



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114828902 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 29

(21) 申请号 202080087550.5

(22) 申请日 2020.12.17

(30) 优先权数据

102019000024208 2019.12.17 IT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/086691 2020.12.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/122934 EN 2021.06.24

(71) 申请人 阿尔特刚股份有限公司

地址 瑞士卢加诺

(72) 发明人 A·M·焦里

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 宋卫霞 黄革生

(51) Int.Cl.

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

用于皮肤-美容的可注射的透明质酸混合物

(57) 摘要

本发明公开了可注射的皮肤-美容制剂,其包含至少一种未修饰的高分子量线性透明质酸或透明质酸盐与至少一种未修饰的低分子量线性透明质酸或透明质酸盐或非硫酸化的软骨素的水溶液。本发明的组合物可用作具有优异安全性、在应用位置具有足够保留时间和有限的挤出力的填充剂。

1. 可注射的皮肤-美容制剂,其包含至少一种高分子量线性透明质酸或透明质酸盐与至少一种低分子量线性透明质酸或透明质酸盐或非硫酸化的软骨素的水溶液,所述高分子量线性透明质酸或透明质酸盐是通过发酵或提取获得的且未经化学或化学-物理交联处理、且平均分子量 M_w 为1000-6000kDa,所述低分子量线性透明质酸或透明质酸盐是通过发酵或提取获得的且未经化学或化学-物理交联处理、且平均分子量 M_w 为10-300kDa,其特征在于挤出力不超过40N且体内保留时间不少于9周。

2. 根据权利要求1的制剂,其包含至少两种不同的高分子量线性透明质酸或透明质酸盐。

3. 根据权利要求1或2的制剂,其中高分子量透明质酸和低分子量透明质酸的混合物或高分子量透明质酸和非硫酸化的软骨素的混合物的总浓度等于或大于1.5%w/v。

4. 根据权利要求1-3的制剂,其中低分子量线性透明质酸或透明质酸盐具有20至150kDa,优选50至100kDa,最优选70至90kDa的平均分子量 M_w 。

5. 权利要求1、2、3或4的制剂,其中高分子量线性透明质酸或透明质酸盐具有1000至4500kDa,优选1000至3500kDa的平均分子量 M_w 。

6. 根据权利要求1至5中一项或多项的制剂,其中低分子量线性透明质酸或透明质酸盐具有70至90kDa的平均分子量 M_w ,且高分子量线性透明质酸或透明质酸盐具有1000至3500kDa的平均分子量 M_w 。

7. 权利要求1至6中一项或多项的制剂,其中低分子量透明质酸盐或非硫酸化的软骨素与高分子量透明质酸盐的比例范围可以为1:10至10:1。

8. 根据权利要求1至7中一项或多项的制剂,其还包含磷脂。

9. 非治疗性、非手术性的美容或美感组织扩充处置方法,所述方法包括将权利要求1-8的制剂注射至个体的皮肤、唇或粘膜中。

用于皮肤-美容的可注射的透明质酸混合物

[0001] 本发明涉及可注射的皮肤-美容制剂,其包含未修饰的高分子量线性透明质酸或透明质酸盐与未修饰的低分子量线性透明质酸或透明质酸盐或非硫酸化的软骨素的水溶液。

现有技术

[0002] 生物聚合物如透明质酸和胶原蛋白的局部注射广泛用于美容医学中,用于各种矫正手术,如增加嘴唇或颧骨的体积,并且通常用于矫正瑕疵如皱纹、眼袋、疤痕等。市场上有许多称为填充物的产品,通常是预填充的注射器形式,其允许将所需量的生物聚合物注射或皮下植入待矫正的区域。鉴于透明质酸的生物相容性和耐受性的特征,透明质酸是用于该目的最合适的聚合物。基于HA的填充物描述于例如US 2012/0225842中,而基于其它生物聚合物的填充物描述于US 6,921,819、US 2013/0244943和de Melo,F.等,“Investigation of physical properties of a polycaprolactone dermal filler when mixed with lidocaine and lidocaine/epinephrine.”Dermatology and therapy 2.1(2012):13中。所述参考文献还讨论了粘性凝胶的挤出力的重要性,其必须与在所需部位的手动注射模式匹配。

[0003] 通过提取或发酵获得的天然透明质酸在体内经历快速代谢。Reed等人,在American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology第259卷,第2期,1990年8月,第532-535页中证明了即使在高达10mg/ml或更高的相对高浓度下,注射入兔真皮的透明质酸的保留时间也非常短。用较低浓度也得到了类似的结论(Laurent U.等,Experimental Physiology(1991),76,695-703)。在Endre A.Balazs和Nancy E.Larsen,“Hyaluronan:Aiming for Perfect Skin Regeneration”,Scarless Wound Healing-basic and clinical dermatology,Marcel Dekker,USA,2000,第14页的综述中讨论了皮肤中透明质酸盐的代谢:透明质酸的半衰期为2-4天;其10-25%的降解发生在皮肤中,其余的发生在淋巴结和肝中。

[0004] Romagnoli M等人的综述(“Hyaluronic acid-based fillers:theory and practice.”Clinics in dermatology 26.2(2008):123-159)报道了透明质素在循环中的半衰期为3-5分钟,在皮肤中少于一天,在软骨组织中为1-3周。分解代谢活性主要是由于透明质酸酶,一种广泛存在于体内的内切糖分解酶(endoglycolytic enzyme)。

[0005] 已经提出了化学修饰透明质酸以使它们更稳定并且较少经受酶促降解,由此避免天然透明质酸的低稳定性。交联或自动交联是最常用的技术之一。Collins等人J Mater Sci:Mater Med(2008)19:3335-3343)报道,交联通过改变天然透明质酸盐的典型特性并增加其代谢稳定性而产生不同的特性,这取决于交联如何进行,所述特性对于在填充剂中的应用是至关重要的。

[0006] 在各种出版物中,例如在Clinical,Cosmetic and Investigational Dermatology,2011,4,197-205中讨论了用于交联用作皮肤填充剂的透明质酸的技术的重要性。

[0007] 此外,交联改变了天然分子的结构,并因此改变了其性质,增加了其免疫原性,并因此使其生物相容性和安全性恶化。

[0008] 基于交联透明质酸的填充剂的使用涉及副作用,例如水肿或局部反应,如在“Complications in Cosmetic Dermatology-crafting cures”,Ganesh S.Pai编辑,The Health Sciences Publisher,New Delhi,2016中所述。坏死反应也更容易与交联产品的刚性相关,如在“Cosmetic dermatology:principles and practice”,Leslie Baumann, Marianna Blyumin, Sogol Saghari, Ed. Baumann, 2009, McGraw-Hill Professional, 191-211中所报道。

[0009] 因此,需要基于天然透明质酸的填充剂,其保证优异的安全性,确保在应用部位的足够的保留时间,并且具有有限的挤出力。

[0010] 发明描述

[0011] 现已发现,具有不同分子量的未化学修饰的透明质酸(HA)的混合物显著增加了在体内的保留时间,并将挤出力保持在与皮下施用相容的舒适限度内。

[0012] 相反,如果只使用单一类型的HA,通过调节分子量和浓度可以增加保留时间。然而,尽管所述两个参数的同时增加也延长了保留时间,但粘度和挤出力成比例地增加到与皮肤-美容中的可注射用途不相容的水平。

[0013] 相反,使用HA的二元或三元混合物,其特征在于具有不同分子量的级分的混合物,增加了保留时间,同时保持粘度和挤出力在控制之下,使得它们保持在可接受的限度内。

[0014] 因此,本发明的目的是可注射的皮肤-美容制剂(皮肤填充剂),其包含至少一种未修饰的高分子量线性透明质酸与至少一种未修饰的低分子量线性透明质酸或非硫酸化的软骨素的水溶液。

[0015] 本发明的溶液具有不超过40N的挤出力和不少于9周的体内保留时间。

[0016] 由27G针头用注射速率10mm/min测定挤出力,所述针头具有例如13mm的长度,并装在1ml玻璃注射器上。

[0017] 高分子量和低分子量透明质酸或高分子量透明质酸和非硫酸化的软骨素的混合物的总浓度等于或大于1.5%w/v (15mg/ml),并且通常在1.5至7%重量/体积的范围内。

[0018] “未修饰的直链透明质酸”在此是指通过发酵或提取获得的并且不进行任何种类的化学或化学-物理交联处理的透明质酸或透明质酸级分及其盐(优选钠盐)。

[0019] 低分子量线性透明质酸或透明质酸盐具有范围为10-300kDa,优选20至150kDa,更优选50至100kDa,最优选70至90kDa的平均分子量Mw。

[0020] 高分子量线性透明质酸或透明质酸盐具有范围1000至6000kDa,优选1000至4500kDa,最优选1000至3500kDa的平均分子量Mw。

[0021] 根据本发明的优选组合物包含平均分子量Mw为70至90kDa的低分子量线性透明质酸或透明质酸盐,与平均分子量Mw为1000至3500kDa的高分子量线性透明质酸或透明质酸盐。

[0022] 本发明的另一种优选组合物包含至少两种不同的未修饰的高分子量线性透明质酸或透明质酸盐。

[0023] MW是从特性粘度 η (根据EP计算)用Mark-Houwink-Sakurada方程测定的,其中 $\eta = KM^a$ (在标准ASTM F2347-15中报道的方程)。

[0024] 低分子量透明质酸盐与高分子量透明质酸盐的比例可为1:10至10:1,优选为1:5至5.1,更优选为1:3至3.1。如果低分子量透明质酸被非硫酸化的软骨素代替,也适用相同的比例。

[0025] 本发明的制剂还可以含有通常用于填充剂和皮肤-美容的其它成分,例如磷脂酰胆碱或其它磷脂、局部麻醉剂、抗菌剂、防腐剂等。

[0026] 为了用于皮肤-美容应用,将通过常规方法(辐射、在高压釜中灭菌等)适当灭菌的制剂在装有适于所需应用的尺寸的针头的预填充注射器中施用。本发明的一个方面还涉及非治疗性、非外科手术的组织的扩充处置方法,所述方法包括将本发明的制剂注射到个体的皮肤、嘴唇或粘膜中。

[0027] 在以下实施例中更详细地描述本发明。

[0028] 比较例1-含有单一透明质酸钠聚合物的可注射制剂的制备

[0029] 将分子量为70kDa的透明质酸钠聚合物以32和45mg/ml的浓度溶解于盐水溶液中。在超过120℃的T下最终灭菌后,获得两种澄清溶液,称为HA LMW 3.2%和HA LMW 4.5%。

[0030] 将分子量为1,700kDa的透明质酸钠聚合物以20、32和45mg/ml的浓度溶解于盐水溶液中。在高压釜中于大于120℃的T下灭菌后,在最低浓度的情况下得到透明的粘性溶液,称为HA HMW 2.0%,在最高浓度的情况下得到两个高粘度凝胶(制剂称为HA HMW 3.2%和HA HMW 4.5%)。

[0031] 所有的制剂都在25℃使用装有锥/板系统的流变仪(Modular Compact Rheometer MCR302,Anton Paar)进行检测,以通过旋转分析测定其在低剪切速率(0.01 s^{-1})下的动态粘度。

[0032] 此外,用**INSTRON®**-mod.5942测力计测定从1ml玻璃注射器挤出制剂所需的力,使用10mm/min的注射速度,注射器上装有长度为13mm的27G针头。结果列于下表1中

[0033] 表1

[0034]	样品	挤出力 (10 mm/min)	动态粘度 (在 0.01 s^{-1})
	HA LMW 3.2%	< 2 N	<1 Pa*s
	HA LMW 4.5%	< 2 N	<1 Pa*s
	HA HMW 2.0%	8.6 N	28 Pa*s
	HA HMW 3.2%	51 N	101 Pa*s
	HA HMW 4.5%	> 60 N	250 Pa*s

[0035] HA HMW 3.2%和HA HMW 4.5%制剂的粘度和挤出力对于真皮内施用来说太高。特别是,大于40N的挤出力与正常的面部注射操作不相容,在这种情况下精确测量注射体积所需的精度非常高。为此,放弃了HA HMW4.5%的制剂,而在实施例3中仅使用HA HMW 3.2%的制剂作为实验比较。

[0036] 比较例2-含有交联透明质酸钠的可注射制剂的制备

[0037] 根据US 6,921,819(实施例1)中描述的方法,使分子量为1,700kDa的透明质酸钠

聚合物与1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)反应。这样得到交联透明质酸在盐水溶液中的粘稠溶液,浓度为25mg/ml。在121℃的高压釜中灭菌后,得到称为HA CL 2.5%的产物,其在25℃在0.01s⁻¹下的动态粘度为1648Pa*s,并且挤出力(以10mm/min的速率)测定为34N。

[0038] 比较例3-动物模型

[0039] 在Merola,F.等人“A novel animal model for residence time evaluation of injectable hyaluronic acid-based fillers using high-frequency ultrasound-based approach.”Clinical,Cosmetic and Investigational Dermatology 11(2018): 339中描述的动物模型中确定实施例1和2中制备的制剂(不包括制剂HA HMW 4.5%,其不可用于皮下注射)的体内保留时间。麻醉后,给CD1小鼠背部剃毛,消毒。将分析物质注射在脊柱的两侧(200μl/侧)。将每种产品施用于6只动物的右手侧和左手侧,获得12个实验点/组。用带有27G针头的玻璃注射器进行注射,以确保所有动物的注射部位之间的距离相同,且皮下组织的形状相同。对于仅HA HMW 3.2%制剂,使用20G针头,其与皮肤-美容应用不相容,但对于将这种高粘度凝胶注射到动物中是必需的。使用装有40MHz探头的VisualSonics Vevo2100成像站系统,通过超声扫描随时间监测通过注射所研究的制剂产生的皮下块的存在和体积。每周进行一次扫描,直到信号消失。

[0040] 结果列于下表2中。

[0041] 表2

[0042]

样品	时间(周)										信号消失
	0	1	3	7	8	9	11	19	27	33	
	皮下体积(mm ³)										
HA LMW 3.2%	203	127	38	0	0	0	0	0	0	0	4 周
HA LMW 4.5%	230	151	61	0	0	0	0	0	0	0	5 周
HA HMW 2.0%	315	281	210	68	0	0	0	0	0	0	8 周
HA HMW 3.2%	318	289	231	160	75	59	0	0	0	0	11 周
HA CL 2.5%	325	410	306	260	236	231	210	115	45	18	> 33 周

[0043] 仅含有低分子量透明质酸的制剂具有短的保留时间,保留时间随着浓度略微增加。为了达到显著的保留时间(虽然远低于交联制剂),透明质酸盐的分子量和浓度必须同时增加。在具有未修饰透明质酸盐的那些制剂中显示最长保留时间的制剂是HA HMW

3.2%；然而，其粘度和挤出力对于真皮内注射使用而言太高。

[0044] 实施例4-含有透明质酸钠二元和三元混合物的可注射制剂的制备

[0045] 在所有情况下，使用具有70kDa分子量的透明质酸钠与具有较高分子量的透明质酸盐混合，制备透明质酸钠的二元溶液。具体而言，使用溶解在1L盐水溶液中的16g分子量为1,700kDa的透明质酸盐和16g分子量为70kDa的透明质酸盐制备一种溶液(样品HA HMW-LMW 3.2%)，使用溶解在1L盐水溶液中的22.5g分子量为1,700kDa的透明质酸盐和22.5g分子量为70kDa的透明质酸盐制备一种溶液(样品HA HMW-LMW 4.5%)，使用溶解在1L盐水溶液中的9g分子量为3,500kDa的透明质酸盐和6g分子量为70kDa的透明质酸盐制备一种溶液(样品VHMW-LMW 1.5%)。

[0046] 透明质酸钠的三元溶液是通过将5g分子量为3,500kDa的透明质酸钠、5g分子量为1,700kDa的透明质酸钠和5g分子量为70kDa的透明质酸钠混合并溶解在1L盐水溶液中而制备的(样品HA VHMW-HMW-LMW1.5%)。

[0047] 在大于120℃的T下终末灭菌后，获得四种澄清的粘性溶液，并检查以确定在25℃的动态粘度和挤出力。结果列于下表3中。

[0048] 表3

[0049]	样品	挤出力 (10 mm/min)	动态粘度 (在 0.01 s ⁻¹)
	HA HMW-LMW 3.2%	17.8 N	20 Pa*s
	HA HMW-LMW 4.5%	19.5 N	35 Pa*s
	HA VHMW-LMW 1.5%	10.1 N	12 Pa*s
	HA VHMW-HMW-LMW 1.5%	16.2 N	16 Pa*s

[0050] 在所有情况下，所制备的制剂都具有与真皮内注射应用相容的挤出力和粘度，即使当总透明质酸盐浓度高时也亦然。

[0051] 实施例5-含有HA混合物的制剂的保留时间

[0052] 根据实施例3中所述的研究方案，在体内测试实施例4中制备的制剂。所述测试确定三种二元制剂和三元制剂各自在注射入小鼠后的保留时间。所得保留时间列于下表4中：

[0053] 表4

[0054]

样品	时间(周)										信号消失
	0	1	3	7	8	9	11	19	27	33	
	皮下体积(mm ³)										
HA HMW-LMW 3.2%	311	303	282	105	59	41	0	0	0	0	11周
HA HMW-LMW 4.5%	312	310	305	257	242	216	206	112	29	0	29周
HA VHMW-LMW 1.5%	318	305	307	231	201	159	105	0	0	0	18周
HA VHMW-HMW-LMW 1.5%	310	315	305	238	205	165	148	121	0	0	20周

[0055] 实施例6-含有磷脂酰胆碱和软骨素的可注射制剂

[0056] 将1.6g磷脂(磷脂酰胆碱)加入1L实施例4的HA HMW-LMW 3.2%溶液中,该新溶液在高压釜中灭菌后称为HA HMW-LMW+PC。

[0057] 然后通过用分子量为80kDa的非硫酸化的软骨素代替分子量为70kDa的透明质酸,制备与实施例4(HA HMW-LMW 3.2%)相似的溶液。因此将16g非硫酸化的软骨素加入16g分子量为1,700kDa的透明质酸钠中,并将混合物溶解在1L盐水溶液中,灭菌后得到样品HA HMW+NSC。

[0058] 两种制剂都采取澄清、粘稠溶液的形式,并分析以测定在25℃下的动态粘度和挤出力。结果列于下表5中。

[0059] 表5

样品	挤出力	动态粘度
	(10 mm/min)	(在 0.01 s ⁻¹)
[0060] HA HMW-LMW + PC	16.9 N	23 Pa*s
HA HMW + NSC	18.0 N	21 Pa*s

[0061] 然后根据实施例3中所述的研究方案在体内测试这两种制剂,所得保留时间列于下表6中。

[0062] 表6

[0063]

样品	时间(周)							信号消失
	0	1	3	7	8	9	11	
	皮下体积(mm ³)							
HA HMW-LMW + PC	310	301	284	101	59	42	0	11 周
HA HMW + NSC	312	304	280	103	55	43	0	11 周

[0064] 向HA的二元混合物中加入磷脂酰胆碱,如同用另一种具有类似结构的糖胺聚糖(如非硫酸化的软骨素)代替具有较低分子量的透明质酸一样,没有改变制剂的特性。所述制剂保持与真皮内注射应用相容的挤出力和粘度,尽管体内保留时间显著增加。

[0065] 实施例7-含有HA混合物的制剂(1,500kDa HMW与110或200kDa LMW)的保留时间

[0066] 如下所述制备四种透明质酸钠的二元溶液,总是从分子量为1,500kDa的透明质酸钠起始,并加入具有较低分子量的第二种透明质酸钠:

[0067] -二元溶液HA HMW-110 3,2%:将16g分子量为1,500kDa的透明质酸盐和16g分子量为110kDa的透明质酸盐溶解于1L的盐水溶液中;

[0068] -二元溶液HA HMW-110 4,0%:将16g分子量为1,500kDa的透明质酸盐和24g分子量为110kDa的透明质酸盐溶解于1L的盐水溶液中;

[0069] -二元溶液HA HMW-200 3,2%:将21g分子量为1,500kDa的透明质酸盐和11g分子量为200kDa的透明质酸盐溶解于1L的盐水溶液中;

[0070] -二元溶液HA HMW-200 4,5%:将16g分子量为1,500kDa的透明质酸盐和29g分子量为200kDa的透明质酸盐溶解于1L的盐水溶液中。

[0071] 在大于120℃的T下最终灭菌后,获得四种澄清的粘稠溶液。对于所有溶液,在10mm/min下的挤出力在40N以下,因此根据实施例3中所述的研究方案在体内对它们进行测试。所测得的保留时间范围为11周(对于二元溶液HA HMW-110 3.2%(最低保留时间))至20周(对于二元溶液HA HMW-200 3.2%(最高保留时间))。溶液HA HMW-110 4.0%和HA HMW-200 4.5%的保留时间处于该范围之内。