



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109734825 B

(45) 授权公告日 2022.01.28

(21) 申请号 201910026542.9

A61K 47/36 (2006.01)

(22) 申请日 2013.06.28

A61L 27/20 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61L 27/60 (2006.01)

申请公布号 CN 109734825 A

A61Q 19/08 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.05.10

(56) 对比文件

(62) 分案原申请数据

CN 1342171 A, 2002.03.27

201380079033.3 2013.06.28

CN 102863631 A, 2013.01.09

(73) 专利权人 盖尔德玛公司

CN 102552974 A, 2012.07.11

地址 瑞士卡姆

CN 101313915 A, 2008.12.03

(72) 发明人 摩根·卡尔松 安妮·赫兰德肯尼

CN 101821294 A, 2010.09.01

阿克·奥尔伦德

WO 2012054311 A1, 2012.04.26

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

WO 2011014432 A1, 2011.02.03

有限公司 11262

US 4605691 A, 1986.08.12

代理人 贺淑东

US 2007066816 A1, 2007.03.22

(51) Int. Cl.

KR 20070004159 A, 2007.01.09

C08B 37/08 (2006.01)

S. Ibrahim等.Characterization of glycidyl methacrylate - Crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds

C08J 3/24 (2006.01)

incorporating elastogenic hyaluronan

C08L 5/08 (2006.01)

oligomers.《Acta Biomaterialia》.2010,第7卷

A61K 8/04 (2006.01)

审查员 马俊魁

A61K 8/73 (2006.01)

权利要求书1页 说明书33页 附图6页

(54) 发明名称

用于制造成形的交联的透明质酸产物的方法

(57) 摘要

本申请涉及用于制造成形的交联的透明质酸产物的方法,该方法包括使呈期望的形状的非交联的沉淀的透明质酸底物在液体介质中在合适的条件下经受单交联反应以获得沉淀的、成形的交联的透明质酸产物的步骤,所述液体介质具有11.5或更高的pH并且包含一种或更多种多官能交联剂和一定量的一种或更多种有机溶剂,给出透明质酸的沉淀条件,所述沉淀的、成形的交联的透明质酸产物具有每1000个二糖单元1-40个交联剂单元的改性度。

CN 109734825 B

1. 一种成形的交联的透明质酸产物,其中所述产物是纵向延伸度和横向延伸度之间的比率为至少10:1的绳,其中所述绳是中空的或包含若干层,并且其中所述交联的透明质酸产物具有每1000个二糖单元1-10个交联剂的改性度和每g透明质酸4-300mL的溶胀度。

2. 根据权利要求1所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述绳是通过挤出形成的。

3. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述纵向延伸度和横向延伸度之间的比率为至少20:1。

4. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述纵向延伸度和横向延伸度之间的比率为100000:1或更低。

5. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述纵向延伸度和横向延伸度之间的比率为25000:1或更低。

6. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中在完全溶胀的状态下,所述绳具有小于1.5mm的横向延伸度。

7. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中在完全溶胀的状态下,所述绳具有小于0.8mm的横向延伸度。

8. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中在完全溶胀的状态下,所述绳具有小于0.5mm的横向延伸度。

9. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述透明质酸从非动物源来获得。

10. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述绳被编织在一起以形成网。

11. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中在完全溶胀状态下,所述产物具有大于5mm的纵向延伸度。

12. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述绳是部分溶胀的。

13. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述产物在中空空间中包含人类细胞或药物。

14. 根据权利要求1或2所述的成形的交联的透明质酸产物,其中中空空间中填充有透明质酸,或者所述若干层中的一层或多层由交联的或非交联的透明质酸组成。

15. 根据权利要求14所述的成形的交联的透明质酸产物,其中所述透明质酸是交联的。

16. 一种包含根据前述权利要求中任一项所述的成形的交联的透明质酸产物的组合物,其中所述组合物进一步包含非交联的透明质酸或具有与所述产物不同的改性度或交联度的交联的透明质酸。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述不同的改性度为较低的改性度。

18. 一种包含根据前述权利要求1-15中任一项所述的成形的交联的透明质酸产物的组合物。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述组合物进一步包含缓冲剂。

20. 用于药物递送的根据权利要求1-15中任一项所述的成形的交联的透明质酸产物或根据权利要求16-19中任一项所述的组合物。

## 用于制造成形的交联的透明质酸产物的方法

[0001] 本申请是申请日为2013年06月28日,申请号为201380079033.3,发明名称为“用于制造成形的交联的透明质酸产物的方法”的申请的分案申请。

[0002] 发明技术领域

[0003] 本发明涉及多糖的领域。更具体地,本发明涉及使透明质酸交联的新颖的方法和制造成形的交联的透明质酸产物的新颖的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 用于医学用途的最广泛使用的生物相容聚合物中的一种是透明质酸。它是天然存在的多糖,属于葡萄糖胺聚糖(GAG)的组。透明质酸和其他GAG是带负电荷的杂多糖链,其具有吸收大量水的能力。透明质酸和衍生自透明质酸的产物在生物医学领域和美容领域中例如在粘性手术期间和作为皮肤填充剂被广泛地使用。

[0006] 吸水凝胶、或水凝胶被广泛地用于生物医学领域。它们通常通过使聚合物化学交联成无限网络来制备。虽然天然的透明质酸和某些交联的透明质酸产物吸收水直到它们被完全溶解,但交联的透明质酸凝胶通常吸收一定量的水直到它们被饱和,即它们具有有限的液体保留能力、或溶胀度。

[0007] 当从生物相容的聚合物制备凝胶时,有利的是确保低的交联度以便保持高的生物相容性。然而,通常需要更稠密的凝胶具有合适的生物医学效果,并且在这样的情况下,生物相容性常常将损失。

[0008] 因为透明质酸在大部分活的有机体中除了其分子量之外以相同的化学结构存在,所以其产生最少的反应并且允许高级的医学用途。透明质酸分子的交联和/或其他改性必然改进其对体内降解或持续时间的抗性。此外,这样的改性影响透明质酸分子的液体保留能力。作为其结果,透明质酸已经是许多改性尝试的主题。

[0009] 因为交联的透明质酸凝胶产物是高度复杂的化学结构,所以它们典型地特征在于其化学结构和其物理性质的组合。与未改性的透明质酸在化学结构上的偏差通常被报道为改性度(degree of modification)、改性度(modification degree)、交联度、交联指数或化学改性,这全部与共价地结合至透明质酸的交联剂的量有关。在整个本文本中,将使用术语改性度。交联的透明质酸凝胶产物的最相关的物理性质是凝胶可以吸收的液体的体积和凝胶的流变性质。两种性质描述凝胶的常常被称为凝胶强度或凝胶坚度(firmness)的结构稳定性,虽然对于干凝胶可以确定液体的吸收,但对被溶胀至期望的浓度的凝胶必须测量流变性质。用于液体吸收的传统的表述是溶胀、溶胀能力、液体保留能力、溶胀度、溶胀的程度、最大液体吸收和最大溶胀。在整个本文本中,将使用术语溶胀度。关于交联的透明质酸凝胶产物的流变性质,可以注意的是,旋转流变仪仅仅可用于确定液体的流变学,然而振荡流变仪对于确定凝胶的流变学是必要的。测量产生凝胶对变形以弹性模量和粘性模量的单位的抗性。高的凝胶强度将对被溶胀至期望的浓度的凝胶产物的变形产生大的抗性。

[0010] US 2007/0066816公开用于制备双交联的透明质酸的工艺,包括在两个步骤中分别用环氧化物和碳二亚胺交联透明质酸底物。

[0011] EP 2 199 308 A1公开透明质酸粉末的交联,透明质酸粉末被分散在包含乙醇的

液体介质中。得到的产物具有控制不好的形状。

[0012] US 2012/0034462 A1在没有实验证据的情况下提出,交联的HA凝胶的薄线(thin strand)可以通过使交联的HA凝胶的固体块通过筛或网状物来产生。

[0013] 尽管本领域中的进展,但依然有对制造具有合适的液体保留能力和降解分布,但具有保留的生物相容性的成形的交联的透明质酸产物的可选择的方法的需要。特别地,合意的是最小化改性度,这被需要以获得具有期望的凝胶强度(例如,其可以作为液体保留能力被测量)的成形的透明质酸凝胶产物。

[0014] 涉及植入物的某些已知的软组织填充治疗(soft tissue augmentation treatment)偶尔遭受植入物或其部分迁移远离期望的治疗部位的缺点。涉及植入物的某些已知的组织填充治疗的另一问题是,植入物从期望的治疗部位移位。植入物迁移和移位对于患者是不利的,因为它们可能削弱治疗的美容结果和/或治疗结果并且可能阻碍植入物的除去,如果这是期望的。高度有益的是将植入物的完整性和位置保持持续期望的时间。为了避免上述问题,需要凝胶具有一定的凝胶强度以便抵抗变形。此性质可以使用流变仪以振荡模式来测量。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的目的是提供用于制造具有期望的形状的交联的透明质酸产物的方法。特定的目的是提供用于制造具有限制产物在植入到受试者中之后迁移的可能性的形状的交联的透明质酸产物的方法。

[0017] 本发明的另一个目的是提供用于制造具有高的生物相容性,即当固定成合意的且有用的形状时保持透明质酸的高的生物相容性的成形的交联的透明质酸产物的方法。

[0018] 为了实现由本说明书证明的这些潜在目标和/或其他目标,已经意识到的是,本发明的潜在目的是提供用于制造具有低改性度至中等改性度而同时具有如通过低的液体保持能力或溶胀度至中等液体保持能力或溶胀度显示的高的凝胶强度的成形的交联的透明质酸产物的方法。

[0019] 本发明的另外的目的是提供用于制造成形的交联的透明质酸产物的方法,其中液体保留能力可以被除了透明质酸的改性度之外的其他参数控制或影响。

[0020] 本发明的目的是提供用于制造成形的交联的透明质酸产物的方法,其中高比例的结合的交联剂以(至少)两端被连接,即以实现高的交联效率。

[0021] 本发明的另外的目的是提供具有低改性度至中等改性度并且同时低的液体保留能力或溶胀度至中等的液体保留能力或溶胀度的成形的交联的透明质酸产物。

[0022] 本发明的目的是提供对变形具有高的抗性的成形的交联的透明质酸产物。

[0023] 对于将由本公开内容证明的这些目的和其他目的,本发明根据第一方面提供用于制造成形的交联的透明质酸产物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0024] (i) 提供溶解在第一液体介质中的没有任何交联的透明质酸底物,所述第一液体介质是水溶液;

[0025] (ii) 通过将透明质酸底物经受第二液体介质使所述透明质酸底物沉淀,所述第二液体介质包含一定量的一种或更多种第一水溶性有机溶剂,给出没有任何交联的透明质酸的沉淀条件;

[0026] 其中步骤(i)和/或步骤(ii)还包括将所述透明质酸底物布置成期望的形状;以及

[0027] (iii)使呈期望的形形的非交联的沉淀的透明质酸底物在第三液体介质中在合适的条件下经受单交联步骤,以获得沉淀的、成形的交联的透明质酸产物,所述第三液体介质具有11.5或更高的pH并且包含一种或更多种多官能交联剂和一定量的一种或更多种第二有机溶剂,给出透明质酸的沉淀条件。

[0028] 已经发现,此方法有利地允许制造具有高度合意的性质的成形的交联的透明质酸产物。此方法提供交联的良好控制,因为交联仅在固相(沉淀相)中发生,并且不在溶解相中和/或方法步骤之间发生。得到的产物是独特的,在于其是具有低的溶胀度的凝胶,尽管透明质酸的低改性度。令人高度惊讶的是,具有有限的溶胀度的凝胶产物完全可以获得为具有这样低的改性度。还令人惊讶的是,具有单交联反应的工艺可以实现具有合意的性质的产物。在许多应用中,此方法允许制造具有在制造过程期间被保留的预先定义的形形的交联的透明质酸产物。方法还允许制造生物相容的成形的交联的透明质酸产物。

[0029] 在特定的实施方案中,前两个步骤(i)和(ii)在不存在交联剂下发生,并且多官能交联剂在第三交联步骤(iii)中添加。这确保交联剂的量被牢牢地控制,因为在先前步骤中例如在沉淀步骤期间,没有交联剂反应或损失。

[0030] 在一个实施方案中,步骤(i)还包括将透明质酸底物溶液以期形的形状布置在疏水表面上;并且步骤(ii)中的成形的透明质酸底物的沉淀发生在所述疏水表面上。这对避免结构的堵塞和保持其形状是有利的。疏水表面优选地选自碳氟化合物、聚丙烯(PP)、改性的聚对苯二甲酸乙二酯(PETG)、聚乙烯(PE)、和聚四氟乙烯(PTFE)。

[0031] 在某些实施方案中,步骤(i)的水溶液包含40-100vol%的水和0-60vol%的低级烷基醇。从而,可以实现缠绕的结构,这对于获得具有期望的性质的凝胶产物很可能是有利的。

[0032] 在特定的实施方案中,步骤(ii)的第二液体介质包含0-30vol%的水和70-100vol%的第一水溶性有机溶剂。在某些实施方案中,步骤(ii)的第二液体介质包含0-10vol%的水和90-100vol%的第一水溶性有机溶剂。高浓度的第一水溶性有机溶剂被认为对于实现迅速沉淀是有利的。从而,可以实现缠绕的结构,这对于获得具有期望的性质的凝胶产物很可能是有利的。

[0033] 在某些实施方案中,步骤(ii)的第一水溶性有机溶剂是一种或更多种低级烷基醇。在某些实施方案中,低级烷基醇是乙醇。这些有机溶剂提供迅速沉淀。

[0034] 步骤(i)和/或步骤(ii)还包括将透明质酸底物布置成期望的形状。术语“成形的”和“期望的形状”意指在最终产物中有用的有意的的设计,即不仅仅是冻干的或沉淀的透明质酸粉末。在某些实施方案中,形状选自由以下组成的组:颗粒、纤维、绳、线、网、膜、圆盘和珠,所述形状在至少一种尺寸上优选地具有至少0.5mm、优选地大于1mm、更优选地大于5mm的延伸度。在某些实施方案中,底物的形状在至少一种尺寸上具有小于5mm、优选地小于1mm的延伸度。这有助于交联剂在随后的交联步骤中接近沉淀的透明质酸产物的高数目的可得结合部位。在某些实施方案中,底物的形状纵向地延伸并且具有5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低、例如25000:1或更低、例如100:1或更低的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率。因为纵向延伸的形状在整个方法中和得到的产物中被保持,所以交联的产物可以被设计为避免或减少体内迁移/移位,但保持容易地可注射的。在特定的实施方案中,形状是纤维并且纤维长度和纤维平均直径之间的比率

是5:1或更高、例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低、例如25000:1或更低、例如100:1或更低。

[0035] 在某些实施方案中,步骤(ii)包括将透明质酸底物挤出到第二液体介质中,所述第二液体介质包含一定量的第一水溶性有机溶剂,给出透明质酸的沉淀条件,从而允许挤出的透明质酸底物在第二液体介质中形成沉淀的纤维。

[0036] 在某些实施方案中,步骤(iii)的第三液体介质包含0-35vol%的水、65-100vol%的第二有机溶剂、和一种或更多种多官能交联剂。在某些实施方案中,步骤(iii)的第二有机溶剂是一种或更多种低级烷基醇。在某些实施方案中,低级烷基醇是乙醇。

[0037] 在特定的实施方案中,步骤(iii)的第三液体介质具有13或更高的pH。已经令人惊讶地意识到的是,在升高的pH下在沉淀的、成形的底物上进行交联提供具有有效交联的成形的凝胶产物,即其中低改性度提供具有低溶胀度的坚固凝胶。

[0038] 在特定的实施方案中,多官能交联剂单独地选自自由二乙烯砜、多环氧化合物和双环氧化合物组成的组。在某些实施方案中,多官能交联剂单独地选自自由1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1,2-乙二醇二缩水甘油醚(EDDE)和二环氧辛烷组成的组。在某些实施方案中,多官能交联剂是1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)。

[0039] 在某些实施方案中,一种或更多种多官能交联剂提供单一类型的交联。在特定的实施方案中,一种或更多种多官能交联剂提供醚交联,醚交联是稳定的。本方法有利地提供单交联的透明质酸凝胶产物,其是稳定的且可以容易地被灭菌,例如高压灭菌。

[0040] 在某些实施方案中,方法还包括以下步骤:

[0041] (iv) 使沉淀的交联的透明质酸产物经受非沉淀条件;以及

[0042] (v) 将呈非沉淀形式的交联的透明质酸产物分离。

[0043] 在某些实施方案中,步骤(v)还包括将交联的透明质酸产物灭菌。

[0044] 根据另一方面,本发明提供成形的交联的透明质酸产物,其具有每1000个二糖单元1-40个交联剂单元的改性度和每g透明质酸4-300mL的溶胀度。此成形的交联的透明质酸产物具有高度有用的性质,包括低改性度至中等改性度和同时低的溶胀度或液体保留能力至中等的溶胀度或液体保留能力的独特组合。从而,可能提供具有期望的形状同时保持天然的透明质酸的生物相容性的坚固的、交联的透明质酸产物。根据本发明的交联的透明质酸产物被设计成预先定义的形状或结构。

[0045] 在某些实施方案中,溶胀度是每g透明质酸15-180mL。

[0046] 改性效率(MoE)是凝胶的最小的HA浓度( $C_{\text{最小}}$ )或刚度/强度和其通过交联剂的化学改性度之间的比率的量度。在特定的实施方案中,改性效率是10或更高。在某些实施方案中,改性效率是在20-190或20-150的范围内。具有10或更高例如在20-190或20-150的范围内的改性效率的产物第一次组合低改性度至中等改性度以及同时低的溶胀度或液体保留能力至中等的溶胀度或液体保留能力。从而,可能提供是生物相容的且对变形具有高的抗性的具有期望形状的坚固的、交联的透明质酸产物。

[0047] 在某些实施方案中,描述已经结合两个(或更多个)二糖的总结合的交联剂的比例的交联剂比是35%或更高。在特定的实施方案中,交联剂比是40%或更高,并且在某些实施方案中甚至50%或更高。这些成形的产物因此具有在产物中不提供有效交联的低数目的交联剂。高的交联剂比允许与低溶胀度至中等溶胀度有关的令人惊讶地低的总改性度,对于

生物相容性有利但对于保持期望的形状充分的组合。

[0048] 在某些实施方案中,成形的透明质酸产物用一种或更多种多官能交联剂来交联,所述多官能交联剂单独地选自由二乙烯砜、多环氧化合物和双环氧化合物组成的组。在某些实施方案中,多官能交联剂单独地选自由1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1,2-乙二醇二缩水甘油醚(EDDE)和二环氧辛烷组成的组。在特定的实施方案中,多官能交联剂是1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)。

[0049] 在某些实施方案中,成形的透明质酸产物是单交联的。单交联的产物具有化学上良好定义的优点。优点是,具有单一类型的交联的成形的产物显示这样的合意的性质。在某些实施方案中,成形的透明质酸产物是多交联的。在特定的实施方案中,成形的透明质酸产物用醚交联来交联。根据本发明的成形的醚交联的透明质酸凝胶产物是稳定的且可以容易地被灭菌,例如高压灭菌。

[0050] 在某些实施方案中,透明质酸产物具有选自由以下组成的组的形状:颗粒、纤维、绳、线、网、膜、圆盘和珠。在某些实施方案中,透明质酸产物是中空的或具有若干层。在某些实施方案中,形状纵向地延伸并且具有5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低例如25000:1或更低、例如100:1或更低的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率。纵向地延伸的交联的产物可以被设计为避免或减少体内迁移/移位,但保持容易地可注射的。在特定的实施方案中,透明质酸产物是纤维并且所述纤维的长度和所述纤维的宽度例如所述纤维的平均直径之间的比率是5:1或更高例如10:1或更高、例如20:1或更高,并且任选地100000:1或更低例如25000:1或更低、例如100:1或更低。

[0051] 在某些实施方案中,成形的透明质酸产物以完全溶胀的状态存在。在完全溶胀的状态中,优选的是产物具有纵向地延伸的形状,并且其最大横向延伸度小于5mm例如小于1.5mm、并且优选地小于0.2mm。具有小于5mm或甚至更低的最大横向延伸度的纵向地延伸的交联的产物是容易地可注射的。在完全溶胀的状态中,此外优选的是产物具有纵向地延伸的形状,并且其纵向延伸度大于2mm,例如大于25mm、例如大于500mm。具有大于2mm或更高的纵向延伸度的纵向地延伸的交联的产物是有利的,因为其避免或减少体内迁移/移位。

[0052] 在其他实施方案中,成形的透明质酸产物以部分溶胀的状态或非溶胀的状态存在。

[0053] 在特定的实施方案中,成形的透明质酸产物是可高压灭菌的。在另外的特定的实施方案中,成形的透明质酸产物是高压灭菌的。

[0054] 制造根据本发明的成形的交联的透明质酸产物的优选的方式中的一种是通过根据本发明的方法。

[0055] 根据又另一方面,本发明提供包含根据本发明的成形的交联的透明质酸产物和任选地缓冲剂的含水组合物。

[0056] 在某些实施方案中,根据本发明的成形的透明质酸产物或根据本发明的含水组合物可用作医学方法或手术方法中的药剂或医学装置。

[0057] 根据另外的方面,本发明提供根据本发明的成形的交联的透明质酸产物或根据本发明的含水组合物在整容手术或医学手术中的用途。换句话说,本发明提供用于整容手术或医学手术中的根据本发明的成形的交联的透明质酸产物或根据本发明的含水组合物。

[0058] 在某些实施方案中,用途是用于整容手术中,整容手术选自皮肤填充和体形塑造

(body contouring)。在某些其他实施方案中,用途是在治疗以下或在选自以下的医疗手术中作为药剂:皮肤填充、体形塑造、组织粘连(tissue adhesion)的预防、通道的形成、失禁治疗、和矫形外科应用。

[0059] 根据一个方面,本发明提供根据本发明的成形的交联的透明质酸产物或根据本发明的含水组合物在药物递送中的用途。以可选择的说法,本发明提供用于药物递送的根据本发明的成形的交联的透明质酸产物或根据本发明的含水组合物。

[0060] 根据又另一方面,本发明提供预填充的注射器,其用根据本发明的灭菌的、成形的交联的透明质酸产物或根据本发明的灭菌的含水组合物来预填充。

[0061] 根据一个方面,本发明提供治疗经历整容手术或医学手术的受试者的方法,包括向需要其的受试者施用根据本发明的成形的交联的透明质酸产物或根据本发明的含水组合物。

[0062] 在某些实施方案中,受试者正经历选自皮肤填充和体形塑造的整容手术。在某些其他实施方案中,受试者正经历针对选自皮肤填充、体形塑造、组织粘连的预防、通道的形成、失禁治疗、和矫形外科应用的状况的医学手术或医学治疗。

[0063] 附图简述

[0064] 图1示出完全溶胀的交联的HA网。

[0065] 图2示出两种酶催化降解的HA凝胶制剂的400MHz  $^1\text{H}$  NMR光谱。

[0066] 图3示出交联的HA凝胶纤维的显微镜图像。

[0067] 图4是示出在60°C下在14天内的储存期间按g/g计的溶胀度(SwD)的变化的图。

[0068] 图5示出交联的HA粉末(比较实施例)和根据本发明的产物的显微镜图像。

[0069] 图6示出交联的HA凝胶纤维的显微镜图像。

[0070] 图7示出交联的HA凝胶在通过网筛之后(比较实施例)的显微镜图像。

[0071] 发明详述

[0072] 根据一个方面,本发明提供了制造方法。该方法用于从透明质酸底物制造成形的交联的透明质酸产物。

[0073] 除非另外提供,否则术语“透明质酸”包括各种链长度和电荷状态以及具有各种化学改性的透明质酸(hyaluronic acid)或透明质酸(hyaluronan)的全部变体和变体的组合。即,该术语还包括透明质酸的各种透明质酸盐,例如透明质酸钠。透明质酸的各种改性还被以下术语所包括:例如氧化比如 $\text{CH}_2\text{OH}$ 基团至 $\text{COOH}$ 的氧化;邻近的羟基的高碘酸氧化,任选地随后还原或亚胺形成等等;还原例如 $\text{COOH}$ 至 $\text{CH}_2\text{OH}$ 的还原;硫化;脱酰胺,任选地随后脱酰胺或用新的酸形成酰胺;酯化;用各种化合物取代,例如使用交联剂或碳二亚胺;包括不同分子例如蛋白质、肽和活性药物组分与透明质酸的偶联;以及脱乙酰化。对技术人员熟知的是,透明质酸的各种形式具有在化学改性和分析期间必须被考虑在内的不同的化学性质。例如,如果期望获得具有某种pH的透明质酸的溶液,那么被溶解的材料酸度、溶解液体的酸度和任何缓冲容量将全部影响溶液的得到的pH。

[0074] 优选的是,透明质酸底物是没有化学改性的透明质酸或透明质酸盐,即所述透明质酸底物在本制造方法之前没有经受交联或其他改性。

[0075] 透明质酸可以从各种动物来源和非动物来源获得。非动物来源的来源包括酵母并且优选地细菌。单个透明质酸分子的分子量通常是在1.5-3MDa的范围内,但其他范围的分子

量是可能的,例如0.5-10MDa。

[0076] 通过该方法制造的产物是成形的交联的透明质酸。当透明质酸链已经被布置成合意的形状时,该方法在透明质酸链之间提供交联,这产生透明质酸分子的连续形状的网络,所述透明质酸分子通过共价交联、透明质酸链的物理缠绕和各种相互作用例如氢键结合、范德华力和静电相互作用来保持在一起。根据本发明的成形的交联的透明质酸产物是凝胶、或水凝胶。即,其可以被认为是不溶于水的,但当经受液体通常含水液体时是透明质酸分子的大体上稀释的交联的系统。

[0077] 得到的成形的交联的透明质酸产物优选地是生物相容的。这意味着在被治疗的个体中没有或仅有非常温和的免疫响应发生。在实施例中,提供确定透明质酸产物的生物相容性的方法,并且起因于在大鼠中测试根据本发明的交联的透明质酸产物的生物相容性。

[0078] 根据本发明的方法包括至少三个步骤:制备步骤、沉淀步骤、和交联步骤。在某些实施方案中,方法由这三个步骤组成。

[0079] 在第一方法步骤中,提供透明质酸底物。如上文所陈述的,术语“透明质酸底物”包括各种链长度和电荷状态以及具有各种化学改性的透明质酸(hyaluronic acid)或透明质酸(hyaluronan)的全部变体和变体的组合。优选的是,透明质酸底物是化学未改性的透明质酸或透明质酸盐,优选地透明质酸钠,所述透明质酸底物具有在0.5-10MDa的范围内、优选地0.8-5MDa、更优选地1.5-3MDa或2-3MDa的平均分子量。优选的是,透明质酸从非动物源、优选地细菌来获得。

[0080] 透明质酸底物被溶解在第一液体介质中,第一液体介质是水溶液。将术语“溶解的”和“溶液”理解为,透明质酸底物与液体以均匀的混合物存在,其中混合物能量上有利的相互作用发生。将液体添加至溶液降低溶解的透明质酸底物的浓度。溶液是含水的,即其包含水。水溶液可以简单地由溶解在水中的透明质酸底物组成。优选的是,水溶液包含40-100vol%的水和0-60vol%的低级烷基醇。术语“低级烷基醇”包括具有从一个至六个碳原子的伯烷基醇、仲烷基醇和叔烷基醇,即C<sub>1-6</sub>烷基醇。低级烷基醇的具体的实例包括甲醇、乙醇、变性酒精、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、和叔丁醇。由于价格、可得性和容易处理,优选的低级烷基醇是甲醇和乙醇,特别是乙醇。随着水组分的相应的调整,低级烷基醇浓度优选地是在0-40%例如0-20%、10-30%、或20-40%的乙醇的范围内。此水溶液的pH合适地是6或更高,例如9或更高。

[0081] 任选地,第一方法步骤还包括将透明质酸底物布置成期望的形状,例如,颗粒、纤维、绳、线、网、膜、圆盘和珠,其任选地是中空的或包含不同的材料层。这可以以各种方式来完成,例如模制和挤出。透明质酸底物的挤出通常包括将透明质酸底物溶液按压通过期望大小的开口。挤出的透明质酸底物自发地形成沉淀的纤维、绳或线。纤维、绳或线的尺寸例如厚度可以通过改变开口的尺寸或类型例如使用在0.1-2mm或14-30G的范围内的各种开口直径、挤出压力、挤出速度和/或透明质酸浓度来控制。通过使用其他类型的孔口和裂口,可以产生不同的形状或结构。例如,透明质酸可以被沉淀为膜、网、圆盘或珠。

[0082] 在优选的实施方案中,透明质酸底物溶液以期望的形状布置在疏水表面上,并且成形的透明质酸底物的随后沉淀发生在所述疏水表面上。这对于避免成形的结构的堵塞和对于保持期望的形状直到其通过随后的交联步骤被固定是有利的。合适的疏水表面对技术人员是熟知的并且包括例如碳氟化合物、聚丙烯(PP)、改性的聚对苯二甲酸乙二酯(PETG)、

聚乙烯 (PE)、和聚四氟乙烯 (PTFE)。

[0083] 此形状可以在整个制造方法中和在最终产物中被保持。优选的是,当透明质酸底物呈沉淀的形式时,形状在至少一种尺寸上具有小于5mm、优选地小于1mm例如小于0.5mm或甚至小于0.2mm的延伸度。这有助于交联剂在随后的交联步骤中接近沉淀的透明质酸产物的高数目的可得的结合部位。还优选的是,形状纵向地延伸并且具有5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低例如25000:1或更低、例如100:1或更低的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率。因为纵向延伸的形状在整个方法中和在得到的产物中被保持,所以交联的产物可以被设计为避免或减少体内迁移/移位,但保持容易地可注射的。这样的形状的合适的实例是纤维并且所述纤维的长度和所述纤维的宽度之间的比率是5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低例如25000:1或更低、例如100:1或更低。优选的组合物包含根据本发明的交联的线状/纤维状的透明质酸产物,其中大于50%的产物具有5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低、例如25000:1或更低、例如100:1或更低的产物纵向延伸度和产物最大横向延伸度之间的比率。

[0084] 通过实例的方式,具有填满20mL注射器的单个线状或纤维状的根据本发明的交联的透明质酸产物在溶胀状态下可以具有1mm的厚度和25m的长度,即25000:1的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率。优选的组合物的实例包括根据本发明的交联的线状/纤维状的透明质酸产物,其中大于50%的产物具有大于2mm的纵向延伸度和小于0.2mm的最大横向延伸度,即10:1或更高的比率。

[0085] 第一方法步骤在没有交联下进行,并且这可以通过在此步骤中省略交联剂和/或提供不适合于交联的条件来实现。重要的是确保交联不发生直到已经达到优选的形状。这对于获得和保持最终产物的期望形状是有利的,因为底物的成形不被预先存在的交联限制,并且在第三步骤中产生的全部交联涉及保持产物的期望的形状。优选的是第一步骤在不存在交联剂下发生。这提供交联在溶解相中和/或在方法步骤之间不发生的良好控制。还确保的是,交联剂的量被紧紧地控制并且得到的产物在质量上是均匀的,因为在先前步骤中没有交联剂反应或损失。避免在此步骤中交联并且特别是添加交联剂对获得适合于放大至工业规模的制造工艺是有用的并且可用于提供具有均匀质量的产物。

[0086] 在第二方法步骤中,透明质酸底物由于透明质酸底物的溶解度的降低而沉淀。这通过使透明质酸底物经受第二液体介质来实现,透明质酸底物在第二液体介质中是不溶的。第二液体介质包含定量的一种或更多种第一水溶性有机溶剂,给出透明质酸的沉淀条件。得到的固体沉淀物从溶质相掉落下来并且通常可以通过过滤、倾析、离心、或手动地使用一对镊子或类似物从剩余的液体中分离。在一个优选的实施方案中,沉淀的透明质酸底物还从介质中除去并且干燥。沉淀物还可以保持悬浮在第二液体介质中。因此,在另一个优选的实施方案中,沉淀的透明质酸底物不经受干燥。有利的是以迅速的方式例如通过将透明质酸底物挤出或浸没在透明质酸底物在其中不溶的第二液体介质中来实现透明质酸底物的沉淀。

[0087] 根据本发明所使用的有机溶剂是含碳溶剂并且可以呈现不同的极性度。尽管被称为“溶剂”,但将理解的是,这些有机溶剂被用于在制造方法期间平衡和改变透明质酸的溶解度。透明质酸可以以某种有机溶剂浓度区间很好地溶解在有机溶剂中,但当有机溶剂浓

度增加时掉落并且形成沉淀物。例如,透明质酸可以溶解在有机溶剂例如低级烷基醇和水的50/50(vol/vol)混合物中,但在90/10(vol/vol)混合物中掉落并且形成沉淀物。当经受非沉淀条件例如50/50或0/100混合物时,透明质酸返回至非沉淀的、溶解的状态。技术人员很好地意识到,其他因素可以用于沉淀透明质酸的限制性的有机溶剂浓度具有影响,例如温度、pH、离子强度和有机溶剂的类型。在给定的条件下用于沉淀透明质酸的限制性的浓度是本领域技术人员熟知的或可以被本领域技术人员容易地确定。通过实例的方式,用于沉淀透明质酸的限制性的浓度(在水和乙醇的混合物中)是大约70%的乙醇。

[0088] 不被其所限制,根据本发明的有机溶剂可以选自由以下组成的组:戊烷、己烷、环己烷、1,4-二氧六环、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙酸乙酯、乙酰胺、二乙基醚、四氢呋喃、乙腈、甲基乙基酮、丙酮、低级烷基醇例如甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇和丁醇。优选的是,根据本发明的有机溶剂是水溶性的。有机溶剂的优选的组是低级烷基醇。术语低级烷基醇包括具有从一个至六个碳原子的伯烷基醇、仲烷基醇和叔烷基醇,即C<sub>1-6</sub>烷基醇。低级烷基醇的具体的实例包括甲醇、乙醇、变性酒精、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、和叔丁醇。由于价格、可得性和容易处理,优选的低级烷基醇是甲醇和乙醇,特别是乙醇。

[0089] 合适的是,第二方法步骤的第二液体介质是含水介质,即其包含某种程度的水。优选的是,第二液体介质包含0-30vol%的水和70-100vol%的第一水溶性有机溶剂,优选地0-10vol%的水和90-100vol%的第一水溶性有机溶剂。在某些实施方案中,第一水溶性有机溶剂的浓度可以是至多95%,例如99%或甚至99.5%,例如99%的甲醇或乙醇。高浓度的第一水溶性有机溶剂被认为对于实现迅速沉淀是有利的。从而,可以实现缠绕的结构,这对于获得具有期望的性质的凝胶产物很可能是有利的。

[0090] 第二方法步骤在没有交联下进行,并且这可以通过在此步骤中省略交联剂和/或提供不适合于交联的条件来实现。重要的是确保交联不发生直到已经达到优选的形状。这对于获得和保持最终产物的期望形状是有利的,因为底物的成形不被预先存在的交联限制,并且在第三步骤中产生的全部交联涉及保持产物的期望的形状。优选的是,第二步骤在不存在交联剂下发生。这提供交联在溶解相中和/或在方法步骤之间不发生的良好控制。还确保的是,交联剂的量被紧紧地控制并且得到的产物在质量上是均匀的,因为在先前步骤中没有交联剂反应或损失。避免在此步骤中交联并且特别是添加交联剂对获得适合于放大至工业规模的制造工艺是有用的并且可用于提供具有均匀质量的产物。

[0091] 任选地,第二方法步骤还包括将透明质酸底物布置成期望的形状,例如,颗粒、纤维、绳、线、网、膜、圆盘和珠,所述期望的形状任选地是中空的或包含不同的材料层。这可以以各种方式来完成,例如模制和挤出。此形状可以在整个制造方法中和在最终产物中被保持。优选的是,当透明质酸底物呈沉淀的形式时,沉淀的底物的形状在至少一种尺寸上具有小于5mm、优选地小于1mm例如小于0.5mm或甚至小于0.2mm的延伸度。这有助于交联剂在随后的交联步骤中接近沉淀的透明质酸产物的高数目的可得的结合部位。还优选的是,沉淀的底物的形状纵向地延伸并且具有5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低例如25000:1或更低、例如100:1或更低的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率。因为纵向延伸的形状在整个方法中和在得到的产物中被保持,所以交联的产物可以被设计为避免或减少体内迁移/移位,但保持容易地可注射的。这样的形状的合适的实例是纤维并且所述纤维的长度和所述纤维的宽度之间的比率是5:1或更高,例如10:

1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低、例如25000:1或更低、例如100:1或更低。通过实例的方式,具有填满20mL注射器的单个线状或纤维状的根据本发明的交联的透明质酸产物在溶胀状态下可以具有1mm的厚度和25m的长度,即25000:1的产物纵向延伸度和产物最大横向延伸度之间的比率。

[0092] 第二方法步骤可以包括将透明质酸底物挤出到第二液体介质中,所述第二液体介质包含一定量的第一水溶性有机溶剂,给出透明质酸的沉淀条件。这通常包括将透明质酸底物溶液按压通过期望大小的开口进入第二液体介质中。挤出的透明质酸底物在第二液体介质中自发地形成沉淀的纤维、绳或线。纤维、绳或线的尺寸例如厚度可以通过改变开口的尺寸或类型例如使用在0.1-2mm或14-30G的范围内的各种开口直径、挤出压力、挤出速度和/或透明质酸浓度来控制。通过使用其他类型的孔口和裂口,可以产生不同的形状或结构。例如,透明质酸可以被沉淀为膜、网、圆盘或珠。当形成纤维、绳或线时,优选的是其长度和其平均直径之间的比率是5:1或更高,例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低,例如25000:1或更低、例如100:1或更低。纤维形状/绳形状/线形状的优势是,纤维/绳/线自身可以在宏观水平下被缠绕,引起线圈效应或球效应,例如,这对于保持植入物的完整性可以是有利的。

[0093] 在第三方法步骤中,沉淀的透明质酸底物首先在第三液体介质中经受交联。术语“交联”指的是在(至少)两个不同的透明质酸链或单个透明质酸链的(至少)两个不同部位之间引入稳定的共价连接(交联),这产生透明质酸分子的连续的网络。交联可以简单地是透明质酸链中两个原子之间的共价键,例如两个羟基之间的醚键,或羟基和羧基之间的酯键。交联还可以是共价地结合至不同透明质酸链的两个或更多个原子或单个透明质酸链的不同部位的连接剂分子。尽管交联可以在某些条件下自发地发生,但交联通常包括一种或更多种交联剂的使用,其有助于且加速工艺。当交联完成时,交联剂可以完全地或部分地连接至透明质酸或其可以被降解。未结合的交联剂的任何剩余的残留物可以在交联之后被除去。

[0094] 重要的是确保交联不发生直到已经达到优选的形状。这对于获得和保持最终产物的期望形状是有利的,因为底物的成形不被预先存在的交联限制,并且在第三步骤中产生的全部交联涉及保持产物的期望的形状。优选的是,前两个步骤在不存在交联剂下发生,并且交联剂在第三交联步骤中添加。这提供交联的良好控制,因为其仅在固相(沉淀相)中发生,并且不在溶解相中和/或方法步骤之间发生。还确保的是,交联剂的量被紧紧地控制并且得到的产物在质量上是均匀的,因为在先前步骤中例如在沉淀步骤期间没有交联反应或损失。总而言之,关注交联并且特别是将交联剂添加至最终步骤对获得适合于放大至工业规模的制造工艺是有用的并且可用于提供具有均匀的产物。

[0095] 第三液体介质包含一种或更多种交联剂,其是多官能的,即,其具有用于与正在被交联的透明质酸分子形成共价键的两个或更多个反应部位。优选的是,在此第三步骤中使用的交联剂是双官能的,即其具有用于与正在被交联的透明质酸分子形成共价键的两个反应部位。不局限于此,有用的多官能交联剂包括二乙烯砜、多环氧化合物和二环氧化合物,例如1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1,2-乙二醇二缩水甘油醚(EDDE)和二环氧辛烷,优选地BDDE。合意的是,一种或更多种多官能交联剂提供醚交联。本方法有利地提供醚交联的透明质酸凝胶产物,其是稳定的且可以被容易地灭菌例如高压灭菌。酯交联较不稳定并且

将更容易水解。

[0096] 在沉淀条件下进行第三方法步骤的交联,使得成形的透明质酸底物被沉淀。特别地,透明质酸分子的可得表面由于沉淀条件而呈沉淀形式。第三液体介质包含一定量的或更多种第二有机溶剂,给出透明质酸的沉淀条件,所述量和/或有机溶剂可以是与在第二方法步骤的第二液体介质中用于沉淀成形的透明质酸底物所使用的量和/或有机溶剂相同的或不同的。

[0097] 如上文所详述的,将理解的是,有机溶剂用于在制造方法期间平衡和改变透明质酸的溶解度。技术人员很好地意识到,其他因素可以对用于沉淀透明质酸的限制性的有机溶剂浓度具有影响,例如温度、pH、离子强度和有机溶剂的类型。在给定的条件下用于沉淀透明质酸的限制性的浓度是本领域技术人员熟知的或可以被本领域技术人员容易地确定。

[0098] 使用此方法,还可能在第三方法步骤中用单一交联反应获得成形的交联的透明质酸产物。取决于单一反应步骤中的交联剂的选择和数目,得到的成形的产物可以是单交联的,即基本上包含单一类型的交联、优选地稳定的醚交联,或多交联的,即包含至少两种不同类型的交联、优选地包括稳定的酯交联。令人惊讶的是,具有单一交联反应的工艺可以实现具有这样的合意的性质的成形产物。

[0099] 不受限于此,根据本发明的有机溶剂可以选自由以下组成的组:戊烷、己烷、环己烷、1,4-二氧六环、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙酸乙酯、乙酰胺、二乙基醚、四氢呋喃、乙腈、甲基乙基酮、丙酮、低级烷基醇,例如甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇和丁醇。优选的是,根据本发明的有机溶剂是水溶性的。有机溶剂的优选的组是低级烷基醇。术语低级烷基醇包括具有从一个至六个碳原子的伯烷基醇、仲烷基醇和叔烷基醇,即C<sub>1-6</sub>烷基醇。低级烷基醇的具体的实例包括甲醇、乙醇、变性酒精、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、和叔丁醇。由于价格、可得性和容易处理,优选的低级烷基醇是甲醇和乙醇,特别是乙醇。

[0100] 合适的是,第三方法步骤的第三液体介质是含水介质,即第三液体介质包含某种程度的水。优选的是除了交联剂,第三液体介质包含0-35vol%的水和65-100vol%的第二水溶性有机溶剂,优选地20-35vol%的水和65-80vol%的第二水溶性有机溶剂。

[0101] 第三液体介质具有11.5或更高的pH,即交联在11.5或更高的pH下进行。如技术人员很好地意识到,透明质酸起始物料的酸度必须被考虑在内以在第三液体介质中获得期望的pH。这可以通过添加酸、碱或具有合适的缓冲容量的缓冲体系来完成。优选的pH调节剂是强碱,例如氢氧化钠。已经发现的是,当使沉淀的透明质酸分子交联时,碱性pH是有利的。优选的是,第三步骤的第三液体介质具有13或更高的pH。在包含水和有机溶剂两者的液体介质中,测量的pH由于溶剂的类型和相应的溶剂的量可以与理论pH不同。因此,引入术语表观pH(pH<sub>表观</sub>)以指示在给定的条件下使用标准pH测量设备测量的pH。精确的pH值可以通过例如滴定来容易地确定。

[0102] 在第三方法步骤中的交联产生根据本发明的成形的交联的透明质酸产物。根据本发明的成形的交联的透明质酸产物是凝胶、或水凝胶。即,成形的交联的透明质酸产物可以被认为是不溶于水的,但当经受液体、通常含水液体时是透明质酸分子的大体上稀释的交联的系统。因为在沉淀条件下进行第三方法步骤的交联,所以成形的透明质酸底物和成形的交联的产物两者被沉淀。特别地,成形的透明质酸底物和成形的交联的产物两者的可得表面由于此第三方法步骤的沉淀条件而呈沉淀的形式。允许交联反应在合适的条件下进

行直到期望的量的交联剂已经与成形的透明质酸底物反应。已经结合至透明质酸的交联剂的量可以被定量并且被报道为改性度 (MoD), 即结合的交联剂的摩尔量相对于重复的HA二糖单元的总数目。优选的是, 允许交联反应进行, 直到交联的透明质酸产物的改性度 (MoD) 是在每1000个二糖单元1-40个交联剂单元 (0.1-4%)、优选地每1000个二糖单元1-10个交联剂单元 (0.1-1%) 的范围内。需要的反应时间通过若干因素来控制, 例如透明质酸浓度、交联剂浓度、温度、pH、离子强度和有机溶剂的类型。这些因素全部是本领域技术人员熟知的, 本领域技术人员可以容易地调整这些以及其他相关因素并且从而提供合适的条件以获得在0.1-4%的范围内的改性度并且证实相对于改性度的得到的产物特征。第三步骤的交联发生持续至少2h, 优选地在室温下持续至少24h。

[0103] 任何残留的未结合的交联剂可以在成形的沉淀的产物从交联介质中分离时被除去。成形的交联的透明质酸产物可以通过用合适的洗涤液体例如水、甲醇、乙醇、盐水或其混合物和/或其组合进行另外的洗涤步骤来进一步纯化。

[0104] 根据本发明的制造方法因此允许产生交联的透明质酸产物的预先定义的物理形式或结构, 例如颗粒、纤维、绳、线、网、膜、圆盘或珠。纵向地延伸或杆状的并且具有5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低例如25000:1或更低、比如100:1或更低的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率的特别可用作医学植入物或美容植入物, 因为所述结构可以被定尺寸以通过具有足够的长度来避免迁移, 并且同时可以由于有限的宽度通过由针注射而容易地施用。通过实例的方式, 具有填满20mL注射器的单个线状或纤维状的根据本发明的交联的透明质酸产物在溶胀状态下可以具有1mm的厚度和25m的长度, 即25000:1的产物纵向延伸度和产物最大横向延伸度之间的比率。

[0105] 预先定义的结构可以任选地是中空的或由多层组成。在中空的预先定义的结构中产生的空间任选地用HA来填充, HA可以是改性的, 例如被其他化合物交联或取代。呈预先定义的层结构的多层中的一个或更多个可以由交联的或非交联的HA组成, 交联的或非交联的HA可以通过用其他化合物取代来化学地改性。这可以通过在第一方法步骤中将透明质酸底物布置成期望的形状例如通过挤出或模制、或在第二方法步骤中例如通过将溶解的透明质酸底物挤出到沉淀介质例如乙醇中来完成。获得的形状可以在整个制造方法中和在最终产物中被保持。

[0106] 任选地, 制造方法还包括使成形的沉淀的交联的透明质酸产物经受非沉淀条件的第四步骤。即, 在某些实施方案中, 方法包括四个步骤, 或可选择地由四个步骤组成。这通常包括使成形的交联的透明质酸产物经受液体介质并且允许其返回至非沉淀的状态。液体介质通常是水、盐水或其混合物和/或其组合, 任选地具有有机溶剂例如甲醇或乙醇的非沉淀浓度。由于交联, 得到的成形的透明质酸产物是在非沉淀条件下吸收液体 (溶胀) 并且形成凝胶的互相连接的且缠绕的透明质酸链的连续的网络。可以允许溶胀进行直到凝胶被完全溶胀并且没有另外的液体可以被吸收, 或可以在较早的阶段中断以获得部分溶胀的凝胶。部分溶胀的凝胶可以被用作于凝胶的进一步加工的中间体, 例如可以进行期望的大小和形状的凝胶结构的进一步的机械产生。通过实例的方式, 膜可以被切割成颗粒、薄片或切片, 凝胶纤维可以被切割成较短的片段, 定义良好的不规则的形状可以从膜等来设计。交联的HA纤维、绳或线还可以被编织在一起以在完成的交联之后、在干燥之前或之后形成网或膜。还可能是便利的是, 在期望的部位处在其植入期间使用部分地溶胀的成形的凝胶产物,

以有助于施用和最小化患者的不适并且以通过使用剩余的溶胀能力来提高承载能力 (lifting capacity)。

[0107] 当成形的凝胶产物在过多的液体中经受非沉淀条件时,还可能的是确定其最大溶胀度,或相反地其最小透明质酸浓度 ( $C_{\text{最小}}$ ),即当凝胶产物完全溶胀时的透明质酸浓度。使用根据本发明的制造方法,可能获得每g透明质酸4-300mL、并且优选地每g透明质酸15-180mL的溶胀度。这意味着 $C_{\text{最小}}$ 值在对应于3-250mg/g、优选地6-70mg/g的0.3-25% (w/v)、优选地0.6-7% (w/v) 的范围内。高度有利的是,期望的溶胀度(或 $C_{\text{最小}}$ 值)可以用最小改性度来实现,但调节溶胀度的传统的方式是借助于改变改性度。本制造方法因此提供用于调节成形的凝胶产物的溶胀能力的新概念,其令人惊讶地使得能够产生具有与凝胶的低改性度有关的独特高的 $C_{\text{最小}}$ 值(低溶胀度)的坚固的成形的凝胶。

[0108] 改性效率(MoE)是凝胶的最小的HA浓度 ( $C_{\text{最小}}$ ) 或刚度/强度和其通过交联剂的化学改性度之间的比率的量度。使用根据本发明的制造方法,可能获得具有10或更高、优选地在10-200、例如20-150或20-190的范围内的改性效率的交联的透明质酸产物。不期望受限于任何特定的理论,考虑的是,凝胶的有益的性质是令人惊讶地高程度的有效交联与用于期望目的的交联的有效定位和可能地极其高程度的保留的缠绕组合的结果,所述高程度的有效交联即高程度的结合的交联剂(交联剂比,通常0.35或35%或更高,例如40%或更高或甚至50%或更高)事实上在两个(或更多个)部位处结合至透明质酸。与技术人员将从得到的透明质酸产物的低改性度期待的相比,根据本发明的方法令人惊讶地提供具有高的刚度/强度的凝胶。在任何情况下,根据本发明的方法提供进一步调节与改性度有关的溶胀度的有用的方式。方法还非常适合于连续操作,这对于大规模生产是有利的。

[0109] 任选地,制造方法还包括将交联的透明质酸产物分离的最终步骤。即,在某些实施方案中,方法包括四个或五个步骤,或可选择地由四个或五个步骤组成。取决于产物是否在沉淀条件下被保持或是否已经经受非沉淀条件,此步骤可以包括分离呈沉淀的形式或呈非沉淀的形式的产物。然后,可以使分离的、沉淀的或非沉淀的产物经受灭菌以便获得无菌交联的透明质酸产物。

[0110] 如果需要,其他物质例如局部麻醉药(例如,利多卡因盐酸盐)、抗炎药物、抗生素和其他合适的支持性药剂例如骨生长因子或细胞,可以在交联的透明质酸产物已经获得之后来添加。

[0111] 根据一个方面,本发明提供成形的交联的透明质酸产物。根据一个实施方案,产物通过本发明的制造方法被制造,或可以被制造。根据本发明的成形的交联的透明质酸产物是凝胶、或水凝胶。即,其可以被认为是不溶于水的,但当经受液体通常含水液体时是透明质酸分子的大体上稀释的交联的系统。凝胶按重量计大部分是液体并且可以例如包含90-99.9%的水,但凝胶由于在液体内的三维交联的透明质酸网络而表现得像固体。由于其大量的液体含量,成形的凝胶在结构上是柔韧的并且类似于天然组织,这使得它在组织工程学中作为支架和对于组织填充是非常有用的。交联和其在透明质酸分子的附接位置与透明质酸链的天然缠绕一起给予凝胶其结构和性质,其结构和性质与其溶胀度密切相关。

[0112] 附接的交联剂的量可以通过改性度(MoD)来定量且被报道为改性度(MoD),即结合的交联剂的摩尔量相对于重复的HA二糖单元的总数目。优选的是,根据本发明的交联的透明质酸产物具有每1000个二糖单元1-40个交联剂单元(0.1-4%)、优选地每1000个二糖单

元1-10个交联剂单元(0.1-1%)的改性度。交联反应的效力通过附接的交联剂的量示出,附接的交联剂在(至少)两端中连接至一个(或更多个)透明质酸链并且被报道为交联剂比(CrR)。优选的是,根据本发明的产物具有35%或更高、优选地40%或更高、更优选地40%或更高例如在35-80%、40-80%和50-80%的范围内的交联剂比。这些产物因此具有在产物中不提供有效交联的低数目的交联剂。高的交联剂比允许与凝胶强度有关的令人惊讶地低的总改性度,这对确保高的生物相容性又是有利的。

[0113] 凝胶的另一个特性是其吸收水直到其被完全溶胀的能力。另外添加液体将不进一步稀释凝胶,即凝胶不可以被无限地稀释成如没有分子的溶液。当凝胶经受非沉淀条件时,还可能的是确定其溶胀度,或相反地其最小浓度( $C_{\text{最小}}$ ),即当凝胶产物被完全溶胀时的透明质酸浓度。较硬的(低溶胀)凝胶通常是较不粘性的、更有弹性并且预计具有比较软的(高溶胀)凝胶长的体内半衰期。然而,如果较硬的凝胶是高度化学改性的,则其可以被身体识别为外来材料。优选的是,根据本发明的产物具有每g透明质酸4-300mL、并且优选地每g透明质酸15-180mL的溶胀度。这意味着 $C_{\text{最小}}$ 值在0.3-25% (w/w) 即3-250mg/g、例如0.6-7% (w/w) 即6-70mg/g的范围内。优选的是, $C_{\text{最小}}$ 值是0.6-5% (w/v), 即6-50mg/mL。

[0114] 优选的是,根据本发明的成形的交联的透明质酸产物用多官能的一种或更多种交联剂来交联,即,其具有用于与正在被交联的透明质酸分子形成共价键的两个或更多个反应部位。优选的是,交联剂是双官能的,即其具有用于与正在被交联的透明质酸分子形成共价键的两个反应部位。不限于此,有用的多官能交联剂包括二乙烯砜、多环氧化合物和双环氧化合物,例如1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1,2-乙二醇二缩水甘油醚(EDDE)和二环氧辛烷,优选地BDDE。合意的是,透明质酸凝胶产物用醚交联来交联,醚交联是稳定的。

[0115] 成形的透明质酸凝胶产物可以是多交联的,即包含至少两种不同类型的键,优选地包括醚键。优选的是,透明质酸产物是单交联的,即基本上包含单一类型的交联,优选地醚交联。单交联的产物具有化学上定义良好的优点。优点是,具有单一类型的交联的产物显示这样的合意的性质。在特定的实施方案中,透明质酸产物用醚交联来交联,这提供稳定的和可高压灭菌的产物。

[0116] 尽管调节溶胀度的传统的方式是借助于改变改性度,但高度有利的是,成形的产物的期望的溶胀度(或 $C_{\text{最小}}$ 值)用最小的改性度来获得。最小化改性度的主要原因是确保凝胶的生物相容性是高的,但技术人员很好地意识到其他优点。成形的产物的特征在于与凝胶的改性度有关的独特地高的 $C_{\text{最小}}$ 值(低溶胀度)。改性效率(MoE)是最小HA浓度( $C_{\text{最小}}$ ) (反映凝胶的刚度和强度)和具有交联剂的凝胶的化学改性度之间的比率的量度。根据本发明的成形的交联的透明质酸产物具有10或更高、优选地在10-200的范围内、例如在20-150或20-190的范围内的改性效率。具有10或更高、例如在20-190的范围内的改性效率的产物第一次组合低改性度至中等改性度和同时低的溶胀度或液体保留能力至中等的溶胀度或液体保留能力。从而,可能提供生物相容且对变形具有高的抗性的坚固的、交联的透明质酸产物。

[0117] 此外,优选的是,根据本发明的成形的交联的透明质酸凝胶产物是粘弹性的。这意味着凝胶产物呈现粘性性质和弹性性质的组合。如技术人员熟知的,粘弹性性质可以用流变仪来确定。在振荡模式中,弹性模量( $G'$ )和粘性模量( $G''$ )可以在0.1Hz或1Hz的频率下来确定。对于根据本发明的某些粘弹性凝胶产物,优选的是满足以下关系:

$$[0118] \quad 0.1 \leq \frac{G'}{(G''+G')} \leq 0.98 \quad \text{优选地} \quad 0.5 \leq \frac{G'}{(G''+G')} \leq 0.98$$

[0119] 根据本发明的产物被制造成预先定义的物理形式或结构,例如颗粒、纤维、绳、线、网、膜、圆盘或珠,所述预先定义的物理形式或结构任选地是中空的或由不同的透明质酸材料层组成。纵向地延伸或杆状的并且具有5:1或更高例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低例如25000:1或更低、比如100:1或更低的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率的特别可用作医学植入物或美容植入物,因为所述结构可以被定尺寸以通过具有足够的长度来避免迁移,并且同时可以由于有限的宽度通过由针注射而容易施用。当形成纤维、绳或线时,优选的是,其长度和其宽度或其平均直径之间的比率是5:1或更高,例如10:1或更高、比如20:1或更高、并且任选地100000:1或更低、例如25000:1或更低、例如100:1或更低。通过实例的方式,具有填满20mL注射器的单个线状或纤维状的根据本发明的交联的透明质酸产物在溶胀状态下可以具有1mm的厚度和25m的长度,即25000:1的其纵向延伸度和其最大横向延伸度之间的比率。优选的绳厚度区间是50-200 $\mu$ m。

[0120] 凝胶产物可以被设计为包含人类细胞、药物或其它物质的中空容器。根据本发明的一个实施方案,交联的HA凝胶产物可以被用作药物递送装置并且在药物递送的方法中使用。根据本发明的实施方案,交联的HA凝胶产物可以与非交联的HA或具有不同的改性度或交联度的交联的HA组合。例如,交联的凝胶产物可以以期望的容器形状来产生。容器可以形成用于非交联的HA或具有不同的、例如较低的改性度的交联的HA的储液器,其然后可以缓慢地释放或保持包含,用于调节得到的组合产物的总强度的目的。

[0121] 由于交联,成形的透明质酸产物是在非沉淀条件下吸收液体(溶胀)并且形成凝胶的互相连接的且缠绕的透明质酸链的连续的网络。可以允许溶胀进行直到凝胶被完全溶胀并且没有另外的液体可以被吸收。因此,成形的交联的透明质酸产物可以以完全溶胀的状态来提供。溶胀还可以在较早阶段被中断以获得部分溶胀的凝胶。部分溶胀的凝胶可以可用作用于凝胶的进一步加工的中间体,例如期望的大小和形状的凝胶结构或凝胶片的产生。还可能是便利的是,在其植入期间在期望的部位处使用部分溶胀的凝胶以有助于施用和最小化患者的不适。根据本发明的成形的交联的透明质酸产物因此还可以以部分溶胀或非溶胀的状态来提供。

[0122] 根据本发明的成形的交联的透明质酸产物可用于整容手术或医学手术。整容手术的非限制性实例是皮肤填充和体形塑造。医学手术的非限制性实例是皮肤填充、体形塑造、组织粘连的预防、矫形外科应用、失禁治疗、膀胱输尿管反流(VUR)的治疗、以及用于消退目的(drainage purpose)例如眼科学中和用于保持组织分开的通道的形成。根据本发明的成形的交联的透明质酸产物还可用于药物递送。此外,其可以被用作术后(腹膜内(interperitoneal))粘连的膜和用于臀部以及关节治疗。

[0123] 根据一个方面,本发明提供治疗经历整容手术或医学手术的受试者的方法,包括向需要其的受试者施用根据本发明的成形的交联的透明质酸产物。医学手术的非限制性实例是皮肤填充、体形塑造、组织粘连的预防、矫形外科应用例如臀部和关节治疗、以及用于消退目的例如眼科学中和用于保持组织分开的通道的形成。

[0124] 根据本发明的一个实施方案,成形的交联的透明质酸凝胶产物可以在经受生理盐

溶液时成为具有带有大于0.1mm的大小的不同形状的另外的结构或切片。优选的是,根据本发明的交联的透明质酸产物具有纵向延伸的形状,并且在完全溶胀状态下的最大横向延伸度小于5mm、优选地小于1.5mm、例如小于0.8mm或甚至小于0.5mm。这对于将溶胀的凝胶产物注射通过期望的尺寸的注射器的目的是有利的。还优选的是,根据本发明的成形的交联的透明质酸产物具有纵向延伸的形状,并且在完全溶胀状态下的纵向延伸度大于5mm、优选地大于500mm(0.5m)、例如大于5m或甚至大于25m。在许多可能性中,此纵向延伸度防止体内植入的凝胶产物的迁移和/或移位。

[0125] 在产物的制造期间布置期望的形状和大小,即通过在交联之前将底物布置成期望的形状。获得期望的结构大小的另一种合适的方式包括在期望的浓度下制造成形的交联的透明质酸凝胶并且使凝胶经受机械破裂例如将溶胀的或部分溶胀的凝胶、或沉淀的交联的产物切碎、捣碎或通过具有合适的孔径(pore size)的过滤器或网状物。将得到的凝胶颗粒或凝胶片分散在生理盐溶液中,产生具有期望的大小和形状的颗粒的凝胶分散液或浆料。取决于形状,凝胶结构的大小可以以任何合适的方式例如通过激光衍射、显微镜、过滤等来确定,并且通过颗粒的两端之间的最长的距离来决定。对于球形结构,直径等于用于此目的的大小。

[0126] 有用的凝胶结构大小范围和形状取决于预期应用。对于软组织填充,优选地皮下施用、肌肉下施用或骨膜上(supraperiosteal)施用,具有大于0.1mm的大小的凝胶颗粒、凝胶片或凝胶纤维在经受生理盐溶液时是有用的。如本文所使用的,术语“软组织填充”指的是软组织的任何类型的体积填充,包括但不限于面部塑造(例如,更明显的脸颊或下巴)、凹陷畸形(concave deformity)(例如,创伤后、HIV相关的脂肪萎缩)的矫正和年老有关的面部褶皱的矫正。因此,软组织填充可以被单独地用于美容目的或用于例如在创伤或退变性疾病之后的医学目的。这两个目的容易被技术人员区分。如本文所使用的,术语“软组织”指的是连接、支撑、或围绕身体的其他结构或器官的组织。软组织包括肌肉、纤维组织和脂肪。软组织填充可以在任何哺乳动物包括人类中进行。优选的是,该方法在人类受试者中进行。

[0127] 如本文所使用的,术语“表皮下施用(subepidermal administration)”或“表皮下施用(subcuticular administration)”指的是在皮肤的表皮下方施用,包括施用到真皮、皮下组织或更深部中,例如肌肉下地或进入其中可应用的骨膜中(在骨组织附近)。

[0128] 凝胶结构的施用可以以任何合适的方式进行,例如通过从合适大小的标准的插管和针注射或例如在施用膜的情况下的手术插入。施用在期望软组织填充处进行,例如下巴、脸颊或在面部或身体中的其他地方。

[0129] 根据本发明的植入物可以是含水组合物,所述含水组合物包含根据本发明的成形的交联的透明质酸产物以及任选地缓冲剂,所述成形的交联的透明质酸产物例如呈 $\geq 0.1\text{mm}$ 的大小的透明质酸凝胶结构的形状,例如颗粒、珠、纤维或切断的条。组合物通常可以包含生理盐缓冲液。组合物还可以包含其他合适的添加剂,例如局部麻醉药(例如,利多卡因盐酸盐)、抗炎药物、抗生素和其他合适的支持性药剂,例如骨生长因子或细胞。根据本发明的成形的交联的透明质酸产物或其含水组合物可以提供在预填充的注射器中,即被灭菌的、成形的交联的透明质酸产物或包含成形的产物的灭菌的含水组合物预填充的注射器。任选地,成形的交联的透明质酸产物可以以沉淀的形式保持在注射器、袋或其他合适的容器中并且在注射之前或在其注射之后在体内形成其非沉淀的形式。

[0130] 优选的是,溶胀的或部分溶胀的、成形的交联的透明质酸产物是可高压灭菌的,因为这是将最终产物灭菌的最便利的方式。这允许制备无菌的、成形的交联的透明质酸产物。

[0131] 不言而喻,根据本发明的凝胶结构例如纤维的大小取决于已经允许多少凝胶溶胀,以及被包含在凝胶结构中和/或围绕凝胶结构的缓冲液、溶液或载体的离子强度。在整个本说明书中,给定的结构大小假定生理条件、特别是等渗条件。将注意的是,虽然优选的是凝胶结构包含生理盐溶液并且分散在生理盐溶液中,但预期的是,根据本发明的凝胶结构可以通过使凝胶结构经受另一渗透压的溶液、不同的pH或当凝胶结构没有被允许溶胀至其最大大小时临时地形成不同的大小。

[0132] 如本文所使用的,生理溶液、或等渗溶液是具有在200-400mOsm/l、优选地250-350mOsm/l、更优选地大约300mOsm/l的范围内的同渗容摩的溶液。为了实践的目的,此同渗容摩通过制备0.9% (0.154M) NaCl溶液来容易地实现。

[0133] 根据本发明的成形的交联的透明质酸凝胶产物在生理条件下是稳定的,但不是永久的。体外稳定性通过在60°C下持续14天的加速稳定性研究在实施例7中表明。根据本发明的实施方案,至少70%、优选地至少90%的成形的交联的透明质酸凝胶产物在体内保持持续至少两周、更优选地在两周和两年之间。术语“降解”意味着小于20%、优选地小于10%的介质保持在体内。

[0134] 根据本发明的成形的交联的透明质酸凝胶产物比天然的透明质酸对体内生物降解更有抗性。稳定的凝胶产物的延长的存在对于患者是有利的,因为治疗之间的时间增加。还重要的是,该产物高度类似于天然的透明质酸,以便保持天然的透明质酸的高的生物相容性。类似于天然HA的产物应该是通过酶透明质酸酶可降解的,优选地可降解至至少99%的程度。根据本发明的坚固的透明质酸凝胶产物的生物可降解性在实施例8中表明,其中坚固的透明质酸凝胶产物被透明质酸酶识别。这反映其与天然透明质酸的相似性。

[0135] 定义

[0136] 在整个本公开内容中,以下术语被定义如下。

	<u>术语</u>	<u>性质</u>	<u>含义</u>
[0137]	HA		HA 指的是透明质酸钠

<u>术语</u>	<u>性质</u>	<u>含义</u>
凝胶形式 HA		凝胶形式 HA 是与可提取的 HA 相反的不能通过用例如盐水冲洗来从凝胶中提取的交联的 HA
可提取的 HA		可提取的 HA 是可以通过用例如盐水冲洗来提取的交联的或不交联的 HA
$C_{HA}$	HA 浓度	$C_{HA} = \frac{m_{HA}}{m_{\text{样品}}} \quad \text{或} \quad C_{HA} = \frac{m_{HA}}{V_{\text{样品}}}$ <p>以 mg/g、mg/mL、%(w/w)、%(w/v)表示</p>
SwD	溶胀度	$SwD = \frac{m_{\text{完全溶胀的凝胶}}}{m_{\text{完全溶胀的凝胶中的凝胶形式HA}}}$ <p>SwD 优选地以 g/g、mL/g 来表示，或表示为无量纲数。SwD 是在 0.9%盐水中完全溶胀的凝胶中的凝胶形式 HA 的倒置浓度，即每克干交联的 HA 可以形成的完全溶胀的凝胶的体积或质量。SwD 描述产物的最大液体吸收(0.9%盐水)能力。</p>
$C_{\text{最小}}$	最小 HA 浓度	在 0.9%盐水中完全溶胀的凝胶中的凝胶形式 HA 的浓度，通常以 mg/g 或 mg/mL 表示。

[0138]

$$C_{\text{最小}}^{-1} = SwD$$

术语	性质	含义
----	----	----

GelC	凝胶含量	
------	------	--

$$GelC = \frac{m_{\text{凝胶形式HA}}}{m_{\text{总HA}}}$$

表示为无量纲数 g/g, 或%。凝胶含量是产物中以凝胶形式结合的 HA 在总 HA 含量中的比例。

MoD	改性度	
-----	-----	--

$$MoD = \frac{n_{\text{结合的交联剂}}}{n_{\text{二糖单元}}}$$

表示为无量纲数摩尔/摩尔, 或摩尔%。MoD 描述结合至 HA 的交联剂的量, 即结合的交联剂的摩尔量相对于重复的 HA 二糖单元的总摩尔量。MoD 反映 HA 被交联剂已经化学改性到的程度。

[0139]

CrR	连接剂比	
-----	------	--

$$CrR = \frac{n_{\text{HA-X-HA}}}{n_{\text{HA-X-HA}} + n_{\text{HA-X}}}$$

其中 X 是交联剂。CrR 还可以表示为:

$$CrR = \frac{\# \text{交联的交联剂}}{\# \text{结合的交联剂}}$$

以无量纲数摩尔/摩尔, 或摩尔%表示。CrR 描述已经结合两个(或更多个)二糖(仅 HA-X-HA)的总结合的交联剂(HA-X-HA 和 HA-X)的比例。

<u>术语</u>	<u>性质</u>	<u>含义</u>
MoE	改性效率	$MoE = \frac{C_{\text{最小}}}{MoD}$

MoE 是作为以 mg/g 表示的  $C_{\text{最小}}$  和以 % 表示的 MoD 之间的比率获得的无量纲数。MoE 描述通过化学改性和由分子缠绕两者引起的互相连接的数量, 这已经以通过交联剂的某种化学改性度为代价来实现。

实施例: 具有  $C_{\text{最小}}=35 \text{ mg/mL}$  和  $MoD=1.15\%$  的产物的 MoE 是大约 30, 并且计算如下:

$$MoE = \frac{35}{1.15} \approx 30$$

[0140]

G'	弹性模量	弹性模量描述凝胶对弹性变形的抗性, 并且以 Pa (帕斯卡) 来表示。相比于弱凝胶, 强凝胶将给出较大的数目。
G''	粘性模量	粘性模量描述凝胶对粘性变形的抗性, 并且以 Pa (帕斯卡) 来表示。和 G' 一起, G'' 描述对变形的总抗性。

[0141] 不期望限制于此, 将在以下通过实例的方式来例证本发明。

[0142] 实施例部分

[0143] 分析方法

[0144] HA浓度的确定

[0145] 根据用于在 Ph. Eur. 1472 中描述的透明质酸钠的测定测试来采用用于确定 HA 含量的方法。该方法的原理是, 通过在硫酸中加热形成的糠醛衍生物与呋唑试剂发生缩合反应, 形成紫色的产物。反应对于 HA 的 D-葡萄糖醛酸部分是特定的。在 530nm 下测量吸光度并且葡萄糖醛酸被用于标准化。

[0146] 由样品中 D-葡萄糖醛酸 (GlcA) 的含量形成的产物通过与呋唑的反应来确定。为了得到均匀的样品溶液, 稳定化的 HA 凝胶在 70 °C 下用硫酸降解并且用 0.9% NaCl 溶液稀释。将

溶液与硫酸在95℃下混合并且其后与吡啶试剂混合。反应产生粉色的溶液。颜色的强度用色度计在530nm下来测量,并且每个样品的吸光度与GlcA含量成正比例。HA含量由每个样品中的GlcA含量来计算。

[0147] 凝胶含量 (GelC) 的确定

[0148] GelC以%描述以凝胶形式结合的总HA的比例。凝胶含量被定义为在不通过0.22μm过滤器的样品中的HA的量。GelC从在滤液中收集的HA(这里表示成可提取的HA)的量来计算。凝胶含量和可提取的HA含量以HA的总量在凝胶样品中的百分比给出。简言之,凝胶含量通过使一定量的凝胶样品与0.9%NaCl在测试管中混合来确定。在通过由0.22μm过滤器过滤将NaCl相从凝胶相中分离之后,允许凝胶溶胀。HA在滤液中的浓度根据用于确定HA浓度的程序来确定。

[0149] 溶胀度 (SwD) 的确定

[0150] SwD描述产物的液体吸收能力,即其吸收0.9%NaCl的能力。产物通常是干燥的、交联的HA凝胶。干燥产物可以沉淀或不沉淀。SwD可以从在将一定重量的干燥产物溶胀在盐水中之后形成的完全溶胀的产物的重量来确定。如果干燥产物沉淀,则其将在这些条件下恢复至非沉淀形式。

[0151] 使具有预先确定的重量(通常0.1g)的干燥产物经受过量的0.9%NaCl(aq),并且允许产物在室温(23℃)下溶胀持续一小时。收集完全溶胀的产物并且在将未吸收的液体除去之后称重。未吸收的液体的除去还除去不结合至交联的凝胶或在交联的凝胶中不缠绕的任何物质,例如非交联的或弱交联的透明质酸盐分子。因为这些物质将不有助于完全溶胀的产物的重量,从而给出明显较低的SwD,所以应该对凝胶含量进行校正以便确定真正的SwD。如果凝胶含量被认为足够接近于结果不被影响的100%,则此校正可以被省略。

[0152] SwD被计算为完全溶胀的且从如上文描述的可提取的HA中冲洗的产物的重量和产物中干燥的交联的HA的重量之间的比率:

$$[0153] \quad SwD = \frac{m_{\text{完全溶胀的凝胶}}}{m_{\text{完全溶胀的凝胶中的凝胶形式HA}}} = \frac{m_{\text{完全溶胀的凝胶}}}{m_{\text{干燥}} \times GelC}$$

[0154] 其中GelC被表示为无量纲数。如果GelC被认为接近于1(100%),则SwD可以被计算为:

$$[0155] \quad SwD = \frac{m_{\text{完全溶胀的凝胶}}}{m_{\text{干燥}}}$$

[0156] 已经使用收集完全溶胀的产物和除去未吸收的液体的三种技术:1)一片一片地收集溶胀产物,允许产物短暂地接触干燥的表面,2)使用金属网收集全部的溶胀产物,允许网短暂地接触干燥的表面,3)通过抽吸穿过0.2μm过滤器来从溶胀产物中除去液体。在后者的情况下,完全溶胀的产物的重量不被直接称重,而是使用下式从溶胀之前的干燥的样品的重量、添加的液体的重量和在过滤之后除去的液体的重量来计算:

$$[0157] \quad m_{\text{完全溶胀的凝胶产品}} = m_{\text{添加的液体}} - m_{\text{除去的液体}} + m_{\text{干燥产品}}$$

[0158] 值得注意的是,较强的凝胶将具有较低的SwD,而较弱的凝胶将具有较高的SwD。

[0159] 最小浓度 (C<sub>最小</sub>) 的确定

[0160]  $C_{\text{最小}}$  描述在除去全部可提取的HA之后的凝胶形式HA在0.9%NaCl中完全溶胀的交联的HA凝胶产物中的浓度。因为产物不能吸收更多的液体,所以此浓度是对于此特定的凝胶产物可以获得的最小HA浓度。值得注意地,较强的凝胶将具有较高的 $C_{\text{最小}}$ ,而较弱的凝胶将具有较低的 $C_{\text{最小}}$ 。

[0161]  $C_{\text{最小}}$  类比如上文陈述的SwD的确定使用以下关系来确定:

$$[0162] \quad C_{\text{最小}} = \frac{1}{SwD}$$

[0163] 改性度 (MoD) 的确定

[0164] MoD描述结合的交联剂的摩尔量相对于重复的HA二糖单元的总数目。此测量不区分单一连接的交联剂和实际上交联的交联剂,即包括通过至少一个共价键结合至HA的全部交联剂。例如,对于用BDDE交联的HA凝胶,1%的MoD意指在HA凝胶中每100个二糖单元存在1个结合的(单一连接的或交联的)BDDE分子。

[0165] 使用NMR光谱学对酶催化降解的凝胶产物来确定MoD。可溶的HA、残留的(非结合的)交联剂和其衍生物在凝胶降解之前通过在0.22 $\mu\text{m}$ 过滤器上过滤来洗掉。使用来自金黄色杆菌(*Arthrobacter aureus*)的软骨素酶AC在37 $^{\circ}\text{C}$ 下通过酶处理来降解凝胶产物。通过在装配有标准的5mm探针的400MHz光谱仪上记录一维的 $^1\text{H}$  NMR光谱来使降解的凝胶产物经受NMR光谱。

[0166] NMR光谱通过在 $\delta_{\text{H}}$ 1.6ppm处的信号(其源自连接的BDDE分子中的四个质子)和在 $\delta_{\text{H}}$ 2.0ppm处的信号(其来自HA二糖的N-乙酰氨基葡萄糖残基上的 $\text{CH}_3$ 基团中的三个质子)的积分来评价。在对是每个信号的原因的质子的数目进行校正之后,这两个信号的积分之间的比率与结合的BDDE和二糖的摩尔量之间的比率成比例,因此给出MoD。

$$[0167] \quad MoD = \frac{n_{\text{结合的交联剂}}}{n_{\text{二糖单元}}}$$

[0168] 改性效率 (MoE) 的确定

[0169] MoE是凝胶的最小HA浓度和改性度之间的比率,即:

$$[0170] \quad MoE = \frac{C_{\text{最小}}}{MoD} = \frac{1}{SwD \times 0.001 \times MoD}$$

[0171]  $C_{\text{最小}}$  (mg/g或mg/mL) 和MoD (%) 如先前描述的来确定。因为 $C_{\text{最小}}$ 与凝胶的强度紧密相关,所以MoE是交联程序在产生期望的强度的凝胶中是多有效的量度。具有高MoE的工艺将产生具有高 $C_{\text{最小}}$ 和低MoD的凝胶,即尽管HA的有限的化学改性,但产生强的凝胶。

[0172] 交联剂比 (CrR) 的确定

[0173] CrR描述已经结合两个(或更多个)二糖(仅HA-X-HA)的总结合的交联剂(HA-X-HA和HA-X)的比例。

$$[0174] \quad CrR = \frac{n_{\text{HA-X-HA}}}{n_{\text{HA-X-HA}} + n_{\text{HA-X}}}$$

[0175] 其中X是交联剂。

[0176] 该方法基于在使用来自金黄节杆菌 (*Arthrobacter aureescens*) 的软骨素酶AC或来自普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 的软骨素酶ABC将HA凝胶降解成由主要二糖组成的片段 ( $\Delta$  di-HA) 和具有包含1-16个二糖的结合的交联剂的片段 (HA-X) 之后,使用SEC-UV-MS确定HA-X片段。片段使用尺寸排阻色谱法 (SEC) 来分离,并且使用质谱法 (MS) 来检测。对每组片段的峰面积求和,并且CrR被计算为:

$$[0177] \quad CrR = \frac{\text{峰面积}_{HA-X-HA}}{\text{峰面积}_{HA-X-HA} + \text{峰面积}_{HA-X}}$$

[0178] 假定全部类型的HA-X片段在MS检测器中具有相同的响应,即某个峰面积对应于全部类型的HA-X片段的给定的分子量 (Kenne等人, *Carbohydrate Polymers* 91 (2013) 410-418)。

[0179] 当确定CrR时,应该小心地仅包括通过醚键结合的BDDE。取决于交联期间的条件, BDDE可以通过醚键和酯键两者结合至HA。因为酯键容易被水解,所以仅醚结合的BDDE将有助于凝胶强度和长期的持续时间。具有酯结合的BDDE的片段具有与醚结合的BDDE相同的质量,但可以被检测到,因为它们具有略微不同的色谱保留时间。为了确定不具有任何酯结合的BDDE的CrR,样品应该在分析之前被水解。样品的水解可以例如在酶催化降解之前或之后通过添加碱和/或加热来进行。

#### [0180] pH的确定

[0181] 使用玻璃电极在环境温度下电位滴定地进行pH确定。用于溶胀的产物的pH确定的方法基于USP法<791>。程序:在环境室温下用在pH 7.0和pH 4.0下的用于标准化的缓冲溶液校准pH计。将约1.2mL的样品 (对于每次测量) 转移到合适的容器中。确保样品在室温下。一式两份测量样品的pH。在蒸馏水中洗涤电极并且在每次测量之间小心地擦拭。

[0182] 用于工艺溶液、尤其有机溶剂的pH确定的方法如上文,但在pH 7.0和pH 10.0下校准。

[0183] 对于相同浓度的碱例如氢氧化钠 (NaOH), 在水和有机溶剂的混合物中测量的pH值相比于在纯水溶液中测量的pH不同。因此,表述表观pH ( $pH_{\text{表观}}$ ) 被用于在有机溶剂的含水混合物中测量的pH。表观pH取决于若干因素,包括有机溶剂的类型、有机溶剂的浓度、温度、离子强度和混合物中其他化合物的存在。

[0184] 在实验部分中报道的表观pH值用具有Mettler Toledo Inlab Routine Pro电极的Mettler Toledo MA 234pH/离子分析器在pH范围0-14内测量。

#### [0185] 流变仪

[0186] 处于振荡模式的流变仪被用于确定溶胀的凝胶产物的粘弹性性质。弹性模量 ( $G'$ ) 描述凝胶对弹性变形的物理抗性方面的凝胶强度。粘性模量 ( $G''$ ) 描述凝胶对粘性变形的物理抗性方面的凝胶强度。使用振荡流变仪进行测量。

[0187] 如下进行流变仪测量。频率扫描在样品负载和测量之间至少15分钟的静置时间以及0.1%的应变 ( $\lambda$ ) 下来进行。具有25mm的直径的平行板状探针以2mm的间隙使用。弹性模量 ( $G'$ ) 和粘性模量 ( $G''$ ) 的平均值在0.1Hz和1Hz下从频率扫描来评价。在1Hz下进行振幅扫描以证实在线性粘弹性范围内在应变 ( $\lambda$ ) 下进行频率扫描。

#### [0188] 酶降解性的确定

[0189] 进行酶降解以便通过确证交联的凝胶通过来自绵羊睾丸的透明质酸酶是可降解的来证实交联的凝胶关于生物降解性等同于天然的HA。

[0190] 允许具有预先确定的重量的产物(干燥、或溶胀至已知浓度)在100mL的0.9%盐水中在37°C下溶胀过夜。添加来自绵羊睾丸的透明质酸酶(II型, H2126Sigma)以获得200U/mL的酶浓度,并且将制备设定为在37°C下摇动过夜。将溶液通过0.22 $\mu$ m过滤器来过滤,并且滤液中HA的量使用唑法来确定。降解被计算为滤液中HA的量与样品中HA的总量的比率。

## 实施例

[0191] 实施例1-交联程序

[0192] 将具有0.8-3MDa的分子量的约1g透明质酸钠溶解在10-50mL的包含0-40%的乙醇和0-120mM的强碱的水溶液中。在完成溶解之后,得到的透明质酸盐溶液具有如上文描述测量的6-13的pH<sub>表观</sub>。(制备步骤)

[0193] 将透明质酸盐溶液通过具有0.3-0.5mm直径的开口挤出到包含有机溶剂的液体介质中。挤出的透明质酸盐溶液立即沉淀成透明质酸盐纤维。(沉淀步骤)

[0194] 然后,将约1g的沉淀的HA纤维转移至约20-70mL的包含65-80%的有机溶剂、0.3-1.2g (30-230mM) 交联剂、和1-75mM强碱的含水的交联介质中。透明质酸盐保持沉淀且呈纤维的形式。包含HA的得到的交联介质具有大于11.5的pH。允许HA纤维在含水的交联介质/有机的交联介质中交联。(交联步骤)

[0195] 然后,将由此获得的交联的透明质酸盐纤维从交联介质中除去并且用磷酸或类似物中和。交联的HA纤维在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约1小时。

[0196] 沉淀的中间体表征如下。确定干燥的交联的透明质酸盐纤维的重量。将干燥的纤维浸渍在过多的0.9%含水盐水中并且允许自由地吸收液体。然后,纤维形成含水凝胶,并且吸收盐水直到获得纤维的平衡(最大)溶胀。将凝胶纤维从过多盐水和非交联的透明质酸盐的溶液中手动地除去并且直接转移至天平。确定完全溶胀的纤维的重量。从盐水吸收结果来确定溶胀度(SwD),其对应于完全溶胀的凝胶中的某种透明质酸钠浓度(C<sub>最小</sub>)。

[0197] 得到的交联的透明质酸盐纤维的改性度(MoD)通过如上文描述的NMR光谱学来确定。简略地,来自连接的BDDE的信号强度与来自HA中乙酰基的信号有关。在校正引起信号的质子数目之后,然后可以计算连接的BDDE相对于HA的摩尔比。相应的改性效率(MoE)从溶胀度来计算。

[0198] 允许交联的HA纤维的描述的沉淀的中间体溶胀至如下定义的HA浓度。将磷酸盐缓冲的盐溶液(4mM磷酸盐和150mM NaCl)或类似物添加至干燥的HA纤维至约10-40mg HA/mL的浓度。将部分溶胀的凝胶填充到10mL塑料注射器中。使用温湿法(moist heat)在123°C下用约20分钟的最终等效时间(F<sub>0</sub>)将填充的注射器灭菌。高压灭菌的注射器的内容物用上文描述的方法关于pH、HA浓度、溶胀度(SwD)、和最小浓度(C<sub>最小</sub>)来表征,并且MOE从确定用于中间体的MoD来计算。

[0199] 如上文描述的来制备交联的HA纤维。用于沉淀的中间体的分析数据在表1中报道,并且关于溶胀的和高压灭菌的产物获得的数据在表2中示出。

[0200] 表1-产物(沉淀的中间体)的表征

实验编号	干燥的 HA 的量(mg)	溶胀的 HA 的量(mg)	SwD* (g/g)	C <sub>最小</sub> (mg/mL)	MoD (%)	MoE
1	-	-	-	-	0.3	-
2	23	1181	51	20	0.7	28
3	15	2200	147	7	0.2	38
4	17	1070	62	16	0.2	73
5	17	1505	89	11	0.4	30
6	16	2110	133	8	0.2	42
7	-	-	-	-	1.3	-
8	-	-	-	-	0.4	-
9	-	-	-	-	0.5	-
10	-	-	-	-	0.2	-
11	-	-	-	-	0.3	-
12	16	501	32	31	1.7	19
13	15	313	21	48	0.3	190
14	19.8	632	32	31	0.7	46
15	-	-	-	-	0.5	-

[0202] \*根据程序1测量的

[0203] 表2-溶胀的和高压灭菌的产物的表征

实验编号	pH	HA 浓度 (mg/mL)	SwD** (mL/g)	C <sub>最小</sub> (mg/mL)	MoE
1	6.9	20*	110	9	28
2	-	-	-	-	-
3	7.3	19	85	12	65
4	-	20*	-	-	-
5	-	-	-	-	-

6***	7.2	20*	139	7	40
7	7.6	20*	23	43	32
8	6.6	20*	40	25	59
9	7.1	20*	21	47	97
10	7.2	20*	96	10	44
11	7.3	20*	55	18	55
12	-	-	-	-	-
13	7.3	20*	23	44	174
14	-	-	-	-	-
15	7.9	20*	97	10	21

[0206] \*估计的HA浓度

[0207] \*\*根据程序3测量的

[0208] \*\*\*在上文描述的溶胀步骤中每mL磷酸盐缓冲盐溶液添加2mg利多卡因盐酸盐

[0209] 实施例2-用不同的交联剂交联

[0210] 如在实施例1中陈述的来制备透明质酸盐溶液。在完成溶解之后,得到的透明质酸盐溶液具有如上文描述测量的大于9的pH。将透明质酸盐溶液通过具有0.5mm直径的开口挤

出到99.5%乙醇的液体介质中。挤出的透明质酸盐溶液立即沉淀成透明质酸盐纤维。

[0211] 将约1g的沉淀的HA纤维转移至包含70%乙醇、交联剂和NaOH的含水的交联介质/有机的交联介质。透明质酸盐保持沉淀且呈纤维的形式。包含HA的得到的交联介质具有大于11.5的pH。

[0212] 允许HA纤维在含水的交联介质/有机的交联介质中交联。然后,将由此获得的交联的透明质酸盐纤维从交联介质中除去并且用磷酸中和。交联的HA纤维在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约2小时。

[0213] 允许交联的HA纤维的描述的沉淀的中间体溶胀至如下定义的HA浓度。将磷酸盐缓冲的盐溶液添加至干燥的HA纤维至约20mg HA/mL的浓度。将部分溶胀的凝胶填充到10mL塑料注射器中。使用温湿法在123°C下用约20分钟的最终 $F_0$ 来将填充的注射器灭菌。高压灭菌的注射器的内容物用上文描述的方法关于pH、溶胀度(程序3的SwD)、最小浓度( $C_{\text{最小}}$ )、改性度(MoD)和改性效率(MoE)来表征。在表3中示出的结果意味着,不同的双环氧化合物在描述的工艺中是有用的交联剂。

[0214] 表3

[0215] 

产物的表征					
-------	--	--	--	--	--

	交联剂	pH	SwD*(mL/g)	C <sub>最小</sub> (mg/mL)	MoD (%)	MoE
[0216]	EDDE**	7.6	24	41	1.5	27
	EDDE**	7.3	12	86	2.8	31
	二环氧辛烷	7.9	97	10	0.5	21

[0217] \*根据程序3测量的,HA浓度假定是20mg/mL

[0218] \*\*1,2-乙二醇缩水甘油醚,纯度50%

[0219] 实施例3-甲醇中的交联

[0220] 如在实施例1中陈述的来制备透明质酸盐溶液。在完成溶解之后,得到的透明质酸盐溶液具有如上文描述测量的大于9的pH。将透明质酸盐溶液通过具有0.5mm直径的开口挤出到99.5%乙醇的液体介质中。挤出的透明质酸盐溶液立即沉淀成透明质酸盐纤维。

[0221] 然后,将约0.75g的沉淀的HA纤维转移至包含80%甲醇、1,4-丁二醇缩水甘油醚(BDDE)、和NaOH的含水的交联介质。透明质酸盐保持沉淀且呈纤维的形式。包含HA的得到的交联介质具有大于11.5的pH。

[0222] 允许HA纤维在含水的交联介质/有机的交联介质中交联。然后,将由此获得的交联的透明质酸盐纤维从交联介质中除去并且用磷酸中和。交联的HA纤维在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约1小时。

[0223] 根据程序1来测量溶胀度SwD。允许交联纤维的干燥的中间体在磷酸盐缓冲的盐溶液中溶胀至20mg HA/mL。将溶胀的凝胶填充到10mL塑料注射器中。使用温湿法在123°C下用约20分钟的最终 $F_0$ 将填充的注射器灭菌。高压灭菌的注射器的内容物根据上文描述的方法关于pH和改性度(MoD)来表征。得到的凝胶制剂具有6.8的pH和0.34%的MoD。

[0224] 实施例4-在异丙醇中交联

[0225] 如在实施例3中描述的来制备透明质酸盐溶液。然后,将约0.5g的沉淀的HA纤维转移至30mL的包含70%异丙醇、1,4-丁二醇缩水甘油醚(BDDE)和NaOH的含水的交联介质。透明质酸盐保持沉淀且呈纤维的形式。包含HA的得到的交联介质具有大于11.5的pH。

[0226] 允许HA纤维在含水的交联介质/有机的交联介质中交联。将由此获得的交联的透明质酸盐纤维从交联介质中除去并且用磷酸中和。然后,将交联的HA纤维在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约1小时。

[0227] 允许交联纤维的干燥的中间体在磷酸盐缓冲的盐溶液中溶胀至20mg HA/mL的HA浓度。将溶胀的凝胶填充到10mL塑料注射器中。使用温湿法在123°C下用约20分钟的最终 $F_0$ 将填充的注射器灭菌。高压灭菌的注射器的内容物根据上文描述的方法关于pH、溶胀度(根据程序3)、凝胶含量和改性度(MoD)来表征。最小浓度 $C_{\text{最小}}$ 和改性效率(MoE)如上文描述来计算。得到的凝胶制剂具有7.6的pH、SwD 47g/g HA、 $C_{\text{最小}}$  21mg/mL、MoD 0.41%和MoE 52。

[0228] 实施例5-以期望的形状和结构交联

[0229] 如在实施例1中陈述的来制备透明质酸盐溶液。在完成溶解之后,得到的透明质酸盐溶液具有如上文描述测量的大于9的pH。

[0230] 具有不同形状或结构的沉淀的HA底物通过以下从上文的透明质酸盐溶液来制备:

[0231] 1) 通过具有0.5mm的直径的开口挤出,形成小滴;

[0232] 2) 通过具有0.5mm的直径的开口挤出,形成网;以及

[0233] 3) 在塑料箔上铺开,形成膜,

[0234] 以及随后浸没到99.5%乙醇的液体介质中。将挤出的透明质酸盐溶液分别立即沉淀成透明质酸盐小滴、网和膜。

[0235] 然后,将约1g的各自沉淀的HA底物转移至45mL的包含70%乙醇、1,4-丁二醇缩水甘油醚(BDDE)和NaOH的含水的交联介质。透明质酸盐在交联反应期间保持沉淀并且呈预先确定的形式。包含HA的得到的交联介质具有大于11.5的pH。

[0236] 在完成交联之后,将交联的透明质酸盐制剂从交联介质中手动地除去、用磷酸中和并且在其被表征之前在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约1小时。

[0237] 确定小滴和膜的溶胀度(SwD)。将已知量的干燥的交联的透明质酸盐样品浸渍在过多的0.9%含水盐水中并且允许自由地吸收液体。然后,样品形成含水凝胶,并且吸收盐水直到获得样品的平衡(最大)溶胀。然后将凝胶样品从过多的盐水和最后非交联的残留的透明质酸盐的溶液中手动地除去并且直接转移至天平。最大盐水吸收通过使溶胀的凝胶的重量与干燥材料的初始重量相比较来估计。结果在表4中作为溶胀度(程序1的SwD)和最小浓度( $C_{\text{最小}}$ )两者来提供。允许网在如上文描述的过多的0.9%含水盐水中溶胀。溶胀的凝胶网在图1中示出。

[0238] 交联的透明质酸盐的小滴和膜的改性度(MoD)通过如上文描述的NMR光谱学来确定。简略地,来自连接的BDDE的信号强度与来自HA中乙酰基的信号有关。在校正引起信号的质子数目之后,然后计算连接的BDDE相对于HA的摩尔比。来自MoD和计算的改性效率(MoE)的结果在表4中提供。

[0239] 允许交联的小滴的干燥的中间体在磷酸盐缓冲的盐溶液中溶胀至20mg HA/mL的HA浓度。将溶胀的凝胶填充到10mL塑料注射器中。使用温湿法在123°C下用约20分钟的 $F_0$ 将填充的注射器灭菌。来自高压灭菌的小滴的表征的结果也在表4中提供。

[0240] 表4

样品	SwD (g/g HA)	C <sub>最小</sub> (mg/mL)	MoD (%)	MoE
小滴	60*	17	0.47	36
[0241] 高压灭菌的小滴	58**	17	0.47	37
膜	115*	9	0.43	20

[0242] \*根据程序1测量的

[0243] \*\*根据程序3测量的

[0244] 结果示出,可能产生具有在交联过程和高压灭菌期间被保留的预先定义的形式交联的HA材料。

[0245] 实施例6-碱性纤维的交联

[0246] 如在实施例1中陈述的来制备透明质酸盐溶液。在完成溶解之后,得到的透明质酸盐溶液具有如上文描述测量的大于9的pH。将透明质酸盐溶液通过21G针(内径0.5mm)挤出到99.5%乙醇的液体介质中。挤出的透明质酸盐溶液立即沉淀成透明质酸盐纤维。

[0247] 然后,将约1g的沉淀的、未洗涤的HA纤维转移至68mL的包含70%乙醇和1,4-丁二醇缩水甘油醚(BDDE)的含水的交联介质。透明质酸盐保持沉淀、碱性且呈纤维的形式。在添加碱性HA纤维之后的得到的交联介质具有大于11.5的pH。

[0248] 允许HA纤维在含水的交联介质/有机的交联介质中交联。然后,将由此获得的交联的透明质酸盐纤维从含水的交联介质中除去、用磷酸中和并且在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约1小时并且表征。

[0249] 允许交联纤维的干燥的中间体在磷酸盐缓冲的盐溶液中溶胀至约20mg/mL的HA浓度。将部分溶胀的凝胶填充到10mL塑料注射器中。使用温湿法在123°C下用约20分钟的最终F<sub>0</sub>将填充的注射器灭菌。高压灭菌的注射器的内容物根据上文描述的方法关于pH、溶胀度(SwD)、凝胶含量和改性度(MoD)来表征。最小浓度C<sub>最小</sub>和改性效率(MoE)如上文描述来计算。结果在表5中提供。

[0250] 表5

制剂	凝胶制剂pH	SwD* (g/g HA)	C <sub>最小</sub> (mg/mL)	MoD (%)	MoE
1	6.6	170	6	0.10	59
2	6.8	51	20	0.25	78

[0252] \*根据程序3测量的并且针对凝胶含量校正的

[0253] 因此,在包含70%乙醇的中性交联介质中的具有大于11.5的最终表观pH的碱性纤维的交联产生定义良好的凝胶纤维。

[0254] 实施例7-生物相容性和稳定性研究

[0255] 以研究材料在体内的生物相容性为目的,如实施例1中陈述的来制备四种制剂。在完成溶解之后,得到的透明质酸盐溶液具有如上文描述测量的大于9的pH。将透明质酸盐溶液通过18G(Ø 0.8 mm;制剂1和制剂2)或25G(Ø 0.3 mm;制剂3和制剂4)宽开口挤出到99.5%乙醇的液体介质中。挤出的透明质酸盐溶液立即沉淀成透明质酸盐纤维。

[0256] 然后,将约1g的沉淀的HA纤维转移至60mL的包含70%乙醇、1,4-丁二醇缩水甘油醚(BDDE)和NaOH的含水的交联介质中。将制剂2和制剂4经受比制剂1和制剂3高四倍的BDDE浓度。透明质酸盐保持沉淀且呈纤维的形式。包含HA的得到的交联介质具有如用上文描述

的设备测量的大于11.5的pH。

[0257] 允许HA纤维在含水的交联介质/有机的交联介质中交联。然后,将由此获得的交联的透明质酸盐纤维从含水的交联介质中除去、用磷酸中和、在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约1小时并且表征。

[0258] 将干燥的纤维浸渍在过多的0.9%含水盐水中并且允许自由地吸收液体。然后,纤维形成含水凝胶,并且吸收盐水直到获得纤维的平衡(最大)溶胀。然后,将凝胶纤维从过多的盐水和非交联的透明质酸盐的溶液中手动地除去并且直接转移至天平。最大盐水吸收通过使沉淀的材料初始重量与完全溶胀的纤维的重量相比较来估计。在灭菌之前从凝胶纤维获得的结果作为溶胀度(SwD)和最小HA浓度( $C_{\text{最小}}$ )两者在表6中提供。

[0259] 表6

制剂	干燥纤维的重量(mg)	完全溶胀纤维的重量(mg)	SwD* (g/g HA)	$C_{\text{最小}}$ (mg HA/mL)	MoD (%)	CrR (%)	MoE
[0260] 1	14	1144	81	12	0.29	51	43
2	26	739	28	36	1.22	46	29
3	14	1397	100	10	0.28	50	36
4	14	478	34	29	1.13	47	26

[0261] \*根据程序1的SwD测量的

[0262] 得到的交联的透明质酸盐纤维的改性度(MoD)通过如上文描述的NMR光谱学来确定。简略地,来自连接的BDDE的信号强度与来自HA中乙酰基的信号有关。在校正引起信号的质子数目之后,然后可以计算连接的BDDE相对于HA的摩尔比。图2的A(制剂1)和图2的B(制剂2)示出酶催化降解的HA凝胶在氘水( $D_2O$ )中的400MHz  $^1H$  NMR光谱。来自连接的BDDE和N-乙酰基的信号在光谱中标记。对于每种相应的制剂的MoD和CrR的结果与改性效率(MoE)一起在表6中提供。

[0263] 允许交联的纤维的干燥的中间体溶胀至如下定义的HA浓度。将磷酸盐缓冲的盐溶液添加至干燥的HA纤维以实现约20mg HA/mL的估计的浓度。制剂1和制剂3吸收全部添加的溶液,而制剂2和制剂4不吸收。然后,将溶胀的凝胶在无菌条件下填充到1mL玻璃注射器中。使用温湿法在125°C下用约20分钟的最终 $F_0$ 将填充的注射器灭菌。

[0264] 高压灭菌的注射器的内容物根据上文描述的方法关于HA浓度、凝胶含量(GelC)、溶胀度(SwD)和pH来表征。来自灭菌之后的产物的结果在表7中提供。

[0265] 表7

制剂	HA 浓度 (mg/mL)	GelC (%)	SwD* (g/g HA)	pH
[0266] 1	18	96	95	7.5
2	32	~99	25	7.6
3	19	95	87	7.6
4	36	~99	23	7.5

[0267] \*根据程序3的SwD测量的并且针对凝胶含量校正的

[0268] 从表6和表7明显的是,制剂1和制剂3比制剂2和制剂4刚性小并且化学改性较少。制剂2和制剂4的高HA浓度反映,水的最大吸收是低的,并且对于在这些条件下产生的凝胶,

不可能实现具有较低的HA浓度的凝胶产物。

[0269] 关于生物负载(倾注平板法(pour plate method))和内毒素(凝胶凝块法(gel-clot method))来分析制剂。全部制剂具有0cfu/注射器的生物负载和<0.21EU/mL的内毒素值。制剂全部满足用于生物相容性研究的关于纯度的要求。

[0270] 显微镜学

[0271] 通过将纤维在甲苯胺蓝水溶液中着色持续15分钟来使溶胀的和高压灭菌的纤维显现。显微镜图像在图3的A-D中示出。3A:制剂1;3B:制剂2;3C:制剂3;和3D:制剂4。巴=1mm。

[0272] 稳定性测试

[0273] 制剂的稳定性测试在60°C/环境相对湿度(RH)下进行持续14天。制剂全都示出良好的稳定性。图4示出SwD在60°C下随时间的增加(根据程序3的SwD测量的和针对凝胶含量校正的)。制剂1(◆);制剂2(■);制剂3(▲);和制剂4(×)。

[0274] 生物学评价

[0275] 在24只斯普拉格-杜勒大鼠(Sprague-Dawley rat)中通过皮下注射来测试制剂的生物相容性。将动物麻醉,背部剃毛,并且将1mL的每种制剂皮下注射。在大鼠的背部上的中线的每侧进行两次注射。将动物分成两组。一组在注射之后一周被安乐死,并且另一组在注射之后三周安乐死。每天检查动物,并且没有记录到疾病的迹象。注射的制剂在全部皮肤样品中在宏观上和组织结构上是耐受良好的。因此,没有坏死或急性炎症的迹象可以被看到。除了环绕植入的制剂的部位的薄的纤维胶囊(未示出),没有发现肉芽肿的形成或组织反应的迹象。可以得出结论,制剂在大鼠中是生物相容的。

[0276] 实施例8-具有不同的凝胶强度的凝胶的透明质酸酶降解

[0277] 如在实施例1中陈述的来制备透明质酸盐溶液。在完成溶解之后,得到的透明质酸盐溶液具有如上文描述测量的大于11.5的pH。将透明质酸盐溶液通过具有0.5mm直径的开口挤出到99.5%乙醇的液体介质中。挤出的透明质酸盐溶液立即沉淀成透明质酸盐纤维。

[0278] 将约1g的沉淀的HA纤维转移至包含70%乙醇、BDDE和NaOH的含水的交联介质/有机的交联介质。透明质酸盐保持沉淀且呈纤维的形式。包含HA的得到的交联介质具有大于11.5的pH。

[0279] 允许HA纤维在含水的交联介质/有机的交联介质中交联。然后,将由此获得的交联的透明质酸盐纤维从交联介质中除去并且用磷酸中和。交联的HA纤维在室温下在减压(~200毫巴)下在真空室中干燥持续约2小时。

[0280] 允许交联的HA纤维的描述的沉淀的中间体溶胀至如下定义的HA浓度。将磷酸盐缓冲的盐溶液添加至干燥的HA纤维至约20-40mg HA/mL的浓度。将部分溶胀的凝胶填充到10mL塑料注射器中。使用温湿法在123°C下用约20分钟的最终F<sub>0</sub>将填充的注射器灭菌。高压灭菌的注射器的内容物根据上文描述的方法关于溶胀度(程序2的SwD)、HA浓度、最小HA浓度(C<sub>最小</sub>)、改性度(MoD)、改性效率(MoE)和粘弹性性质来表征。使全部不同的产物根据“酶降解性的确定”经受透明质酸酶降解以证实HA的生物降解性保持在交联的产物中。

[0281] 结果在表8A和表8B中报道。对于全部制剂,G'/(G'+G'')的值>70%,这清楚地示出,所述制剂全部是凝胶。此外,G'值示出,凝胶是坚固的。然而,凝胶在大跨度的如通过确定的溶胀性质和流变学性质示出的凝胶强度内通过透明质酸酶可降解至大于99%。这示出,天

然HA的生物降解性在根据本发明的凝胶产物中被有利地保持。

[0282] 表8A

交联工艺		表征				
样品	交联剂浓度	SwD* (mL/g)	C <sub>最小</sub> (mg/mL)	MoD (%)	通过透明质酸酶降 解(%)	HA 浓度 (mg/mL)
[0283] 1	1×	75	14	0.2	>99	20
2	2×	26	39	0.4	>99	17
3**	6×	17	59	1.9	>99	44
4	8×	17	59	1.6	>99	39

[0284] \*根据程序2测量的

[0285] \*\*交联温度29℃

[0286] 表8B

样品	G' 1 Hz (Pa)	G'' 1 Hz (Pa)	G' 0.1 Hz (Pa)	G'' 0.1 Hz (Pa)	G' 1 Hz (%)*	G' 0.1 Hz (%)*
[0287] 1	202	90	117	47	69%	71%
2	435	45	674	36	91%	95%
3	7975	527	7207	689	94%	91%
4	6485	352	5914	478	95%	93%

[0288] \*计算为G' / (G' + G'') 的凝胶特征

[0289] 实施例9-比较实施例

[0290] 根据EP 2 199 308 A1中的实施例4来制备五种透明质酸(HA)凝胶样品,见以下表9A。使用上文在实施例1中陈述的交联程序来制备根据本发明的参考样品(FU0509:1)。

[0291] 表9A-交联条件

样品	HA 供应商	在交联期间搅 拌	在交联期间的 温度	反应时间(h)
[0292] 1	Shiseido	无	RT	16 h
2	Shiseido	磁力	RT	16 h
3	Shiseido	无	45℃	16 h
4	Shiseido	磁力	40℃	16 h
5	Food Chemifa	螺旋桨	RT	16 h
参考样品	Food Chemifa	N/A	RT	48 h

[0293] 表9B-结果

样品	MoD (%)	G' 0.1 Hz	G'' 0.1 Hz	G' 1 Hz	G'' 1 Hz
[0294] 1	0.34	57	50	174	110
2	0.53	58	37	141	80
[0295] 3	1.05	78	24	127	48
4	0.79	32	13	58	28
5	1.70	145	6	157	10
参考样品	0.36	853	40	932	53

[0296] 对于全部样品实现凝胶,见表9B。由比较性样品1-5提供的不规则地成形的凝胶颗粒显示与通过根据本发明的方法制备的样品相同的范围内的MoD值。然而,比较性样品1-5相比于通过根据本发明的方法制备的样品,G'值和G''值明显较低。可以得出结论,根据本发明的方法比EP 2 199 308 A1中公开的方法更有效,因为本发明提供已经在较低MoD下的较强的凝胶。

[0297] 比较性样品1-5的显微镜图像(分别地图5的A-E,各自以50x放大倍数)示出产物大小和形状的宽的分布,指示在EP 2 199 308A1中公开的方法提供随机大小的颗粒。得到的颗粒的形状和大小不在控制下。相比之下,通过根据本发明的方法制备的产物的显微镜图像(图5的F)示出具有均匀大小和形状的产物。

[0298] 实施例10-在沉淀步骤中的乙醇浓度

[0299] 测试以不同的乙醇浓度沉淀HA绳的效果。制备具有浓度65%w/w、75%w/w、85%w/w、95%w/w的四种乙醇水溶液。将HA(5%w/w)在具有0.5%NaOH(w/w)的乙醇(35%w/w)中的溶液在小塑料(PE)膜上手动地挤出,所述小塑料膜被浸没在具有乙醇溶液和纯(99.5%w/w)乙醇中的每种的浴中,或在75%乙醇和85%乙醇中逐步浸没持续一分钟并且然后转移至99.5%乙醇。

[0300] 收集得到的沉淀的绳并且使用光学显微镜视觉地评价。还评价在处理绳时的感官感觉。观察到绳具有较平滑且更平坦的表面,并且沉淀浴中的乙醇浓度越高,绳越卷曲、越脆性并且示出更捆绑的结构。

[0301] 逐步沉淀(75%→85%→99.5%)的绳表现得如仅在75w/w%或85w/w%中沉淀的绳。在这些条件下用65%乙醇没有观察到HA的完全沉淀。在65%乙醇中保持持续2分钟并且其后在99.5%乙醇中完全沉淀的样品具有与其他绳完全不同的外观;平坦且薄的带状,而没有捆绑结构。

[0302] 实施例11-在疏水表面上布置期望的形状

[0303] 沉淀方式的效果通过比较以下两个程序来测试:

[0304] (I):1)挤出-2)放置于PE膜上-3)在99.5%乙醇中沉淀(c.f.实施例10)

[0305] (II):1)挤出-2)自由落下通过99.5%乙醇-3)降落在PE膜上

[0306] 收集得到的沉淀的绳并且使用光学显微镜视觉地评价。还评价在处理绳时的感官感觉。可以得出结论,在第一类型的沉淀程序(I)中,实现平滑且平坦的绳,而在第二类型的沉淀程序(II)中,获得脆性且不平坦的具有突起部的绳。

[0307] 实施例12-大鼠中的皮下注射

[0308] 以与在实施例7中描述基本上相同的方式制备的凝胶制剂通过无毛大鼠(斯普拉格-杜勒鼠)中皮下注射来进行体内测试。观察到的是,植入的凝胶的绳形状(图6的A)在6个月之后(图6的B)保持在大鼠的皮下区域中。图6的A示出在通过18G插管挤出之后在Milli-RX中稀释的且用甲苯胺蓝着色的绳(非外植体)。图6的B示出在6个月之后从大鼠的皮下区域外植入的相同的绳批次。

[0309] 得出结论,绳形状在通过针挤出以及在大鼠中6个月之后被保持。

[0310] 实施例13-比较实施例

[0311] US 2012/0034462 A1在没有实验证据下提出,交联的HA凝胶的薄线可以通过使交联的HA凝胶的固体块通过筛或网状物来产生。为了测试此理论,根据US 2012/0034462 A1

的实施例1 (HA MW 3MDa;BDDE 75mg/g HA;温度50°C持续2小时) 来制备凝胶。将水凝胶通过32 $\mu$ m或63 $\mu$ m网筛一次。

[0312] 得到的HA凝胶结构在图7中以10 $\times$ 放大倍数示出, (A) 32 $\mu$ m网状物大小; (B) 63 $\mu$ m网状物大小 (巴 = 2mm)。得到的颗粒不显示任何有序的结构, 并且特别地没有任何长形的形状。

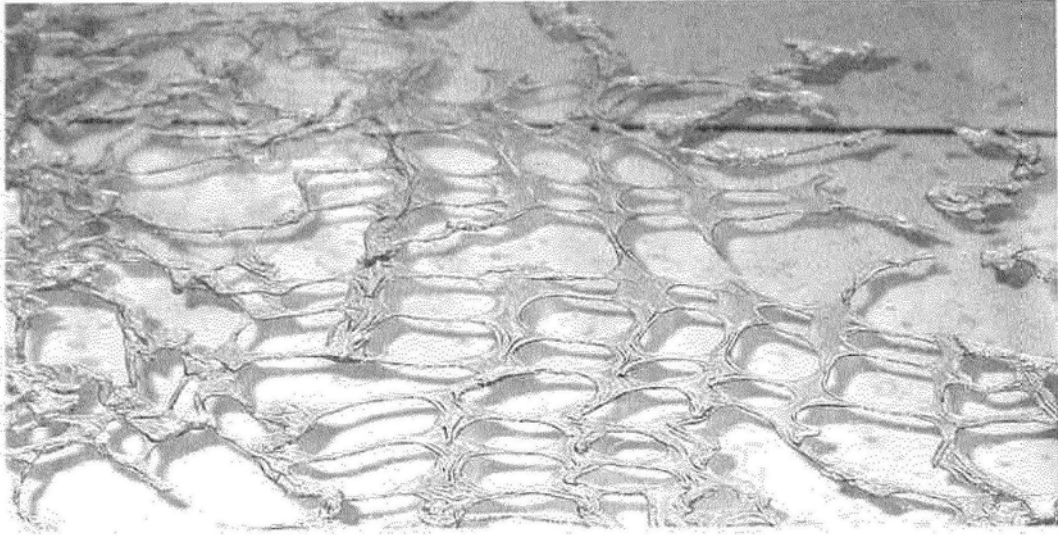


图1

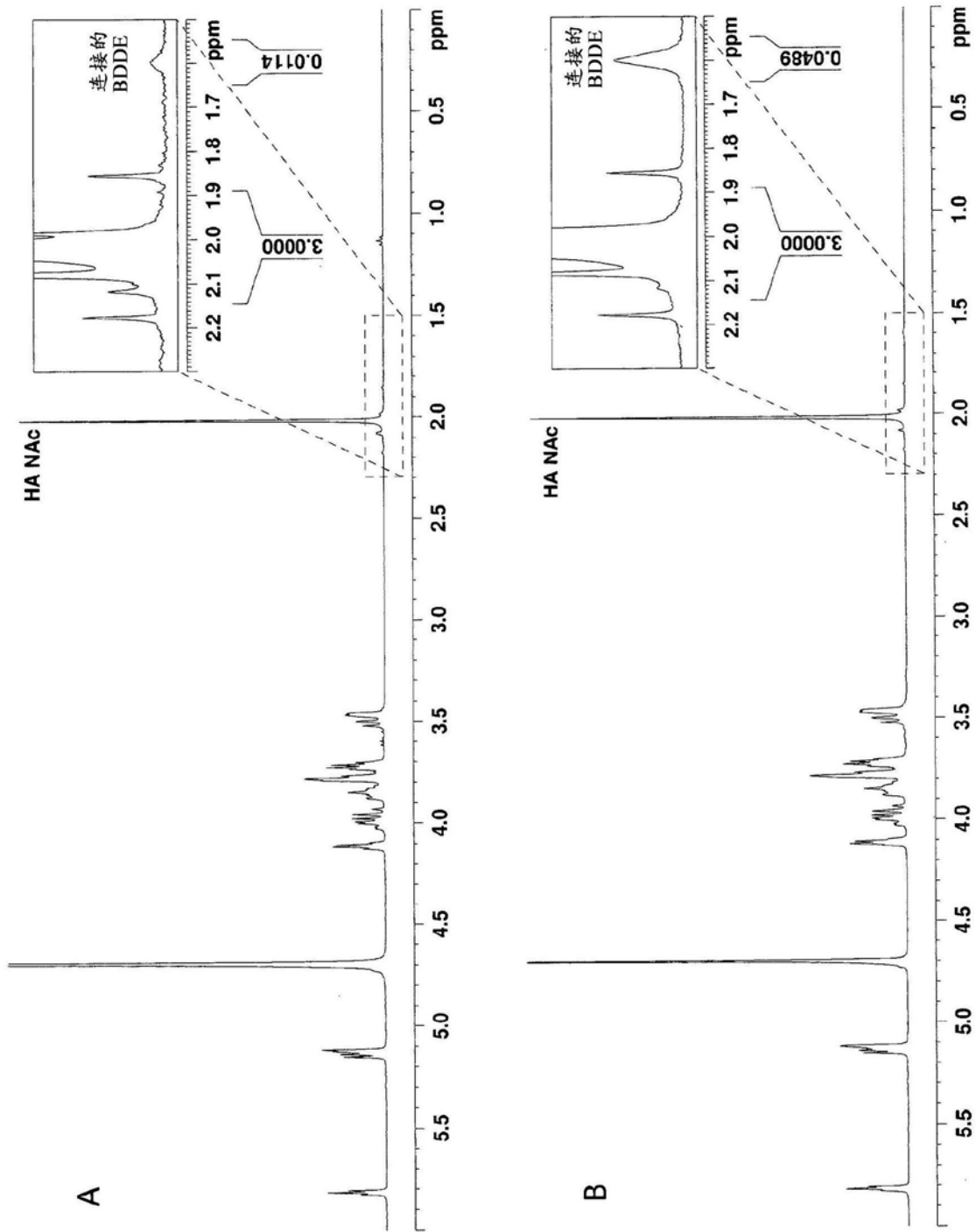


图2

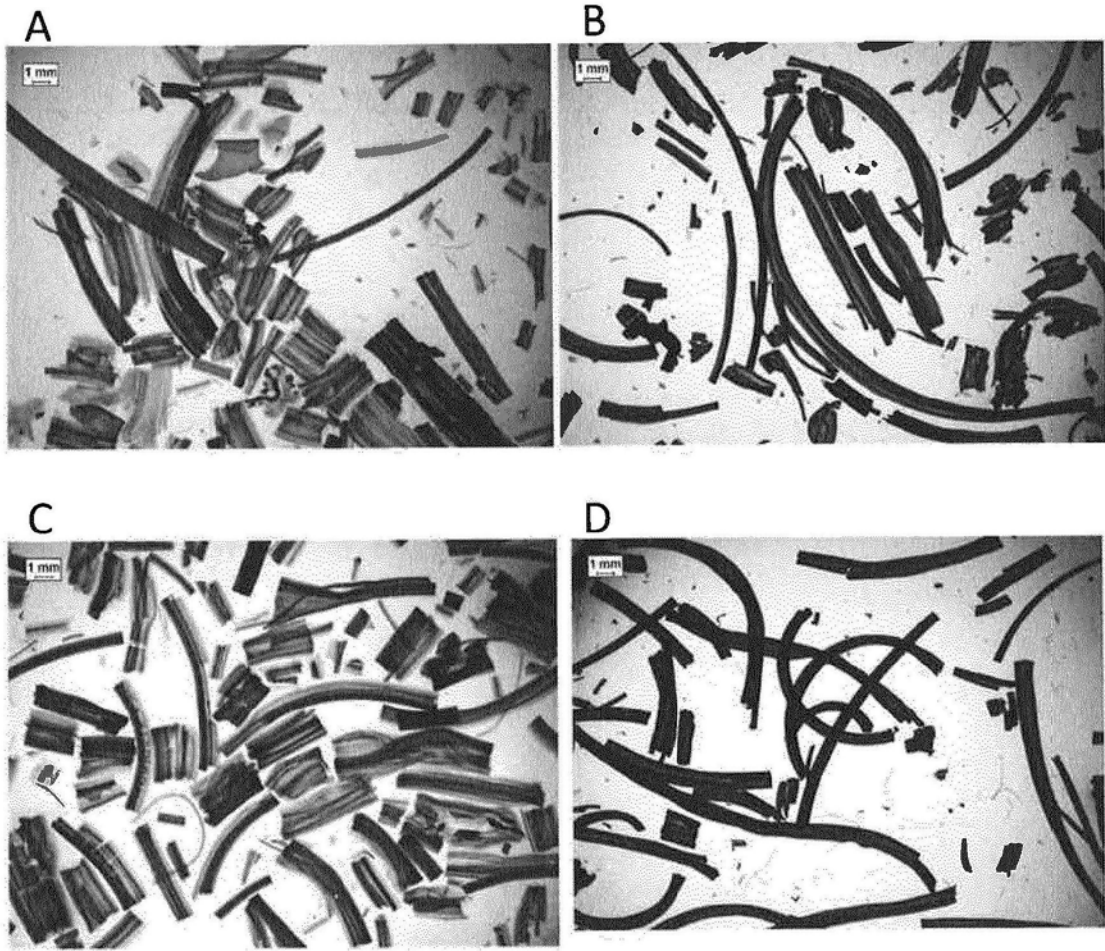


图3

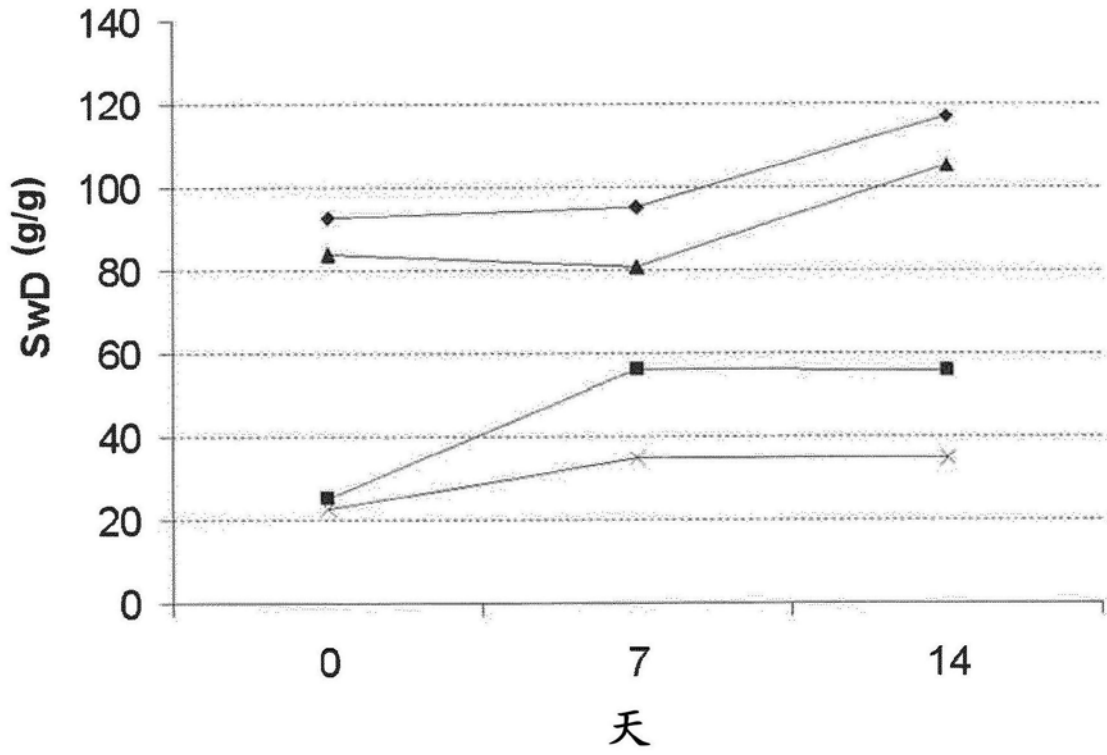


图4

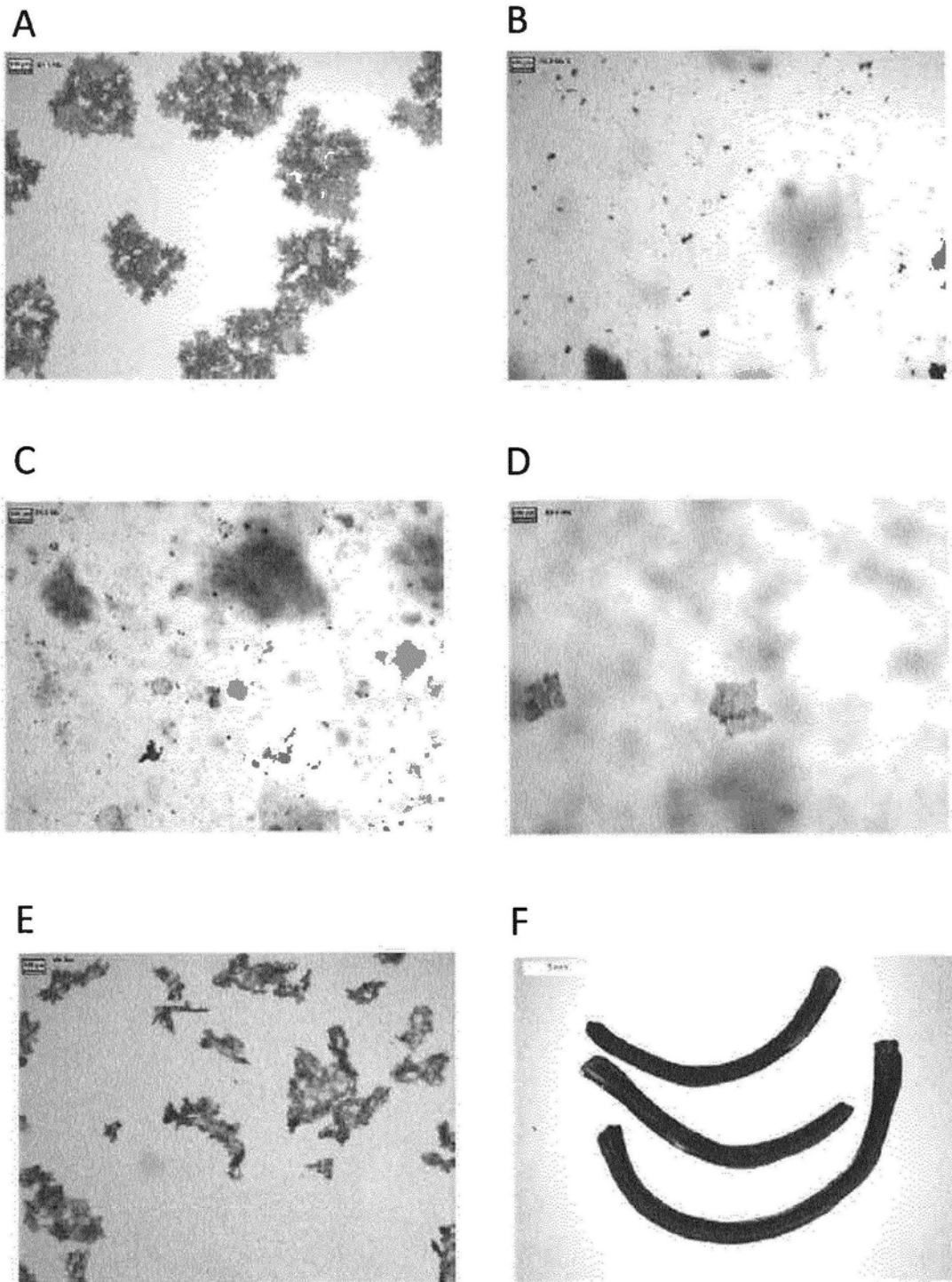


图5

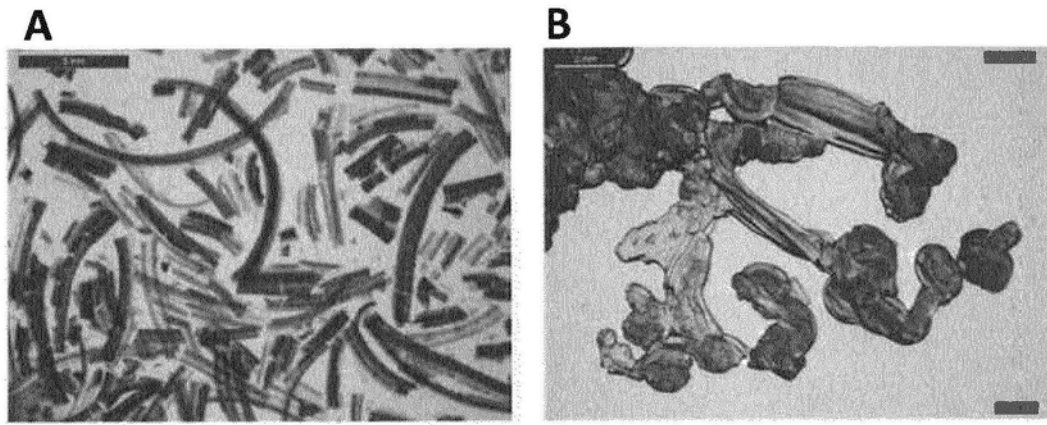


图6

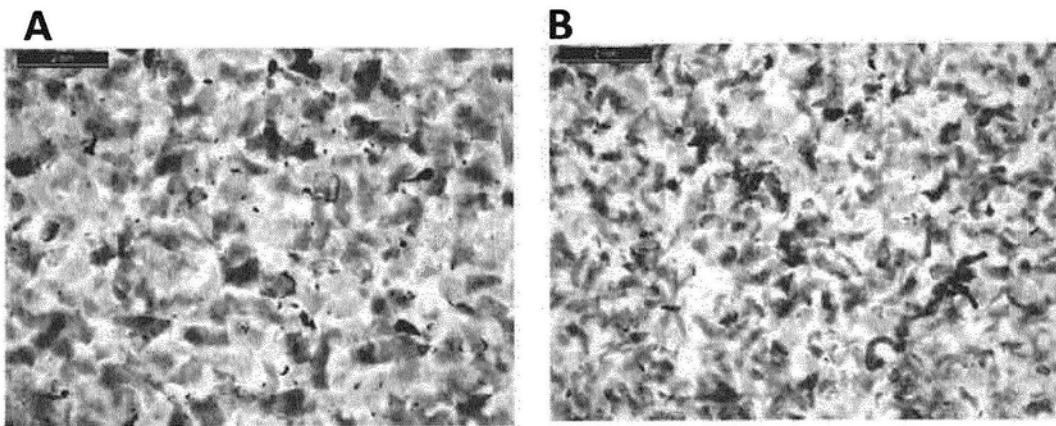


图7