酸鎂、玻尿酸鋅、玻尿酸鈷等等，以及有機鹽諸如玻尿酸四丁基銨等等，但不限於此。

此外，較佳地，玻尿酸或其鹽可藉由適當交聯劑交聯。

交聯玻尿酸衍生物可藉由使用交聯劑交聯上述玻尿酸本身或其鹽而獲得。關於交聯，可使用一種在鹼性水溶液條件下使用交聯劑之方法。鹼性水溶液包括 NaOH、KOH，較佳地，NaOH水溶液，但不限於此。此外，在NaOH水溶液的情況下，其可以0.1N至0.5N的濃度使用。即使當交聯劑於低濃度且以少量使用時，包含於本發明填料中的交聯玻尿酸特別顯示高度黏彈性和內聚性。交聯劑的濃度相對於1莫耳的玻尿酸或其鹽中之單元的N-乙醯基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸可為1至10 mol%。

交聯劑為包含二或更多個環氧基官能基且其可改變之化合物，作為一較佳實例，其包括丁二醇二環氧丙基醚(1,4-丁二醇二環氧丙基醚：BDDE)、乙二醇二環氧丙基醚(EGDGE)、己二醇二環氧丙基醚(1,6-己二醇二環氧丙基醚)、丙二醇二環氧丙基醚、聚丙二醇二環氧丙基醚、聚

四亞甲基二醇 (polytetramethylene glycol) 二環氧丙基醚、新戊二醇二環氧丙基醚、聚甘油聚環氧丙基醚、二甘油聚環氧丙基醚、甘油聚環氧丙基醚、三甲基丙烷聚環氧丙基醚、雙環氧丙氧基伸乙基 (1,2-(雙(2,3-環氧丙氧基)伸乙基)、新戊四醇聚環氧丙基醚、和山梨醇聚環氧丙基醚等等，及其中，以低毒性的觀點而言，以二環氧化物為主之 1,4-丁二醇二環氧丙基醚為特佳。

在本文中，術語“修飾度 (MOD)”意指玻尿酸之修飾度，其由顯示與整個玻尿酸分子結合之交聯劑 (例如，BDDE) 的莫耳數相對於玻尿酸的單元 (N-乙醯基-D-葡萄糖胺 (GlcNAc)+D-葡萄糖醛酸) 中之 N-乙醯基-D-葡萄糖胺的莫耳數之數值 (n) 計算，其可以下列方程式 1 表示。

[方程式 1]

修飾度 = 交聯劑的總莫耳數 / N-乙醯基-D-葡萄糖胺的總莫耳數

在本發明中，特別地，其特徵在於藉由上述交聯劑透過交聯，該修飾度顯示 1 至 7 的範圍，較佳地，3 至 5 的範圍。

此外，在本文中，術語“交聯比 (CrR)”意指經交聯之交聯劑的莫耳數相對於總交聯劑的莫耳數之比率，其可以下列方程式 2 表示。

## [方程式 2]

交聯比 = 經交聯之交聯劑的莫耳數 / 總交聯劑的莫耳數

在本發明中，特別地，其特徵在於透過交聯，顯示 0.1 至 0.2，較佳為 0.14 至 0.17 的範圍。較佳地，根據本發明之玻尿酸填料藉由具有上述 MOD 和 CrR 範圍而具有協同地顯示單相填料和雙相填料之性質的特性。

在本文中，交聯玻尿酸之分子量可為 2,500,000 Da 或更高，較佳為 2,500,000 至 3,500,000 Da。

本文中所使用之術語“彈性”係指當將力施加至物體時呈固體的性質，即當施加力時改變形狀但在去除力時恢復為原來形狀的性質。此彈性以儲存模數 ( $G'$ ：彈性模數) 表示，且其單位為帕斯卡 (Pa)。此外，本文中所使用之術語“黏性意”指呈液體的性質，即用來描述流體的流動阻力之量。此黏性可以損耗模數 ( $G''$ ：黏性模數) 表示且其單位為帕斯卡 (Pa)。

本文中所使用之術語黏彈性意指當將力施加至物體時，同時具有該彈性變形和黏性，且作為本發明之填料中所包含的交聯玻尿酸水凝膠呈現黏性和彈性二者，並因此具有黏彈性。此黏彈性可藉由可反映儲存彈性模數 ( $G'$ ) 和損耗彈性模數 ( $G''$ ) 之複數黏度來估評，且其單位為厘泊 (cP)。

本文中所使用之內聚性意指作用於填料粒子之間的吸

引力(黏著力)，且其可能導致填料粒子凝聚在一起。此內聚性越高，可支撐經注入填料的組織之力就越大。通常，內聚性可藉由壓縮試驗間接測量，且其以加載至流變計上後，當以某一速率壓縮時測得的電阻表示，其單位為gf(克力)。

通常，單相形式的玻尿酸填料顯示內聚性凝膠，且因此具有高度內聚性和低度黏彈性。實例包括 Allergan 之 Juvederm®。此外，雙相形式的玻尿酸填料顯示粒子形式，且因此其特徵為具有高度黏彈性和低度內聚性。實例包括 Galderma 之 Restyane®。

如上所述，單相形式的玻尿酸填料和雙相形式的玻尿酸填料具有各自的優點和缺點。

根據本發明之玻尿酸具有高度黏彈性和內聚性，且因此其特徵在於同時具有單相填料之性質和雙相填料之性質。較佳地，根據本發明之玻尿酸填料當以流變計測量時，在 1 Hz 之角速度下呈現  $6 \times 10^4$  或更高，較佳地 60,000 至 130,000 cP 之複數黏度(黏彈性)，及呈現 400 Pa 或更高，較佳地，400 至 800 Pa 之儲存彈性模數  $G'$ ，且呈現 30 gf，較佳地 30 至 60 gf 之內聚性。

此外，在根據本發明之玻尿酸填料中的玻尿酸粒子(較佳地，交聯玻尿酸粒子)可顯示各種形狀，但較佳地，其可為球體形狀。再者，此粒子的平均直徑可為 300 至 400  $\mu\text{m}$ 。

在一較佳態樣中，根據本發明之玻尿酸填料可包含以

總填料重量為基準計為1至3重量%之玻尿酸。此外，根據本發明之玻尿酸填料除了玻尿酸之外，可另外包含水、麻醉劑或其組合。

麻醉劑包含一或多種先前技術中已知的麻醉劑，較佳地，局部麻醉劑，且麻醉劑的一或多者的濃度為減輕注射組成物時所經驗的症狀之有效量。麻醉劑之實例可選自由下列所組成之群組：氨布卡因(ambucaine)、阿莫拉酮(amolanone)、阿米卡因(amylocaine)、丁氧普魯卡因(benoxinate)、苯卡因(benzocaine)、貝托卡因(betoxycaine)、苯柳胺酯(biphenamine)、布比卡因(bupivacaine)、布他卡因(butacaine)、氨苯丁酯(butamben)、布坦卡因(butanilicaine)、布特撒明(butethamine)、丁托西卡因(butoxycaine)、卡鐵卡因(carticaine)、氯普魯卡因(chloroprocaine)、高古柯鹼(cocaethylene)、可卡因(cocaine)、環美卡因(cyclomethycaine)、二丁卡因(dibucaine)、二甲異喹(dimethisoquin)、二甲卡因(dimethocaine)、地哌冬(diperodon)、達克羅寧(dyclonine)、艾克定(ecgonidine)、艾克寧(ecgonine)、氯乙烷、依替卡因(etidocaine)、 $\beta$ -優卡因(beta-eucaine)、尤普羅辛(euprocine)、非那可明(fenalcomine)、福莫卡因(formocaine)、海克卡因(hexylcaine)、羥丁卡因(hydroxytetracaine)、對胺基苯甲酸異丁酯、甲磺酸亮氨卡因(leucinocaine mesylate)、左沙屈爾(levoxadrol)、利多卡因(lidocaine)、甲哌卡因

(mepivacaine)、美普卡因(meprylcaine)、美布卡因(metabutoxycaine)、氯甲烷、麥替卡因(myrtecaine)、納依卡因(naepaine)、安妥卡因(octacaine)、鄰卡因(orthocaine)、奧昔卡因(oxethazine)、對乙氧卡因(parethoxycaine)、非那卡因(phenacaine)、酚、皮珀羅卡因(piperocaine)、匹多卡因(piridocaine)、聚多卡醇(polidocanol)、普莫卡因(pramoxine)、丙胺卡因(prilocaine)、普魯卡因(procaine)、丙洋卡因(propanocaine)、丙美卡因(proparacaine)、丙哌卡因(propipocaine)、丙氧卡因(propoxycaine)、假可卡因(pseudococaine)、吡咯卡因(pyrocaine)、羅皮卡因(ropivacaine)、水楊醇(salicyl alcohol)、丁卡因(tetracaine)、托利卡因(tolycaine)、三甲卡因(trimecaine)、左拉敏(zolamine)、及其鹽。在一個實施態樣中，麻醉劑可為利多卡因，例如，利多卡因鹽酸鹽之形式。

關於根據本發明之玻尿酸填料，填料中所包含之麻醉劑的濃度以填料的總重量為基準計可為約0.1重量%至約1.0重量%，例如，為組成物之約0.2重量%至約0.5重量%。

麻醉劑在本文所述之填料中的濃度可為治療有效的，且此意指對患者無害的濃度，並且適合於提供在操作方便和患者順從性方面的優勢。

此外，根據本發明之填料可進一步包含緩衝溶液，且該緩衝溶液可使用任何用於製備玻尿酸水凝膠的物質，而

沒有限制。緩衝溶液之較佳實例可為包含一或多種選自由下列所組成之群組的緩衝溶液：檸檬酸、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、乙酸、二乙基巴比妥酸、乙酸鈉、TAPS(參(羥甲基)甲基胺基)丙磺酸)、Bicine(2-雙(2-羥乙基)胺基)乙酸)、Tris(參(羥甲基)胺基)甲烷)、Tricine(N-(2-羥基-1,1-雙(羥甲基)乙基)甘胺酸)、HEPES(4-(2-羥乙基)-1-哌啶乙磺酸)、TES(2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]甲磺酸)、和PIPES(哌啶-N,N'-雙(2-乙磺酸))，但不限於此。可適當調整緩衝溶液中所包含之上述成分的含量，但較佳地，彼等以緩衝溶液為基準計可包含於0.3至2.0 g/L之濃度。

而且，根據本發明之填料可進一步包含等滲劑，且可使用此等滲劑，而沒有限制，只要其係用於製備玻尿酸水凝膠即可。作為較佳等滲劑，可使用氯化鈉，但不限於此。等滲劑的含量可根據需要適當調整，且例如，其以緩衝溶液為基準計可包含於7.0至9.0 g/L的量，但不限於此。

在根據本發明之一個實例中，使用包含氯化鈉、磷酸氫二鈉和磷酸二氫鈉於注射水中的緩衝溶液。

作為另一態樣，除上述組分外，根據本發明之組成物可進一步包含可包含在填料的製劑中之可接受的組分。

再者，特徵在於本發明的具有高度黏彈性和內聚性之玻尿酸填料包含很少量的殘餘交聯劑，且殘餘交聯劑較佳為0.5ppm或更低，此為檢測極限。

根據本發明之具有高度黏彈性和內聚性之玻尿酸填料因本發明獨特的彈性性質和內聚性，而可非常有效地使用於美容或治療目的。作為一特殊實例，此玻尿酸填料可使用於填充生物組織、藉由填充皺紋來抗皺紋、面部重塑或軟組織(例如嘴唇、鼻子、臀部、臉頰或乳房等等)體積的恢復或增加、作為用於軟組織增大(augmentation)之生物材料。玻尿酸填料可以適合該等用途的投予形式投予，且較佳地，其可為注射劑。

作為其他態樣，本發明關於一種上述具有高度黏彈性和內聚性之玻尿酸填料之製備方法，其包含下列步驟：

- (a) 藉由將玻尿酸或其鹽、交聯劑加至鹼性水溶液中並攪拌及接著反應以製備交聯玻尿酸水凝膠；
  - (b) 切割步驟(a)中製備的玻尿酸水凝膠；
  - (c) 製備緩衝溶液；
  - (d) 使用步驟(c)中製備的緩衝溶液洗滌和溶脹步驟(b)中所切割的玻尿酸水凝膠；
  - (e) 研磨步驟(d)中之經洗滌且溶脹的玻尿酸水凝膠；
- 及
- (f) 將步驟(e)中製備的水凝膠填充至注射器中並接著滅菌。

步驟(a)為製備交聯玻尿酸水凝膠之步驟，藉由使用交聯劑在鹼性水溶液中使玻尿酸或其鹽進行交聯反應，及對於有關玻尿酸或其鹽、交聯劑、和交聯玻尿酸水凝膠之物質，同樣適用於玻尿酸填料中所述者。

鹼性水溶液可使用任何已知適合於製備玻尿酸水凝膠的鹼性水溶液，而沒有限制，且例如，其可為 NaOH、KOH、NaHCO<sub>3</sub>、LiOH 或其組合，且較佳地，其可為 NaOH。此鹼性水溶液的濃度可為 0.1 至 0.5 N，但不限於此。其最佳可為 0.25 N。證實根據本發明之填料的玻尿酸水凝膠在 0.25 N NaOH 鹼性下交聯後，具有最佳的物理性質。

此外，玻尿酸或其鹽之濃度為玻尿酸或其鹽相對於玻尿酸或其鹽和鹼性水溶液之混合物的總重量之重量比，且其可為 10 至 25 重量%，及以 1 莫耳所加的玻尿酸或其鹽之單元為基準計，交聯劑之濃度為 1 至 10 mol%。當交聯劑之濃度以超過上述範圍的高度濃度使用時，獲得具有過高彈性的填料，而當濃度低於上述範圍時，彈性過低且因此不可能呈現適當的黏彈性。具體而言，該步驟 (a) 可藉由混合和攪拌玻尿酸或其鹽、及交聯劑和鹼性水溶液以均勻混合來進行。交聯期間其可在為室溫或更高的溫度下，較佳在 25 至 40°C 的溫度範圍內，進行 15 至 22 小時。

步驟 (b) 的切割步驟可使用各種已知的玻尿酸水凝膠的切割方法。在一個實例中，將反應後製備的交聯凝膠以餅的形式獲得，且其可使用切刀諸如切草器等等將其分為半月形，及例如，其可分為六個。然後，可藉由將如上述切開的凝膠通過使用具有固定刀片間隔之初步研磨機(較佳為 2 次或更多次)來進行切割步驟。

步驟 (c) 為製備一種用於洗滌和溶脹在步驟 (b) 中所切

割之交聯玻尿酸水凝膠的緩衝溶液之步驟，且該緩衝溶液可藉由已知的緩衝溶液之製備方法製備。此外，該緩衝溶液另外可進一步包含麻醉劑。在本發明之一個特定實施態樣中，藉由在裝有注射水之緩衝槽中溶解磷酸氫二鈉水合物、磷酸二氫鈉水合物、氯化鈉和利多卡因鹽酸鹽來製備緩衝溶液。

可不受限制地使用緩衝溶液，只要其用於製備玻尿酸水凝膠即可。較佳緩衝溶液之實例可為包含選自由下列所組成群組之一或多者的緩衝溶液：檸檬酸、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、乙酸、二乙基巴比妥酸、乙酸鈉、TAPS(參(羥甲基)甲基胺基)丙磺酸)、Bicine(2-雙(2-羥乙基)胺基)乙酸)、Tris(參(羥甲基)胺基)甲烷)、Tricine(N-(2-羥基-1,1-雙(羥甲基)乙基)甘胺酸)、HEPES(4-(2-羥乙基)-1-哌啶乙磺酸)、TES(2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]甲磺酸)、和PIPES(哌啶-N,N'-雙(2-乙磺酸))，但不限於此。

步驟(d)為用步驟(c)中製備之緩衝溶液洗滌和溶脹步驟(b)中所研磨之交聯玻尿酸水凝膠之步驟，且此步驟(d)可重複一次或兩次或更多次。當完成洗滌和溶脹後，可將洗滌溶液移除。

步驟(e)為研磨經洗滌且溶脹的水凝膠之步驟，且此研磨可藉由各種研磨方法進行，但較佳地，其可被擠壓研磨。

此外，在步驟(e)之後，為了將製備的水凝膠充入注射器中並滅菌，可使用已知的填充和滅菌方法。例如，在滅

菌的情況下，可使用高壓釜等等，但不限於此，且可適當地選擇和使用用於填料的滅菌之方法。

#### [有利效果]

根據本發明之填料具有下列效果。首先，其可用作為具有單相玻尿酸填料和雙相玻尿酸填料的所有優點之填料，即，用於擴大軟組織(諸如臉頰、嘴唇、胸部、鼻子、臀部等等)的修復或體積，且藉由減少皮膚細皺紋和深皺紋來改善皺紋或校正輪廓之填料，並且因其呈現高度黏彈性和內聚性，故其可長時間保持形狀，而不太可能從注射部位逸出。

#### 【圖式簡單說明】

圖1為顯示測量根據實施例1和2，及比較例1至6的玻尿酸填料之儲存模數和壓縮中的電阻之結果的圖。

#### 【實施方式】

在下文中，將以實施例更詳細地描述本發明。然而，此等實施例意欲說明本發明，且本發明之範圍不受此等實施例限制。

#### [實施例1]

為了製備根據本發明之玻尿酸填料，進行下列方法。

稱重玻尿酸鈉、氫氧化鈉、和BDDE(1,4-丁二醇二環

氧丙基醚)，(具有 2.5 MDa 至 3.5 MDa 之分子量)。以 1 mol 的所加玻尿酸鈉之單元(即，N-乙醯基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醣醛酸)為基準計，在反應期間玻尿酸鈉的濃度為 15 wt%，及 BDDE 的 mol% 為 4 mol%。個別地，製備和過濾濃度為 0.25 N 的氫氧化鈉水溶液。將稱重的玻尿酸鈉、0.25 N 氫氧化鈉水溶液和 BDDE(1,4-丁二醇二環氧丙基醚)加至混合器容器中並均勻地混合，及將此混合器容器放入恆溫水浴中並在 30°C 的溫度下過夜完成交聯反應。接著，將其中已完成反應的交聯玻尿酸水凝膠進行初步研磨。另一方面，藉由在填充有注射水的緩衝槽中溶解鹽和麻醉劑來製備緩衝溶液，使磷酸氫二鈉水合物(12水合物)的濃度為 1.26 g/L、磷酸二氫鈉水合物(單水合物)的濃度為 0.46 g/L、氯化鈉的濃度為 7 g/L、和利多卡因鹽酸鹽的濃度為 3 g/L。

一部分緩衝溶液被認為是主緩衝溶液，並將其通過 0.22 $\mu$ m 的過濾器轉移到洗滌槽中，及將先前製備之經初步研磨的玻尿酸凝膠轉移至填充有主緩衝溶液的洗滌槽中，並接著攪拌以主要地洗滌和溶脹玻尿酸凝膠，及接著在溶脹完成後，移除洗滌溶液。然後，將二次緩衝溶液通過 0.22 $\mu$ m 的過濾器轉移至洗滌槽中，並接著攪拌以二次洗滌和溶脹玻尿酸凝膠。當洗滌和溶脹完成時，移除洗滌溶液。然後，將三次緩衝溶液通過 0.22 $\mu$ m 過濾器轉移至洗滌槽中，及接著攪拌以三次洗滌和溶脹玻尿酸凝膠。洗滌和溶脹完成後立即移除洗滌溶液。

在完成三次洗滌和溶脹之後，確認洗滌溶液的pH是否在中性範圍內，並在將已完成洗滌和溶脹的玻尿酸凝膠切割之後，將其轉移至擠出機槽中並稱重，及為了達到所需的凝膠重量，添加緩衝溶液以校正主含量。當主含量校正完成後，將玻尿酸凝膠在擠出機槽中擠出並研磨。然後，將經研磨的玻尿酸凝膠轉移至無菌槽中，並進行均質化，及接著測量含量，並添加緩衝溶液以進行二次含量校正。在121°C或更高的溫度下將其中完成含量校正的玻尿酸凝膠熱處理1分鐘或更久，及在填充前將玻尿酸凝膠減壓並攪拌以進行去飽和。然後，將固定填充量的玻尿酸凝膠抽真空/填充至各注射器中，且同時用橡膠塞塞住。將填充有的注射器在最終滅菌器中於121°C或更高的溫度下蒸汽滅菌8分鐘或更久。

#### 實施例2：根據本發明之玻尿酸填料的製備

為了製備根據本發明之玻尿酸填料，進行下列方法。

稱重玻尿酸鈉、氫氧化鈉、和BDDE(1,4-丁二醇二環氧丙基醚)(具有2.5 MDa至3.5 MDa之分子量)。以1 mol的所加玻尿酸鈉之單元(即，N-乙酰基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醯醛酸)為基準計，在反應期間玻尿酸鈉的濃度為16 wt%，及BDDE的mol%為4 mol%。個別地，製備和過濾濃度為0.25 N的氫氧化鈉水溶液。將稱重的玻尿酸鈉、0.25 N氫氧化鈉水溶液和BDDE(1,4-丁二醇二環氧丙基醚)加至混合器容器中並均勻地混合，及將此混合器容器放入恆溫

水浴中並在30°C的溫度下過夜完成交聯反應。接著，將其中已完成反應的交聯玻尿酸水凝膠進行初步研磨。另一方面，藉由在填充有注射水的緩衝槽中溶解鹽和麻醉劑來製備緩衝溶液，使磷酸氫二鈉水合物(12水合物)的濃度為1.26 g/L、磷酸二氫鈉水合物(單水合物)的濃度為0.46 g/L、氯化鈉的濃度為7 g/L、和利多卡因鹽酸鹽的濃度為3 g/L。

一部分緩衝溶液被認為是主緩衝溶液，並將其通過0.22µm的過濾器轉移到洗滌槽中，及將先前製備之經初步研磨的玻尿酸凝膠轉移至填充有主緩衝溶液的洗滌槽中，並接著攪拌以主要地洗滌和溶脹玻尿酸凝膠，及接著在溶脹完成後，移除洗滌溶液。然後，將二次緩衝溶液通過0.22µm的過濾器轉移至洗滌槽中，並接著攪拌以二次洗滌和溶脹玻尿酸凝膠。當洗滌和溶脹完成時，移除洗滌溶液。然後，將三次緩衝溶液通過0.22µm過濾器轉移至洗滌槽中，及接著攪拌以三次洗滌和溶脹玻尿酸凝膠。洗滌和溶脹完成後立即移除洗滌溶液。

在完成三次洗滌和溶脹之後，確認洗滌溶液的pH是否在中性範圍內，並在將完成洗滌和溶脹的玻尿酸凝膠研磨之後，將其轉移至擠出機槽中並稱重，及為了達到所需的凝膠重量，添加緩衝溶液以校正主含量。當主含量校正完成後，將玻尿酸凝膠在擠出機槽中擠出並研磨。然後，將經研磨的玻尿酸凝膠轉移至無菌槽中，並進行均質化，及接著測量含量，並添加緩衝溶液以進行二次含量校正。在

121°C 或更高的溫度下將其中完成含量校正的玻尿酸凝膠熱處理 1 分鐘或更久，及在填充前將玻尿酸凝膠減壓並攪拌以進行去飽和。然後，將固定填充量的玻尿酸凝膠抽真空/填充至各注射器中，且同時，用橡膠塞塞住。將填充有的注射器在最終滅菌器中於 121°C 或更高的溫度下蒸汽滅菌 10 分鐘或更久。

實驗例 1：由本發明製備之玻尿酸填料的黏彈性之研究

為了研究實施例 1 和 2 所製備之流變性質，使用流變計進行分析。為了與本發明的填料進行比較，亦分析和比較市售填料製劑的黏彈性。作為比較例的市售填料製劑和分析條件如下。

<比較例>

- 比較例 1：Belotero 強力利多卡因
- 比較例 2：Belotero 容積利多卡因
- 比較例 3：Stylage L 利多卡因
- 比較例 4：Stylage XL 利多卡因
- 比較例 5：有利多卡因之 Juvederm Volift
- 比較例 6：有利多卡因之 Juvederm Voluma。

<分析條件>

振盪和旋轉流變計之分析條件

在儲存彈性模數 ( $G'$ ) 和複數黏度 ( $\eta^*$ ) 試驗的情況下

- (1) 試驗設備：流變計 (Anton Paar Ltd., MCR301)
- (2) 頻率：1 Hz
- (3) 溫度：25°C
- (4) 應變：4%
- (5) 測量幾何：25 mm板
- (6) 測量間隙：1.0 mm

在當壓縮(壓縮力)時之電阻的情況下

- (1) 試驗設備：流變計 (Anton Paar Ltd., MCR301)
- (2) 間隙：初始位置：2.5 mm，最終位置：0.9 mm
- (3) 速度：0.8 mm/min
- (4) 溫度：25°C
- (5) 測量幾何：25 mm板
- (6) 法向力測量間隙位置：1.5 mm

在分析條件下，當藉由頻率壓縮(壓縮力)時，儲存彈性模數( $G'$ )、複數黏度( $\eta^*$ )和電阻的結果值顯示於表1中。

【表1】

實施例/ 比較例	本發明		Belotero		Stylage		Juvederm	
	實施例1	實施例2	比較例1 Belotero 強力利 多卡因	比較例2 Belotero 容積利 多卡因	比較例3 Stylage L 利多 卡因	比較例4 Stylage XL 利 多卡因	比較例5 有利多卡 因之 Juvederm Volift	比較例6 有利多卡 因之 Juvederm Voluma
濃度 (mg/mL)	20	20	25.5	26	24	26	17.5	20
儲存彈 性模數 (Pa, Hz)	448	707	149	280	225	264	314	310
複數黏 度 ( $\times 10^4$ cP, 1 Hz)	7.18	11.3	2.54	4.57	3.65	4.28	5.08	4.97
壓縮力 (gf)	36	44	71	70	55	65	20	24
濃度校 正後之 儲存彈 性模數 (Pa, 1 Hz)(儲存 彈性模 數 *(20/ 樣品濃 度))	448	707	117	215	188	203	359	310
濃度校 正後之 複數黏 度( $\times 10^4$ cP, 1 Hz)(複數 黏度 *(20/樣 品濃度))	7.18	11.30	1.99	3.52	3.04	3.29	5.81	4.97
濃度校 正後之 壓縮力 (gf)(壓縮 力 *(20/ 樣品濃 度))	36	44	56	54	46	50	23	24

如表 1 中所證實，確定：相較於比較例 1 至 6，根據本發明之實施例 1 和 2 呈現極佳黏彈性。而且，關於內聚性，儘管同時顯示單相填充劑和雙相填充劑的性質，但是彼等顯示比單相填充劑(比較例 5 和 6)優異的壓縮力。此外，考慮到黏彈性和內聚，可看出相較於比較例 1 至 6，根據本發明之實施例 1 和 2 顯示極佳的物理性質。

實驗例 2：根據本發明之玻尿酸水凝膠的粒徑分析

為了確認實施例 1 和 2 及比較例 1 至 6 之玻尿酸水凝膠的粒徑和分布，進行下列試驗。此試驗之結果係顯示於表 2 中。

<分析條件>

雷射繞射粒徑分析儀之分析條件

(1) 試驗設備：雷射繞射粒徑分析儀 (Malvern Ltd., Mastersizer 3000)

(2) 分散劑：0.9% NaCl 溶液

(3) 攪拌器 rpm：1,000

(4) 雷射遮蔽：5~25%

【表2】

實施例/ 比較例	本發明		Belotero		Stylage		Juvederm	
	實施例 1	實施例 2	比較例 1 Belotero 強力利 多卡因	比較例 2 Belotero 容積利 多卡因	比較例 3 Stylage L 利多 卡因	比較例 4 Stylage XL 利 多卡因	比較例5 有利多卡 因之 Juvederm Volift	比較例6 有利多卡 因之 Juvederm Voluma
粒, Dv(50) ( $\mu\text{m}$ )	362	343	571	469	375	358	407	408

實驗例3：根據本發明之玻尿酸水凝膠的修飾度之分析

為了確認實施例1和2及比較例1至6之玻尿酸水凝膠的修飾度，在下列條件下進行試驗。此試驗之結果係顯示於表3中。

<分析條件>

核磁共振之分析條件

(1) 試驗設備：FT-NMR系統 (Jeol Ltd., ECA500/ECZ400S)，

(2) 脈衝：30°

(3) 掃描次數：512

(4) 鬆弛時間(延遲)：5 s

(5) 溫度：25°C

【表 3】

實施例/ 比較例	本發明		Belotero		Stylage		Juvederm	
	實施例1	實施例2	比較例1 Belotero 強力利 多卡因	比較例2 Belotero 容積利 多卡因	比較例3 Stylage L 利多卡 因	比較例4 Stylage XL 利多 卡因	比較例5 有利多卡 因之 Juvederm Volift	比較例6 有利多卡 因之 Juvederm Voluma
修飾度 (%)	3.3	3.5	8.5	12.8	7.8	7.8	6.3	6

從表 3 中可看出，根據本發明之實施例 1 和 2 的玻尿酸填料雖然如先前所證實的顯示極佳物理性質，但仍呈現低修飾度，且此意指其非常具有生物相容性，即使當在製備填料期間中使用少量的交聯劑時，也可提供顯示極佳物理性質之填料。

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種玻尿酸水凝膠填料，其包含玻尿酸、其鹽或交聯玻尿酸，且當以流變計測量時在1Hz的角速度下具有 $6 \times 10^4$  cP或更高之複數黏度，及呈現400 Pa或更高之儲存模數 $G'$ ，和具有30 gf或更高之內聚性。

### 【第2項】

根據申請專利範圍第1項之玻尿酸水凝膠填料，其中該填料具有單相填料和雙相填料二者的性質。

### 【第3項】

根據申請專利範圍第1項之玻尿酸水凝膠填料，其中該玻尿酸為交聯玻尿酸。

### 【第4項】

根據申請專利範圍第2項之玻尿酸水凝膠填料，其中該交聯玻尿酸為其中具有2,500,000 Da或更高之分子量的玻尿酸被交聯者。

### 【第5項】

根據申請專利範圍第1項之玻尿酸水凝膠填料，其中該交聯劑為選自由下列所組成之群組的一或多者：丁二醇二環氧丙基醚(1,4-丁二醇二環氧丙基醚：BDDE)、乙二醇二環氧丙基醚(EGDGE)、己二醇二環氧丙基醚(1,6-己二醇二環氧丙基醚)、丙二醇二環氧丙基醚、聚丙二醇二環氧丙基醚、聚四亞甲基二醇(polytetramethylene glycol)二環氧丙基醚、新戊二醇二環氧丙基醚、聚甘油聚環氧丙基

醚、二甘油聚環氧丙基醚、甘油聚環氧丙基醚、三甲基丙烷聚環氧丙基醚、雙環氧丙氧基伸乙基(1,2-(雙(2,3-環氧丙氧基)伸乙基)、新戊四醇聚環氧丙基醚、和山梨醇聚環氧丙基醚。

**【第6項】**

根據申請專利範圍第5項之玻尿酸水凝膠填料，其中該交聯劑為丁二醇二環氧丙基醚(1,4-丁二醇二環氧丙基醚：BDDE)。

**【第7項】**

根據申請專利範圍第1項之玻尿酸水凝膠填料，其一步包含麻醉劑。

**【第8項】**

根據申請專利範圍第7項之玻尿酸水凝膠填料，其中該麻醉劑是利多卡因(利多卡因)或其鹽。

**【第9項】**

根據申請專利範圍第1項之玻尿酸水凝膠填料，其中該填料係用於皮膚注射。

**【第10項】**

根據申請專利範圍第1項之玻尿酸水凝膠填料，其中該填料係用於軟組織增大(soft tissue augmentation)。

**【第11項】**

根據申請專利範圍第1項之玻尿酸水凝膠填料，其中該填料係用於抗皺紋、軟組織增大或體積膨脹、或輪廓校正。

**【第12項】**

一種玻尿酸水凝膠填料，其包含玻尿酸、其鹽或交聯玻尿酸，且當以流變計測量時，在1Hz的角速度下具有 $6 \times 10^4$  cP或更高之複數黏度，及呈現400 Pa或更高之儲存模數 $G'$ ，和具有30 gf或更高之內聚性，及包含以該玻尿酸或其鹽中之1 mol的N-乙醯基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸為基準計濃度為1至10 mol%的交聯劑。

**【第13項】**

根據申請專利範圍第12項之玻尿酸水凝膠填料，其包含以該玻尿酸或其鹽中的1 mol N-乙醯基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸為基準計濃度為1至5 mol%的交聯劑。

**【第14項】**

一種根據申請專利範圍第1至13項中任一項之玻尿酸填料之製備方法，其包含下列步驟：

(a) 藉由將玻尿酸或其鹽和交聯劑加至鹼性水溶液中並攪拌以製備交聯玻尿酸水凝膠；

(b) 切割步驟(a)中製備的玻尿酸水凝膠；

(c) 製備緩衝溶液；

(d) 使用步驟(c)中製備的該緩衝溶液洗滌和溶脹步驟(b)中所切割的玻尿酸水凝膠；

(e) 研磨步驟(d)中之經洗滌且溶脹的玻尿酸水凝膠；  
及

(f) 將步驟(e)中製備的水凝膠填充至注射器中並接著滅菌。

**【第15項】**

根據申請專利範圍第14項之製備方法，其中該鹼性水溶液為 NaOH、KOH、NaHCO<sub>3</sub>、LiOH 或其組合之水溶液。

**【第16項】**

根據申請專利範圍第15項之製備方法，其中該鹼性水溶液之濃度為 0.1N 至 0.5N。

**【第17項】**

根據申請專利範圍第14項之製備方法，其中該交聯劑為 1,4-丁二醇二環氧丙基醚。

**【第18項】**

根據申請專利範圍第14項之製備方法，其中以該玻尿酸或其鹽相對於該玻尿酸或其鹽和該鹼性水溶液之混合物的總重量之重量比表示，該玻尿酸或其鹽的濃度為 10 至 25 重量 %。

**【第19項】**

根據申請專利範圍第14項之製備方法，其中該步驟(a)係在 25 至 40°C 的溫度範圍下進行 15 至 22 小時。

**【第20項】**

根據申請專利範圍第14項之製備方法，其中該步驟(c)之該緩衝溶液包含選自由下列所組成之群組的一或多者：檸檬酸、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、乙酸、二乙基巴比妥酸、乙酸鈉、TAPS(參(羥甲基)甲基胺基)丙磺酸)、Bicine(2-雙(2-羥乙基)胺基)乙酸)、Tris(參(羥甲基)胺基)

烷)、Tricine(N-(2-羥基-1,1-雙(羥甲基)乙基)甘胺酸)、HEPES(4-(2-羥乙基)-1-哌啶乙磺酸)、TES(2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]甲磺酸)、和PIPES(哌啶-N,N'-雙(2-乙磺酸))。

**【第21項】**

根據申請專利範圍第14項之製備方法，其中該緩衝溶液進一步包含麻醉劑和等滲劑。

**【第22項】**

一種預填充式注射器，其中填充有根據申請專利範圍第1至13項中任一項之玻尿酸填料。

**【第23項】**

一種用於軟組織增大之生物材料，其包含根據申請專利範圍第1至13項中任一項之玻尿酸填料。

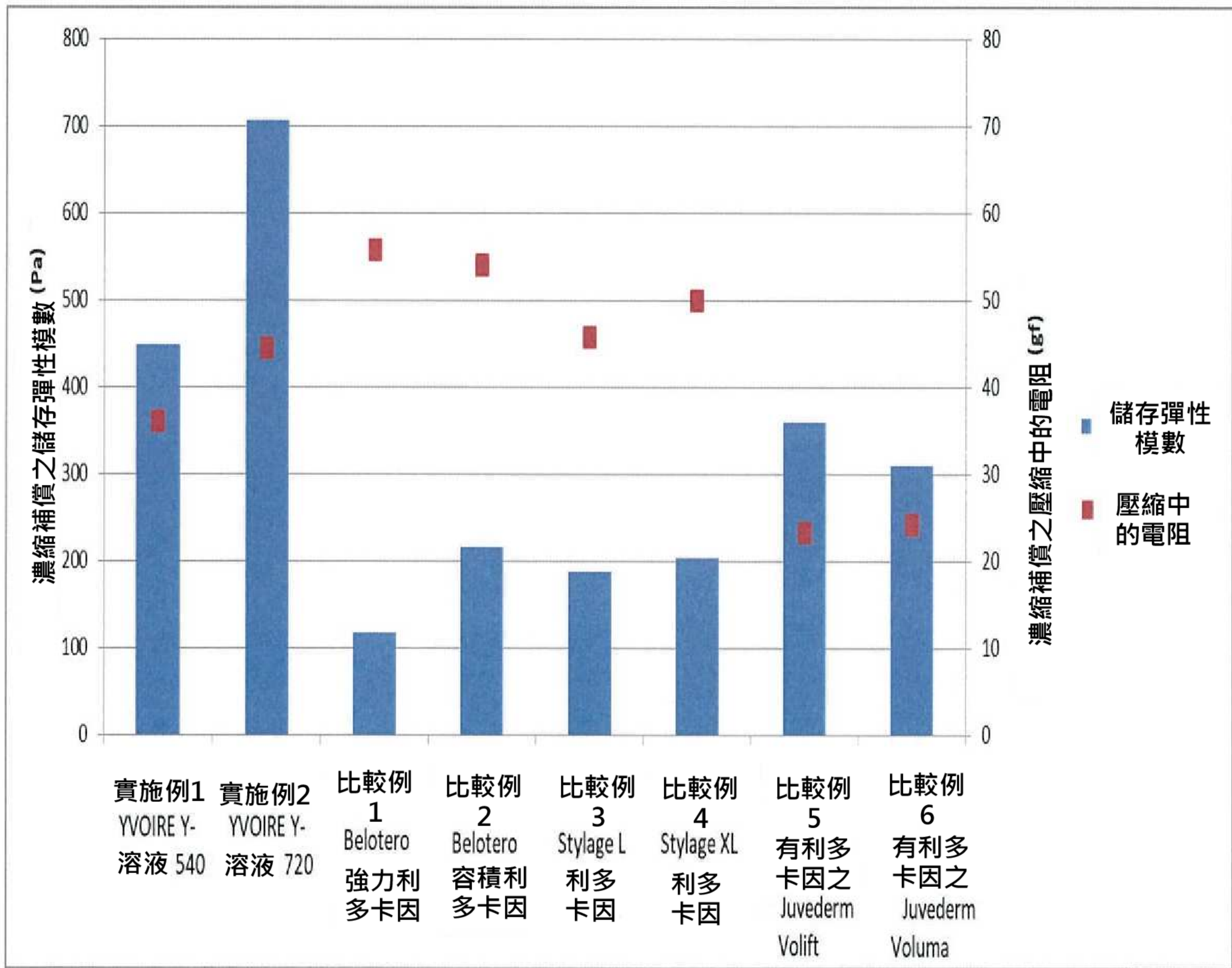
**【第24項】**

一種增大軟組織的方法，其包含注射根據申請專利範圍第1至13項中任一項之玻尿酸填料。

**【第25項】**

一種改善皺紋之方法，其包含注射根據申請專利範圍第1至13項中任一項之玻尿酸填料。

【發明圖式】



【圖 1】