



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104105474 B

(45)授权公告日 2018.04.06

(21)申请号 201280055657.7

(22)申请日 2012.09.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104105474 A

(43)申请公布日 2014.10.15

(30)优先权数据

61/534,780 2011.09.14 US

PCT/US2012/052125 2012.08.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.05.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/055211 2012.09.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/040242 EN 2013.03.21

(73)专利权人 阿勒根公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 G·N·恩吉康 俞小杰 刘福田

萨米特·包利华 N·J·马内西斯

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 孙占华 张广育

(51)Int.Cl.

A61K 8/73(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

A61K 8/67(2006.01)

A61L 27/20(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

C08B 37/08(2006.01)

(56)对比文件

US 2011/0171286 A1, 2011.07.14, 权利要求1、2、20和21, 以及说明书第64-66段.

US 2011/0171286 A1, 2011.07.14, 权利要求1、2、20和21, 以及说明书第64-66段.

CN 1918219 A, 2007.02.21, 说明书第1页第1-4行、第9页第14-18行和第11页倒数第4行至第12页第9行实施例4.

Park DJ et al. "In vitro evaluation of conjugated hyaluronic acid with ascorbic acid".《Journal of Bone and Joint Surgery》.2010, 第92B卷(第SUP1期), 第115页.

Ranella J. Hirsch et al. "Management of injected hyaluronic acid induced Tyndall effects".《Lasers in Surgery and Medicine》.2006, 第38卷第202页.

审查员 胡敬东

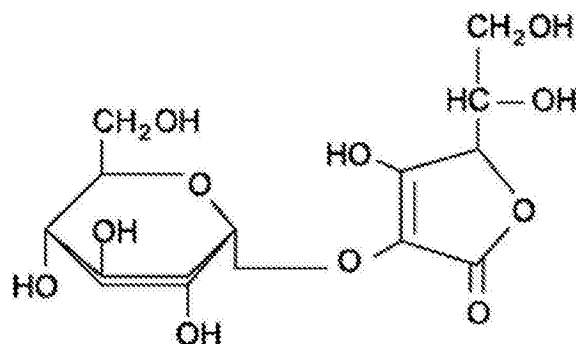
权利要求书3页 说明书34页 附图9页

(54)发明名称

用于细纹治疗的真皮填充剂组合物

(57)摘要

本发明提供了高度可注射、长效的基于透明质酸的水凝胶真皮填充剂组合物, 其对脸部细纹的修正特别有利。



AA2G, (L-抗坏血酸 2-葡萄糖苷)

1. 一种真皮填充剂组合物, 包含:
与交联组分交联的透明质酸组分;
除所述交联组分以外的添加剂;
其中所述交联组分为1,4-丁二醇二缩水甘油醚;
其中所述添加剂是L-抗坏血酸2-葡萄糖苷, 并且所述透明质酸组分与所述添加剂化学结合, 结合度介于3mol%和40mol%之间;
所述组合物光学透明; 并且
当施用到患者的真皮区内时, 相对于除没有所述添加剂外, 相同的组合物, 所述组合物表现出廷德尔效应减小;

其中所述透明质酸组分完全为低分子量HA, 所述HA的平均分子量介于100KD和500KD之间。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述透明质酸组分与所述添加剂化学结合, 结合度介于3mol%和10mol%之间。

3. 根据权利要求1所述的组合物, 进一步包含麻醉剂。

4. 根据权利要求1所述的组合物, 进一步包含利多卡因。

5. 根据权利要求1所述的组合物, 其储能模量 G' 值至多为200Pa;

G' 值是使用振荡平行板流变仪Anton Paar Physica MCR 301, 在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径, 在25℃恒温下测量的; 其中, 每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成, 接着是随应变对数增长, 5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描, 在1%应变下由应变扫描获得 G' 。

6. 根据权利要求1所述的组合物, 其储能模量 G' 值至少为25Pa且至多为200Pa;

G' 值是使用振荡平行板流变仪Anton Paar Physica MCR 301, 在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径, 在25℃恒温下测量的; 其中, 每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成, 接着是随应变对数增长, 5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描, 在1%应变下由应变扫描获得储能模量 G' 。

7. 根据权利要求1所述的组合物, 其储能模量 G' 值介于40Pa和100Pa之间;

G' 值是使用振荡平行板流变仪Anton Paar Physica MCR 301, 在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径, 在25℃恒温下测量的; 其中, 每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成, 接着是随应变对数增长, 5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描, 在1%应变下由应变扫描获得储能模量 G' 。

8. 根据权利要求1所述的组合物, 其储能模量 G' 值不大于100Pa;

G' 值是使用振荡平行板流变仪Anton Paar Physica MCR 301, 在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径, 在25℃恒温下测量的; 其中, 每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成, 接着是随应变对数增长, 5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描, 在1%应变下由应变扫描获得储能模量 G' 。

9. 根据权利要求1所述的组合物, 其储能模量 G' 值不小于40Pa;

G' 值是使用振荡平行板流变仪Anton Paar Physica MCR 301, 在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径, 在25℃恒温下测量的; 其中, 每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成, 接着是随应变对数增长, 5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描, 在

1%应变下由应变扫描获得储能模量 G' 。

10. 根据权利要求1所述的真皮填充剂组合物用于制备治疗患者皮肤上的细纹的药剂的用途, 其中:

将所述药剂引入至患者的皮肤中;

所述药剂光学透明; 并且

其中相对于除没有所述添加剂外, 相同的组合物, 所述药剂表现出廷德尔效应减小。

11. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述透明质酸组分与所述添加剂化学结合, 结合度介于3mol%和10mol%之间。

12. 一种光学透明的没有表现出或表现出不明显的廷德尔效应的真皮填充剂组合物用于制备改善面部美观的药剂的用途, 其中:

将所述药剂施用至患者的真皮区; 并且

所述组合物通过下列步骤制成:

提供透明质酸;

使交联剂与添加剂反应, 所述交联剂为1,4-丁二醇二缩水甘油醚, 所述添加剂为L-抗坏血酸2-葡萄糖苷;

将已反应的交联剂与L-抗坏血酸2-葡萄糖苷添加到所述透明质酸中以形成交联透明质酸组合物, 其中所述交联透明质酸组合物与所述L-抗坏血酸2-葡萄糖苷共价结合; 其中所述透明质酸组分与所述添加剂化学结合, 结合度介于3mol%和40mol%之间; 并且

匀化并中和所述交联透明质酸组合物以获得可注射的真皮填充剂组合物;

其中所述透明质酸组分完全为低分子量HA, 所述HA的平均分子量介于100KD和500KD之间。

13. 根据权利要求12所述的用途, 其中所述透明质酸组分与所述添加剂化学结合, 结合度介于3mol%和10mol%之间。

14. 权利要求1的光学透明的基于透明质酸的真皮填充剂组合物用于制备减少患者薄皮区中细纹出现的药剂的用途, 其中将所述药剂在不大于1mm的深度施用至所述患者。

15. 根据权利要求14所述的用途, 其中在不大于0.8mm的深度注射所述组合物。

16. 根据权利要求14所述的用途, 其中在不大于0.6mm的深度注射所述组合物。

17. 根据权利要求14所述的用途, 其中在不大于0.4mm的深度注射所述组合物。

18. 一种真皮填充剂组合物, 包含:

与交联组分交联的透明质酸组分, 其中所述交联组分为1,4-丁二醇二缩水甘油醚; 和

与所述透明质酸组分共价结合的L-抗坏血酸2-葡萄糖苷; 其中所述透明质酸组分与所述L-抗坏血酸2-葡萄糖苷化学结合, 结合度介于3mol%和40mol%之间;

所述组合物光学透明并且储能模量 G' 值介于40Pa和100Pa之间;

G' 值是使用振荡平行板流变仪Anton Paar Physica MCR 301, 在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径, 在25℃恒温下测量的; 其中, 每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成, 接着是随应变对数增长, 5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描, 在1%应变下由应变扫描获得储能模量 G' ;

其中所述透明质酸组分完全为低分子量HA, 所述HA的平均分子量介于100KD和500KD之间。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其透明质酸浓度介于18mg/g和30mg/g之间。
20. 根据权利要求18所述的组合物,其透明质酸浓度介于12mg/g和30mg/g之间。
21. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述结合度为10mol%。
22. 一种用于减少面部细纹出现的可注射组合物,所述组合物包含:
 - 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)交联的低分子量透明质酸(HA),所述HA的平均分子量介于100KD和500KD之间;和
 - 与所述透明质酸共价结合的L-抗坏血酸2-葡萄糖苷,结合度为10mol%;所述组合物的储能模量 G' 值为60Pa至80Pa;
 G' 值是使用振荡平行板流变仪Anton Paar Physica MCR 301,在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径,在25℃恒温下测量的;其中,每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成,接着是随应变对数增长,5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描,在1%应变下由应变扫描获得储能模量 G' 。
23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述HA的平均分子量介于300KD和500KD之间。
24. 根据权利要求23所述的组合物,其中所述组合物的 G' 值为80Pa。
25. 根据权利要求22所述的组合物,其光学透明。
26. 根据权利要求22所述的组合物,其HA浓度为25mg/g。

用于细纹治疗的真皮填充剂组合物

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请要求2011年9月14日提交的美国临时专利申请No.61/534,780的优先权和利益,并且是2012年8月23日提交的美国专利申请序列号13/593,313的部分继续申请,后者是2012年6月1日提交的美国专利申请序列号13/486,754的部分继续申请,其要求了2011年6月3日提交的美国临时专利申请No.61/493,309的优先权和利益,这些申请案中每一个的全部公开内容通过这种特定引用整体并入本文。

[0003] 背景

[0004] 本发明通常涉及真皮填充剂组合物,并且更具体地涉及对治疗皮肤上的细纹有效的可注射真皮填充剂组合物。

[0005] 皮肤老化是一个渐进现象,随着时间推移而发生并且受生活方式因素影响,例如饮酒、吸烟和日照。可用萎缩、松弛和肥胖表征面部皮肤的老化。萎缩对应于皮肤组织厚度的大大减小。皮下组织松弛导致皮肤过多和下垂并且导致出现脸颊和眼睑下垂。肥胖指因为面部和颈部底部肿胀而增加多余重量。这些变化通常与干燥、失去弹性和肌理粗糙相关。

[0006] 透明质酸(HA),也称为透明质烷,是广泛分布于整个人体的结缔、上皮和神经组织的非硫酸化糖胺聚糖。透明质酸在不同皮肤层中都很丰富,其中透明质酸具有多种功能,例如确保良好的水合作用,帮助细胞外基质的构成,起填充材料的作用和参与组织修复机制。然而,透明质酸、胶原蛋白、弹性蛋白和皮肤中存在的其它母体聚合物的量随年龄减少。例如,反复暴露于(例如)来自太阳的紫外光引起真皮细胞减少其透明质烷的生成以及增加了透明质烷的降解速率。这种材料损失导致各种皮肤状况,例如起皱纹、凹窝、水分流失和有助于老化出现的其它不良状况。

[0007] 可注射真皮填充剂已经成功用于治疗老化皮肤。填充剂可代替失去的内源母体聚合物,或增强/促进现有母体聚合物的功能,以便治疗这些皮肤状况。基于透明质酸的真皮填充剂已经变得越来越流行,因为透明质酸是在整个人体自然存在的物质。这些填充剂通常耐受良好、非永久性,并且是对多种皮肤状况的相当低风险的治疗。

[0008] 廷德尔效应(Tyndall effect)是在施用了基于透明质酸(HA)的真皮填充剂的一些患者中出现的不良事件。廷德尔效应特征在于,在已经注射了真皮填充剂的皮肤部位出现蓝色变色,这表示通过半透明表皮看到可见透明质酸。临床报道表明,填充剂施用技术和皮肤性质可影响这种不良事件的表现。高硬度和高弹性的填充剂成功用于修正面部上如鼻唇沟、脸颊和下巴等区域,无需对面部变色有任何担心,因为材料注射在中部和深部真皮区中。然而,当使用这些填充材料修正浅表、细小皱纹,例如泪沟、眉间纹、眼角纹、笑纹或前额,或在真皮上部区域中太浅表地错误应用时,常常观察到皮肤的浅蓝色变色。这种现象,被认为是廷德尔效应的结果,引起应用部位半永久性变色,并且有时候只有在施用了降解填充材料的透明质酸酶后消失。因此,廷德尔效应在治疗浅表细小皱纹的患者中更常见。只要凝胶维持在皮肤中,廷德尔效应表现延长,通常几个月,是患者中主要关注点的一个原因。

[0009] 已经特别配制了基于HA的真皮填充凝胶以治疗泪沟、前额、眼角纹、眉间纹等周围

发现的“细小皱纹”。市场上可买到的HA“细纹”凝胶包括Juvéderm Refine ($G' \sim 67\text{Pa}$; $G''/G' \sim 0.59$, HA浓度18mg/ml)、Belotero Soft ($G' \sim 28\text{Pa}$; $G''/G' \sim 1.1$, HA浓度20mg/ml)、Emervel Touch ($G' \sim 56\text{Pa}$; $G''/G' \sim 0.64$, HA浓度20mg/ml)、Stylage S ($G' \sim 192\text{Pa}$; $G''/G' \sim 0.20$, HA浓度16mg/ml)、Teosyal First Lines ($G' \sim 59\text{Pa}$; $G''/G' \sim 0.53$, HA浓度20mg/ml)、Restylane Touch ($G' \sim 489\text{Pa}$; $G''/G' \sim 0.24$, HA浓度18mg/ml)。虽然(例如)通过使线性HA链与少量交联剂轻微交联和/或减小这些凝胶的最终HA浓度,将这些凝胶配制成具有低弹性模量,但是大部分市场上可买到的“细纹”凝胶在一些患者中仍显示出廷德尔效应,特别是在浅表注射时,例如在小于约1mm的深度。

[0010] 在浅表皱纹的治疗中可采用基于胶原蛋白的凝胶并且似乎不会引起廷德尔效应。基于胶原蛋白的凝胶未受到高度青睐,因为它们皮肤中的持续时间相对较差并且需要在个体中预先测试。**Radiesse[®]** (羟基磷灰石钙)是皮下、可注射植入物,其主要组分是合成羟基磷灰石钙,而非透明质酸。与基于透明质酸的真皮填充剂不同,羟基磷灰石钙不透明,因此避免了廷德尔效应的并发症。然而,如果放置太浅,这种填充剂可被视为直接位于皮肤下的白色物质。此外,与基于透明质酸的填充剂相比,**Radiesse[®]**需要较长针头来注射并且通常不推荐用于眼部区域。

[0011] 将需要提供不会表现出归因于廷德尔效应的浅蓝色变色的基于透明质酸的可注射真皮填充剂。

[0012] 概述

[0013] 本发明描述了制备可在上部真皮中施用,不产生皮肤的任何浅蓝色变色,或至少不显著或不明显的浅蓝色变色的基于HA的真皮填充剂的组合物和配制方法。进一步地,已经发现目前描述的许多本发明的填充凝胶在体内持续时间明显比当前市场上可买到的凝胶更长。在本发明的一些方面,提供了对增强皮肤外观有用的光学透明的真皮填充剂,其增加了体积和丰满度,并且减少了甚至细小皱纹的出现,没有“廷德尔效应”。本组合物可引入皮肤的细纹,甚至薄皮区域中并且相当浅表,不会引起与许多常规光学透明的真皮填充剂相关的负面蓝色变色。

[0014] 更具体地,在本发明的一个方面,提供了长效治疗性真皮填充剂组合物,其通常包含生物相容性聚合物,例如交联透明质酸组分和与透明质酸组分合并的添加剂。

[0015] 在一个实施方案中,聚合物为多糖,例如透明质酸。透明质酸包括交联组分并且可进一步包括非交联组分。添加剂可包括维生素,例如维生素C(例如,稳定形式的维生素C)或维生素C衍生物(例如,L-抗坏血酸2-葡萄糖苷(AA2G)、抗坏血酸3-氨基磷酸酯(维生食物(Vitagen))或抗坏血酸磷酸钠(AA2P))。

[0016] 在本发明的一个方面,添加剂是维生素衍生物,其通过适合反应过程,例如醚化、酰胺化或酯化与聚合物共价结合。

[0017] 在本发明的一个广泛方面,提供了真皮填充剂组合物,所述组合物包含与交联组分交联的透明质酸组分和除所述交联组分以外的添加剂。透明质酸组分可与添加剂化学结合。进一步地,当施用到患者的真皮区内时,相对于除没有所述添加剂外,大体上相同的组合物,所述组合物表现出廷德尔效应减小。所述组合物可进一步包含其它添加剂,例如麻醉剂(例如利多卡因)。在一个实施方案中,添加剂是维生素C衍生物,例如AA2G。在另一实施方案中,添加剂是维生食物。

[0018] 在一个实施方案中,透明质酸组分与添加剂化学结合,结合度介于约3mol%和约40mol%之间,例如介于约3mol%和约10mol%之间。

[0019] 所述组合物可能大体上光学透明。所述组合物的G' 值通常介于约40Pa和约100Pa之间,例如不大于约100Pa,例如不小于约40Pa。

[0020] 在本发明的另一方面,提供了治疗患者皮肤上的细纹的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向患者的皮肤中引入包含透明质酸组分、交联所述透明质酸的交联组分和除所述交联组分以外的添加剂的混合物的组合物的步骤,所述组合物大体上光学透明,并且其中相对于除没有所述添加剂外,大体上相同的组合物,所述组合物表现出廷德尔效应减小。

[0021] 在本发明的另一方面,提供了改善面部美观的方法,所述方法通常包括下列步骤:向患者的真皮区施用大体上光学透明的没有表现出或表现出不明显的廷德尔效应的真皮填充剂组合物。所述组合物通过下列步骤制成:提供透明质酸,使交联剂与维生素C衍生物反应,将已反应的交联剂与维生素C衍生物添加到所述透明质酸中以形成包括共价结合的维生素C的交联透明质酸组合物;并且匀化并中和所述交联透明质酸组合物以获得可注射的真皮填充剂组合物。在一些实施方案中,维生素C衍生物是AA2G。在其它实施方案中,维生素C衍生物是维生食物。

[0022] 在本发明的又一方面,提供了减少患者薄皮区中细纹出现的方法,其中所述方法通常包括在不大于约1mm的深度,向所述患者施用真皮填充剂组合物,一种大体上光学透明的基于透明质酸的真皮填充剂组合物,其包括维生素C或维生素C衍生物。在一些实施方案中,在不大于0.8mm、不大于0.6mm或不大于0.4mm的深度注射所述组合物。

[0023] 在本发明的又一方面,提供了一种真皮填充剂组合物,其大体上光学透明并且通常包含与交联组分交联的透明质酸组分和与透明质酸组分共价结合的维生素C衍生物。在一个示例性实施方案中,所述组合物的G' 值介于约40Pa和约100Pa之间。进一步地,所述组合物的透明质酸浓度可能介于约18mg/g和约30mg/g之间。在治疗皮肤,例如,甚至非常薄的皮肤,例如厚度不大于约1mm的皮肤上的细纹或浅表皱褶中,这些组合物可能特别有用且有效。在一些实施方案中,本发明的组合物在引入皮肤后持续至少3个月,至少6个月或长达一年。

[0024] 参考下列附图和详细描述可能更容易理解和认识本发明的这些和其它方面及优点。

[0025] 附图简述

[0026] 图1是L-抗坏血酸2-葡萄糖苷(AA2G)的结构示意图。

[0027] 图2是抗坏血酸3-氨丙基磷酸酯(维生食物)的结构示意图。

[0028] 图3是抗坏血酸磷酸钠(AA2P)的结构示意图。

[0029] 图4是1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)的结构示意图。

[0030] 图5是季戊四醇缩水甘油醚(Star-PEG环氧化物)的结构示意图。

[0031] 图6是季戊四醇(3-氨丙基)醚(Star-PEG胺)的结构示意图。

[0032] 图7是示出了根据本发明所述的各种真皮填充剂组合物的结合度和G' 值的表。

[0033] 图8是示出了根据本发明所述的HA-AA2G(BDDE)真皮填充剂组合物的结合度、HA浓度和G' 值的表。

[0034] 图9是对4种不同 α -葡萄糖苷酶浓度而言,在时间方面(按分钟计),观察到的来自AA2G在PBS中的溶液的AsA释放的百分比的图形示意图。

[0035] 图10示出了来自根据本发明所述的结合真皮填充剂的游离AsA的释放曲线示意图(持续释放)(与反应时间相比的AA2G转化mol%)。

[0036] 图11A和11B示出了根据本发明所述的各种真皮填充剂的附加释放数据。

[0037] 图12示出了在浅表注射本发明基于HA的真皮填充凝胶和一些市场上可买到的供细纹应用的凝胶后,皮肤的图像。

[0038] 图13示出了本发明基于HA的真皮填充凝胶和某些市场上可买到的供细纹应用的凝胶的视觉廷德尔得分。

[0039] 图14示出了本发明基于HA的真皮填充凝胶和一些市场上可买到的供细纹应用的凝胶从皮肤出射的蓝光%。

[0040] 图15示出了植入本发明基于HA的真皮填充凝胶和一些市场上可买到的供细纹应用的凝胶1周后,剩余凝胶的总%。

[0041] 图16示出了在植入本发明基于HA的真皮填充凝胶和一些市场上可买到的供细纹应用的凝胶第0周、第12周、第24周和第40周,剩余凝胶的总%。

[0042] 详述

[0043] 在本发明的一个方面,提供了真皮填充剂组合物,所述组合物通常包含生物相容性聚合物,例如多糖(例如交联透明质酸)和与所述聚合物共价结合的维生素C衍生物。所述组合物提供了持续释放供皮肤胶原蛋白增生的维生素C以及其它治疗或美容利益。当引入皮肤时,例如皮内,所述组合物与体内的内源性酶反应,并且随时间推移,经酶裂解在体内生成生物活性维生素C。因为在几周或几个月内维生素C从所述组合物释放,使得随之而来的利益对身体可用。

[0044] 所述聚合物可选自蛋白质、肽和多肽、聚赖氨酸、胶原蛋白、前胶原蛋白、弹性蛋白和层粘连蛋白。

[0045] 所述聚合物可选自具有羟基、胺和羧基官能团的合成聚合物:聚(乙烯醇)、聚乙二醇、聚乙烯胺、聚烯丙胺、去乙酰基聚丙烯酰胺、聚丙烯酸和聚甲基丙烯酸。所述聚合物可选自树枝状或支化聚合物,包括树枝状多元醇和树枝状聚胺。所述聚合物可选自具有羟基、胺和羧基官能团的固体表面。

[0046] 所述聚合物可为多糖,例如选自下列组的多糖,包括淀粉及其衍生物;葡聚糖及其衍生物;纤维素及其衍生物;几丁质、壳聚糖和藻酸盐及其衍生物。

[0047] 在本发明的一个示例性实施方案中,所述聚合物为糖胺聚糖。本文公开的水凝胶组合物可进一步包含两种或更多种不同的糖胺聚糖聚合物。如本文所使用,术语“糖胺聚糖”与“GAG”和“粘多糖”同义并且指重复二糖单元组成的长直链多糖。重复单元由与己糖胺(含氮的六碳糖)及其药学上可接受的盐连接的己糖(六碳糖)或己糖醛酸组成。GAG家族成员在其所含的己糖胺、己糖或己糖醛酸单元的类型上不同,例如葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖、半乳糖胺、葡萄糖胺并且在配糖键的几何形态上也可能不同。任何糖胺聚糖聚合物在本文公开的水凝胶组合物中均有用,条件是糖胺聚糖聚合物改善皮肤状况。糖胺聚糖的非限制性实例包括硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、透明质烷。糖胺聚糖可接受的盐的非限制性实例包括钠盐、钾盐、镁盐、钙盐及其组合。例如,在Piron和Tholin,

Polysaccharide Crosslinking,Hydrogel Preparation,Resulting Polysaccharides(s) and Hydrogel(s),uses Thereof,美国专利公布2003/0148995;Lebreton,Cross-Linking of Low and High Molecular Weight Polysaccharides Preparation of Injectable Monophase Hydrogels;Lebreton,Viscoelastic Solutions Containing Sodium Hyaluronate and Hydroxypropyl Methyl Cellulose,Preparation and Uses,美国专利公布2008/0089918;Lebreton,Hyaluronic Acid-Based Gels Including Lidocaine,美国专利公布2010/0028438;和Polysaccharides and Hydrogels thus Obtained,美国专利公布2006/0194758;和Di Napoli,Composition and Method for Intradermal Soft Tissue Augmentation,国际专利公布W02004/073759中描述了在本文公开的水凝胶组合物和方法中有用的糖胺聚糖及其所得聚合物,其各自据此通过引用整体并入。在本文公开的水凝胶组合物和方法中有用的GAG在市场上可买到,例如基于透明质烷的真皮填充剂 JUVEDERM[®]、JUVEDERM[®] 30、JUVEDERM[®] Ultra、JUVEDERM[®] Ultra Plus、JUVEDERM[®] Ultra XC和 JUVEDERM[®] Ultra Plus XC(Allergan Inc,Irvine, California)。表1列出了代表性GAG。

表1. GAG的实例				
名称	己糖醛酸/ 己糖	己糖胺	配糖键几何形 态	特征
硫酸软骨素	GlcUA 或 GlcUA(2S)	GalNAc 或 GalNAc(4S) 或 GalNAc(6S) 或 GalNAc(4S,6S)	-4GlcUAβ1-3G alNAcβ1-	最普遍的GAG
硫酸皮肤素	GlcUA 或 IdoUA 或 IdoUA(2S)	GalNAc 或 GalNAc(4S) 或 GalNAc(6S) 或 GalNAc(4S,6S)	-4IdoUAβ1-3G alNAcβ1-	虽然一些己糖醛酸单糖可为葡萄糖醛酸。但是与硫酸软骨素不同之处在于存在艾杜糖醛酸。
硫酸角质素	Gal 或 Gal(6S)	GlcNAc 或 GlcNAc(6S)	-3Gal(6S)β1-4G lcNAc(6S)β1-	II型硫酸角质素可能经岩藻糖基化。
肝素	GlcUA 或 IdoUA(2S)	GlcNAc 或 GlcNS 或 GlcNAc(6S) 或 GlcNS(6S)	-4IdoUA(2S)α1 -4GlcNS(6S)α1	任何已知生物分子的最高负电荷密度
硫酸乙酰肝素	GlcUA 或 IdoUA 或 IdoUA(2S)	GlcNAc 或 GlcNS 或 GlcNAc(6S) 或 GlcNS(6S)	-4GlcUAβ1-4Glc NAcα1-	在结构上与肝素高度相似。然而硫酸乙酰肝素二糖单元组织成不同的硫酸化和非硫酸化结构域。
透明质烷	GlcUA	GlcNAc	-4GlcUAβ1-3Glc NAcβ1-	仅专门非硫酸化的GAG
GlcUA=β-D-葡萄糖醛酸 GlcUA(2S)=2-O-磺基-β-D-葡萄糖醛酸 IdoUA=α-L-艾杜糖醛酸 IdoUA(2S)=2-O-磺基-α-L-艾杜糖醛酸 Gal=β-D-半乳糖 Gal(6S)=6-O-磺基-β-D-半乳糖 GalNAc=β-D-N-乙酰半乳糖胺 GalNAc(4S)=β-D-N-乙酰半乳糖胺-4-O-硫酸酯 GalNAc(6S)=β-D-N-乙酰半乳糖胺-6-O-硫酸酯 GalNAc(4S,6S)=β-D-N-乙酰半乳糖胺-4-O,6-O-硫酸酯 GlcNAc=α-D-N-乙酰葡萄糖胺 GlcNS=α-D-N-磺基葡萄糖胺 GlcNS(6S)=α-D-N-磺基葡萄糖胺-6-O-硫酸酯				

[0048]

[0049] 本发明的方面部分地提供了包含硫酸软骨素聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“硫酸软骨素聚合物”指可变长度的无支链的、硫酸化聚合物,其包含两个交替单糖即D-葡萄糖醛酸(GlcA)和N-乙酰基-D-半乳糖胺(GalNAc)及其药学上可接受的盐的二糖。硫酸软骨素聚合物也可包括差向异构化为L-艾杜糖醛酸(IdoA)的D-葡萄糖醛酸残基,在这种情况下将所得二糖称为硫酸皮肤素。硫酸软骨素可具有超过100个单独糖的链,其各自以可变位置和量硫酸化。硫酸软骨素聚合物是软骨的重要结构组分并且提供了其对压缩的许多抗性。任何硫酸软骨素聚合物在本文公开的组合物中均有用,条件是硫酸软骨素聚合物改善皮肤状况。硫酸软骨素药学上可接受的盐的非限制性实例包括硫酸软骨素钠、硫酸软骨素钾、硫酸软骨素镁、硫酸软骨素钙及其组合。

[0050] 本说明书的方面部分地提供了包含硫酸角质素聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“硫酸角质素聚合物”指包含二糖单元的可变长度的聚合物,其本身包括 β -D-半乳糖和N-乙酰基-D-半乳糖胺(GalNAc)及其药学上可接受的盐。硫酸角质素重复区内的二糖可能经岩藻糖基化并且N-乙酰神经氨酸盖在链的末端。任何硫酸角质素聚合物在本文公开的组合物中均有用,条件是硫酸角质素聚合物改善皮肤状况。硫酸角质素药学上可接受的盐的非限制性实例包括硫酸角质素钠、硫酸角质素钾、硫酸角质素镁、硫酸角质素钙及其组合。

[0051] 本说明书的方面部分地提供了包含透明质烷聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“透明质烷聚合物”与“HA聚合物”、“透明质酸聚合物”和“透明质酸盐聚合物”同义,指包含二糖单元的阴离子、非硫酸化糖胺聚糖聚合物,其本身包括通过交替的 β -1,4和 β -1,3糖苷键连接在一起的D-葡萄糖醛酸和D-N-乙酰葡萄糖胺单体及其药学上可接受的盐。可从动物和非动物来源纯化透明质烷聚合物。透明质烷的聚合物尺寸范围可从约5,000Da到约20,000,000Da。任何透明质烷聚合物在本文公开的组合物中均有用,条件是透明质烷改善皮肤状况。透明质烷药学上可接受的盐的非限制性实例包括透明质烷钠、透明质烷钾、透明质烷镁、透明质烷钙及其组合。

[0052] 本说明书的方面部分地提供了包含交联糖胺聚糖聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“交联”指分子间键将单独的聚合物分子或单体链连接成像凝胶一样更稳定的结构。因而,交联糖胺聚糖聚合物具有将至少一个单独聚合物分子连接到另一个的至少一个分子间键。糖胺聚糖聚合物的交联通常导致水凝胶形成。此类水凝胶粘度高并且需要相当大的力挤出细针。可使用二醛和二硫化物交联剂交联本文公开的糖胺聚糖聚合物,包括但不限于多功能PEG基交联剂、二乙烯砜、缩水甘油醚和双环氧化物、双碳二亚胺。透明质烷交联剂的非限制性实例包括多功能PEG基交联剂,如季戊四醇四缩水甘油醚(PETGE)、二乙烯砜(DVS)、1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1,2-双(2,3-环氧丙氧基)乙烯(EGDGE)、1,2,7,8-二环氧辛烷(DEO)、(亚苯基双-(乙基)-碳二亚胺和1,6亚己基双(乙基碳二亚胺)、己二酰肼(ADH)、双(磺基琥珀基)辛二酸酯(BS)、己二胺(HMDA)、1-(2,3-环氧丙氧基)-2,3-环氧环己烷、赖氨酸、赖氨酸甲酯或其组合。在Stroumpoulis和Tezel, Tunably Crosslinked Polysaccharide Compositions, 2010年10月22日提交的美国专利申请12/910,466中公开了其它有用的交联剂,其通过引用整体并入。例如,在Piron和Tholin, Polysaccharide Crosslinking, Hydrogel Preparation, Resulting Polysaccharides(s) and Hydrogel(s), uses Thereof, 美国专利公布2003/0148995; Lebreton, Cross-Linking of Low and

High Molecular Weight Polysaccharides Preparation of Injectable Monophase Hydrogels;Lebreton,Viscoelastic Solutions Containing Sodium Hyaluronate and Hydroxypropyl Methyl Cellulose,Preparation and Uses,美国专利公布2008/0089918;Lebreton,Hyaluronic Acid-Based Gels Including Lidocaine,美国专利公布2010/0028438;和Polysaccharides and Hydrogels thus Obtained,美国专利公布2006/0194758;和Di Napoli,Composition and Method for Intradermal Soft Tissue Augmentation,国际专利公布W02004/073759中描述了交联糖胺聚糖聚合物的方法的非限制性实例,以及在本文公开的组合物和方法中有用的糖胺聚糖聚合物,其各自据此通过引用整体并入。

[0053] 本说明书的方面部分地提供了包含具有一定交联度的交联糖胺聚糖聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“交联度”指糖胺聚糖聚合物单体单元,例如与交联剂结合的透明质烷二糖单体单元的百分比。交联度表示为交联剂与糖胺聚糖的重量百分比。在本发明的某些有利实施方案中,交联度介于约3%和约12%之间,例如介于约5%和约10%之间。

[0054] 在一个实施方案中,水凝胶组合物包含交联糖胺聚糖聚合物,例如交联透明质酸,其中所述组合物中存在的所述交联糖胺聚糖聚合物的浓度(例如)介于约18mg/g和约30mg/g之间。在一些实施方案中,所述组合物的透明质酸总浓度为约24mg/g或约25mg/g。

[0055] 本说明书的方面部分地提供了包含低分子量的透明质烷聚合物、高分子量的透明质烷聚合物或低分子量和高分子量的透明质烷聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,当提及“透明质烷”时术语“高分子量”指平均分子量为1,000,000Da或更高的透明质烷聚合物。高分子量透明质烷聚合物的非限制性实例包括约1,500,000Da、约2,000,000Da、约2,500,000Da、约3,000,000Da、约3,500,000Da、约4,000,000Da、约4,500,000Da和约5,000,000Da的透明质烷聚合物。如本文所使用,当提及“透明质烷”时术语“低分子量”指平均分子量小于1,000,000Da的透明质烷聚合物。低分子量透明质烷聚合物的非限制性实例包括约200,000Da、约300,000Da、约400,000Da、约500,000Da、约600,000Da、约700,000Da、约800,000Da和约900,000Da的透明质烷聚合物。

[0056] 在一个实施方案中,组合物包含低分子量的交联透明质烷聚合物。在该实施方案的方面,组合物包含平均分子量为(例如)约100,000Da、约200,000Da、约300,000Da、约400,000Da、约500,000Da、约600,000Da、约700,000Da、约800,000Da或约900,000Da的交联透明质烷聚合物。在该实施方案的其它方面,组合物包含平均分子量为(例如)至多100,000Da、至多200,000Da、至多300,000Da、至多400,000Da、至多500,000Da、至多600,000Da、至多700,000Da、至多800,000Da、至多900,000Da或至多950,000Da的交联透明质烷聚合物。在该实施方案的其它方面,组合物包含平均分子量为(例如)约100,000Da至约500,000Da、约200,000Da至约500,000Da、约300,000Da至约500,000Da、约400,000Da至约500,000Da、约500,000Da至约950,000Da、约600,000Da至约950,000Da、约700,000Da至约950,000Da、约800,000Da至约950,000Da、约300,000Da至约600,000Da、约300,000Da至约700,000Da、约300,000Da至约800,000Da或约400,000Da至约700,000Da的交联透明质烷聚合物。

[0057] 在另一实施方案中,组合物包含高分子量的交联透明质烷聚合物。在该实施方案的方面,组合物包含平均分子量为(例如)约1,000,000Da、约1,500,000Da、约2,000,000Da、

约2,500,000Da、约3,000,000Da、约3,500,000Da、约4,000,000Da、约4,500,000Da或约5,000,000Da的交联透明质烷聚合物。在该实施方案的其它方面,组合物包含平均分子量为(例如)至少1,000,000Da、至少1,500,000Da、至少2,000,000Da、至少2,500,000Da、至少3,000,000Da、至少3,500,000Da、至少4,000,000Da、至少4,500,000Da或至少5,000,000Da的交联透明质烷聚合物。在该实施方案的其它方面,组合物包含平均分子量为(例如)约1,000,000Da至约5,000,000Da、约1,500,000Da至约5,000,000Da、约2,000,000Da至约5,000,000Da、约2,500,000Da至约5,000,000Da、约2,000,000Da至约3,000,000Da、约2,500,000Da至约3,000,000Da的交联透明质烷聚合物。

[0058] 又一实施方案中,组合物包含交联透明质烷聚合物,其中所述交联透明质烷聚合物包含不同比例的高分子量透明质烷聚合物和低分子量透明质烷聚合物的组合。在该实施方案的方面,组合物包含交联透明质烷聚合物,其中所述交联透明质烷聚合物包含比例为约20:1、约15:1、约10:1、约5:1、约1:1、约1:5、约1:10、约1:15或约1:20的高分子量透明质烷聚合物和低分子量透明质烷聚合物的组合。

[0059] 本说明书的方面部分地提供了包含未交联糖胺聚糖聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“未交联”指缺乏连接单独的糖胺聚糖聚合物分子或单体链的分子间键。因而,未交联糖胺聚糖聚合物未通过分子间键与任何其它糖胺聚糖聚合物连接。在该实施方案的方面,组合物包含未交联硫酸软骨素聚合物、未交联硫酸皮肤素聚合物、未交联硫酸角质素聚合物、未交联乙酰肝素聚合物、未交联硫酸乙酰肝素聚合物或未交联透明质烷聚合物。未交联糖胺聚糖聚合物可溶于水并且通常在本质上保持流动性。因而,未交联糖胺聚糖聚合物常与作为润滑剂的基于糖胺聚糖聚合物的水凝胶组合物混合以促进组合物通过细针的挤出过程。

[0060] 在一个实施方案中,组合物包含未交联糖胺聚糖聚合物,其中所述未交联糖胺聚糖聚合物存在的浓度为(例如)约2mg/g、约3mg/g、约4mg/g、约5mg/g、约6mg/g、约7mg/g、约8mg/g、约9mg/g、约10mg/g、约11mg/g、约12mg/g、约13mg/g、约13.5mg/g、约14mg/g、约15mg/g、约16mg/g、约17mg/g、约18mg/g、约19mg/g、约20mg/g、约40mg/g或约60mg/g。在该实施方案的其它方面,组合物包含未交联糖胺聚糖,其中所述未交联糖胺聚糖存在的浓度为(例如)至少1mg/g、至少2mg/g、至少3mg/g、至少4mg/g、至少5mg/g、至少10mg/g、至少15mg/g、至少20mg/g、至少25mg/g、至少35mg/g或至少40mg/g。在该实施方案的其它方面,组合物包含未交联糖胺聚糖,其中所述未交联糖胺聚糖存在的浓度为(例如)至多1mg/g、至多2mg/g、至多3mg/g、至多4mg/g、至多5mg/g、至多10mg/g、至多15mg/g、至多20mg/g或至多25mg/g。在该实施方案的其它方面,组合物包含未交联糖胺聚糖,其中所述未交联糖胺聚糖存在的浓度为(例如)约1mg/g至约60mg/g、约10mg/g至约40mg/g、约7.5mg/g至约19.5mg/g、约8.5mg/g至约18.5mg/g、约9.5mg/g至约17.5mg/g、约10.5mg/g至约16.5mg/g、约11.5mg/g至约15.5mg/g或约12.5mg/g至约14.5mg/g。

[0061] 本说明书的方面部分地提供了基本上不含交联糖胺聚糖聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“基本上不含”(或“基本上由……组成”)指其中仅可检测到微量的交联母体聚合物的组合物。在该实施方案的一个方面,组合物包含基本上不含交联硫酸软骨素聚合物的硫酸软骨素、基本上不含交联硫酸皮肤素聚合物的硫酸皮肤素、基本上不含交联硫酸角质素聚合物的硫酸角质素、基本上不含交联乙酰肝素聚合物的乙酰肝素、基本上不

含交联硫酸乙酰肝素聚合物的硫酸乙酰肝素或基本上不含交联透明质烷聚合物的硫酸透明质烷。

[0062] 本说明书的方面部分地提供了完全不含交联糖胺聚糖聚合物的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“完全不含”指组合物在使用的仪器或工艺检测范围内,不能检测到交联糖胺聚糖聚合物或不能确认其存在。在该实施方案的一个方面,组合物包含完全不含交联硫酸软骨素聚合物的硫酸软骨素、完全不含交联硫酸皮肤素聚合物的硫酸皮肤素、完全不含交联硫酸角质素聚合物的硫酸角质素、完全不含交联乙酰肝素聚合物的乙酰肝素、完全不含交联硫酸乙酰肝素聚合物的硫酸乙酰肝素或完全不含交联透明质烷聚合物的硫酸透明质烷。

[0063] 本说明书的方面部分地提供了包含一定比例的交联糖胺聚糖聚合物和未交联糖胺聚糖聚合物的水凝胶组合物。交联和未交联糖胺聚糖聚合物的这种比例也可称为凝胶:流体比。在制备本文公开的组合物中任何凝胶:流体比均有用,条件是此比例产生本文公开的改善如本文公开的皮肤状况的组合物。本发明组合物中凝胶:流体比的非限制性实例包括100:0、98:2、90:10、75:25、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、25:75、10:90、2:98和0:100。

[0064] 在该实施方案的方面,组合物包含交联糖胺聚糖聚合物和未交联糖胺聚糖聚合物,其中凝胶:流体比为(例如)约0:100、约1:99、约2:98、约3:97、约4:96、约5:95、约6:94、约7:93、约8:92、约9:91或约10:90。在该实施方案的其它方面,组合物包含交联糖胺聚糖聚合物和未交联糖胺聚糖聚合物,其中凝胶:流体比为(例如)至多1:99、至多2:98、至多3:97、至多4:96、至多5:95、至多6:94、至多7:93、至多8:92、至多9:91或至多10:90。在该实施方案的其它方面,组合物包含交联糖胺聚糖聚合物和未交联糖胺聚糖聚合物,其中凝胶:流体比为(例如)约0:100至约3:97、约0:100至约5:95或约0:100至约10:90。

[0065] 在该实施方案的其它方面,组合物包含交联糖胺聚糖聚合物和未交联糖胺聚糖聚合物,其中凝胶:流体比为(例如)约15:85、约20:80、约25:75、约30:70、约35:65、约40:60、约45:55、约50:50、约55:45、约60:40、约65:35、约70:30、约75:25、约80:20、约85:15、约90:10、约95:5、约98:2或约100:0。在该实施方案的其它方面,组合物包含交联糖胺聚糖聚合物和未交联糖胺聚糖聚合物,其中凝胶:流体比为(例如)至多15:85、至多20:80、至多25:75、至多30:70、至多35:65、至多40:60、至多45:55、至多50:50、至多55:45、至多60:40、至多65:35、至多70:30、至多75:25、至多80:20、至多85:15、至多90:10、至多95:5、至多98:2或至多100:0。在该实施方案的其它方面,组合物包含交联糖胺聚糖聚合物和未交联糖胺聚糖聚合物,其中凝胶:流体比为(例如)约10:90至约70:30、约15:85至约70:30、约10:90至约55:45、约80:20至约95:5、约90:10至约100:0、约75:25至约100:0或约60:40至约100:0。

[0066] 本文公开的水凝胶组合物可进一步包含在向个体施用所述组合物时提供有益作用的另一种试剂或试剂组合。此类有益试剂包括但不限于抗氧化剂、止痒剂、消脂剂、抗疤痕剂、抗炎剂、麻醉剂、抗刺激剂、血管收缩剂、血管扩张剂、抗出血剂(如止血剂或抗纤维溶解蛋白剂)、剥离剂、张紧剂、抗痘剂、色素沉着剂、抗色素沉着剂或保湿剂。

[0067] 为了本发明的目的,除非另外说明,否则公式中的“%”定义为重量(即,w/w)百分比。

[0068] 本发明的方面部分地提供了本文公开的可任选包含麻醉剂的水凝胶组合物。麻醉

剂优选为局部麻醉剂,即引起可逆性局部麻醉和失去伤害感受的麻醉剂,例如氨基酰胺局部麻醉剂和氨基酯局部麻醉剂。本文公开的组合物中包括的麻醉剂的量是对减轻个体在施用所述组合物后感受到的疼痛有效的量。因而,在本说明书中公开的组合物中包括的麻醉剂的量介于按总组合物重量计约0.1%到约5%之间。麻醉剂的非限制性实例包括利多卡因、氨布卡因(ambucaine)、阿莫拉酮(amolanone)、阿米洛卡因(amylocaine)、丁氧普鲁卡因(benoxinate)、苯佐卡因(benzocaine)、贝托卡因(betoxycaine)、苯柳胺酯(biphenamine)、丁哌卡因(bupivacaine)、布他卡因(butacaine)、氨苯丁酯(butamben)、布坦卡因(butanilicaine)、丁胺卡因(butethamine)、丁托西卡因(butoxycaine)、卡铁卡因(carticaine)、氯普鲁卡因(chloroprocaine)、己基苯酸爱康因(cocaethylene)、可卡因(cocaine)、环美卡因(cyclomethycaine)、二丁卡因(dibucaine)、二甲异喹(dimethisoquin)、二甲卡因(dimethocaine)、地哌冬(diperodon)、双环胺(dycyclonine)、去水芽子碱(ecgonidine)、芽子碱(ecgonine)、氯乙烷、依替卡因(etidocaine)、 β -优卡因(beta-eucaine)、尤普罗辛(euprocine)、非那可明(fenalamine)、formocaine、海克卡因(hexylcaine)、羟丁卡因(hydroxy tetracaine)、对氨基苯甲酸异丁酯、甲磺酸亮氨卡因(leucinocaine mesylate)、左沙屈尔(levosuxamethide)、利多卡因、甲哌卡因(mepivacaine)、美普卡因(mepylcaine)、美布卡因(metabutoxycaine)、氯甲烷、麦替卡因(myrtecaine)、纳伊卡因(naepaine)、奥他卡因(octacaine)、奥索卡因(orthocaine)、羟乙卡因(oxethazaine)、对乙氧卡因(parethoxycaine)、非那卡因(phenacaine)、苯酚、哌罗卡因(piperocaine)、匹多卡因(piridocaine)、聚多卡醇(polidocanol)、丙吗卡因(pramoxine)、丙胺卡因(prilocaine)、普鲁卡因(procaine)、丙泮卡因(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(pyrrocaine)、罗哌卡因(ropivacaine)、水杨醇、丁卡因(tetracaine)、托利卡因(tolycaine)、三甲卡因(trimecaine)、佐拉敏(zolamine)、其组合及其盐。氨基酯局部麻醉剂包括普鲁卡因、氯普鲁卡因、可卡因、环美卡因、cimethocaine(拉罗卡因(larocaine))、丙氧卡因、普鲁卡因(奴佛卡因(novocaine))、丙美卡因、丁卡因(阿美索卡因(amestocaine))。氨基酰胺局部麻醉剂的非限制性实例包括阿替卡因(articaine)、丁哌卡因、辛可卡因(cinchocaine)(二丁卡因)、依替卡因、左布比卡因(levobupivacaine)、利多卡因(利诺卡因(lignocaine))、甲哌卡因、哌罗卡因、丙胺卡因、罗哌卡因和三甲卡因。本文公开的组合物可包含单种麻醉剂或多种麻醉剂。组合局部麻醉剂的非限制性实例为利多卡因/丙胺卡因(EMLA)。

[0069] 因此在一个实施方案中,本文公开的组合物包含麻醉剂及其盐。在该实施方案的方面,本文公开的组合物包含氨基酰胺局部麻醉剂及其盐或氨基酯局部麻醉剂及其盐。在该实施方案的其它方面,本文公开的组合物包含普鲁卡因、氯普鲁卡因、可卡因、环美卡因、cimethocaine、丙氧卡因、普鲁卡因、丙美卡因、丁卡因或其盐或其任何组合。在该实施方案的其它方面,本文公开的组合物包含阿替卡因、丁哌卡因、辛可卡因、依替卡因、左布比卡因、利多卡因、甲哌卡因、哌罗卡因、丙胺卡因、罗哌卡因、三甲卡因或其盐或其任何组合。在该实施方案的另外其它方面,本文公开的组合物包含利多卡因/丙胺卡因组合。

[0070] 在该实施方案的其它方面,本文公开的组合物包含按总组合物的重量计,量为(例如)约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约

1.0%、约2.0%、约3.0%、约4.0%、约5.0%、约6.0%、约7.0%、约8.0%、约9.0%或约10%的麻醉剂。在另外其它方面,本文公开的组合物包含按总组合物的重量计,量为(例如)至少0.1%、至少0.2%、至少0.3%、至少0.4%、至少0.5%、至少0.6%、至少0.7%、至少0.8%、至少0.9%、至少1.0%、至少2.0%、至少3.0%、至少4.0%、至少5.0%、至少6.0%、至少7.0%、至少8.0%、至少9.0%或至少10%的麻醉剂。在还有其它方面,本文公开的组合物包含按总组合物的重量计,量为(例如)至多0.1%、至多0.2%、至多0.3%、至多0.4%、至多0.5%、至多0.6%、至多0.7%、至多0.8%、至多0.9%、至多1.0%、至多2.0%、至多3.0%、至多4.0%、至多5.0%、至多6.0%、至多7.0%、至多8.0%、至多9.0%或至多10%的麻醉剂。在其它方面,本文公开的组合物包含按总组合物的重量计,量为(例如)约0.1%至约0.5%、约0.1%至约1.0%、约0.1%至约2.0%、约0.1%至约3.0%、约0.1%至约4.0%、约0.1%至约5.0%、约0.2%至约0.9%、约0.2%至约1.0%、约0.2%至约2.0%、约0.5%至约1.0%或约0.5%至约2.0%的麻醉剂。

[0071] 在另一实施方案中,本文公开的组合物不包含麻醉剂。

[0072] 在本发明的一个方面,提供了可注射真皮填充剂,其包含聚合物,例如糖胺聚糖聚合物,例如透明质酸聚合物,例如至少一部分交联的透明质酸,和添加剂或与所述聚合物组合的有益试剂。

[0073] 与所述聚合物组合的有益试剂包含维生素,例如维生素C。适合形式的维生素C的非限制性实例包括抗坏血酸和抗坏血酸的钠盐、钾盐和钙盐、抗坏血酸与长链脂肪酸的脂溶性酯(抗坏血酸棕榈酸酯或抗坏血酸硬脂酸酯)、抗坏血酸磷酸酯镁(MAP)、抗坏血酸磷酸钠(SAP)和抗坏血酸2-葡萄糖苷(AA2G™)、抗坏血酸磷酸钠(AA2P)、抗坏血酸硫酸二钠和抗坏血酸3-氨丙基磷酸酯(维生食物)。

[0074] 在一个特别有利的实施方案中,有益试剂与所述聚合物共价结合。例如,有益试剂可为维生素C或维生素C衍生物,其与所述聚合物共价结合并且按总组合物的重量计,在组合物中存在的量介于约0.04%至约5.0%之间,例如按总组合物的重量计介于约0.1%至约4.0%之间,例如按总组合物的重量计介于约0.2%至约2.0%之间。在一个实施方案中,本文公开的组合物中包括的维生素C的量按总组合物的重量计介于约0.3%至约1.2%之间。

[0075] 优选地,与所述组合物共价结合的维生素C包括下列至少一种:抗坏血酸、L-抗坏血酸、L-抗坏血酸2-硫酸酯(AA-2S)和L-抗坏血酸2-磷酸酯(AA-2P)、抗坏血酸2-O-葡萄糖苷(AA-2G)、6-O-酰基-2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(6-酰基-AA-2G)、(抗坏血酸3-氨丙基磷酸酯、抗坏血酸棕榈酸酯)、其衍生物和组合。本文公开的组合物可包含单种维生素C试剂或多种维生素C试剂。

[0076] 在本发明的另一实施方案中,提供了真皮填充剂,其中透明质酸与BDDE交联。在这个实施方案中,结合度可介于约3mol%和约10mol%之间,约15mol%到约40mol%之间。

[0077] 在一些实施方案中,真皮填充剂具有持续的生物利用率。例如,提供了在引入人类皮肤中时,向人类有效释放抗坏血酸或其它维生素至少约1个月或长达约20个月或更长时间的真皮填充剂。

[0078] 本发明的方面部分地提供了本文公开的显示复数模量、弹性模量、粘性模量和 $\tan \delta$ 的水凝胶组合物。当施加力(应力、变形)时,本文公开的组合物具粘弹性,因为组合物具有弹性组分(固体状例如交联糖胺聚糖聚合物)和粘性组分(液体状例如未交联的糖胺聚糖聚

合物或载体相)。描述该性质的流变学属性是复数模量(G^*),其定义组合物对变形的总抗性。复数模量是具有实部和虚部的复数: $G^*=G'+iG''$ 。 G^* 的绝对值为 $Abs(G^*)=\sqrt{G'^2+G''^2}$ 。可将复数模量定义为弹性模量(G')和粘性模量(G'')的总和。Falcone等,Temporary Polysaccharide Dermal Fillers:A Model for Persistence Based on Physical Properties,Dermatol Surg.35(8):1238-1243(2009);Tezel,同上,2008;Kablik,同上,2009;Beasley,同上,2009;其各自据此通过引用整体并入。

[0079] 弹性模量或弹性模数指水凝胶材料抵抗变形的能力,或相反地,在对其施加力时物体对非永久性变形的倾向。弹性模量表征了组合物的牢固性,并且因为它描述了来自组合物运动的能量储存,所以也被称为储能模量。弹性模量描述了弹性和强度之间的相互作用($G'=\text{应力}/\text{应变}$),并因此提供了对组合物硬度或柔软度的定量测量。将物体的弹性模量定义为在弹性变形区域中其应力-应变曲线的斜率: $\lambda=\text{应力}/\text{应变}$,其中 λ 是帕斯卡定理(Pascal's)中的弹性模量;应力是引起变形的力除以施加力的面积;并且应变是应力引起的变化与物体初始状态之比。虽然取决于施加力的速度,但组合物越硬,具有的弹性模量越高并且将花更大的力使材料在指定距离变形,例如注射。说明如何测量应力,包括方向,允许定义许多类型的弹性模量。3个主要弹性模量为拉伸模量、剪切模量和体积模量。

[0080] 粘性模量也称为损耗模量,因为它描述了随粘性耗散而损耗的能量。 $\tan\delta$ 为粘性模量和弹性模量之比, $\tan\delta=G''/G'$ 。Falcone,同上,2009。对于在本说明书中公开的 $\tan\delta$ 值, $\tan\delta$ 由在1Hz频率下的动态模量得到。更低的 $\tan\delta$ 对应于更硬的、更坚固或更有弹性的组合物。

[0081] 在另一实施方案中,本文公开的水凝胶组合物显示出弹性模量。在该实施方案的方面,水凝胶组合物显示出(例如)约25Pa、约50Pa、约75Pa、约100Pa、约125Pa、约150Pa、约175Pa、约200Pa、约250Pa、约300Pa、约350Pa、约400Pa、约450Pa、约500Pa、约550Pa、约600Pa、约650Pa、约700Pa、约750Pa、约800Pa、约850Pa、约900Pa、约950Pa、约1,000Pa、约1,200Pa、约1,300Pa、约1,400Pa、约1,500Pa、约1,600Pa、约1700Pa、约1800Pa、约1900Pa、约2,000Pa、约2,100Pa、约2,200Pa、约2,300Pa、约2,400Pa或约2,500Pa的弹性模量。在该实施方案的其它方面,水凝胶组合物显示出(例如)至少25Pa、至少50Pa、至少75Pa、至少100Pa、至少125Pa、至少150Pa、至少175Pa、至少200Pa、至少250Pa、至少300Pa、至少350Pa、至少400Pa、至少450Pa、至少500Pa、至少550Pa、至少600Pa、至少650Pa、至少700Pa、至少750Pa、至少800Pa、至少850Pa、至少900Pa、至少950Pa、至少1,000Pa、至少1,200Pa、至少1,300Pa、至少1,400Pa、至少1,500Pa、至少1,600Pa、至少1700Pa、至少1800Pa、至少1900Pa、至少2,000Pa、至少2,100Pa、至少2,200Pa、至少2,300Pa、至少2,400Pa或至少2,500Pa的弹性模量。在该实施方案的另外其它方面,水凝胶组合物显示出(例如)至多25Pa、至多50Pa、至多75Pa、至多100Pa、至多125Pa、至多150Pa、至多175Pa、至多200Pa、至多250Pa、至多300Pa、至多350Pa、至多400Pa、至多450Pa、至多500Pa、至多550Pa、至多600Pa、至多650Pa、至多700Pa、至多750Pa、至多800Pa、至多850Pa、至多900Pa、至多950Pa、至多1,000Pa、至多1,200Pa、至多1,300Pa、至多1,400Pa、至多1,500Pa或至多1,600Pa的弹性模量。该实施方案的另外其它方面,水凝胶组合物显示出(例如)约25Pa至约150Pa、约25Pa至约300Pa、约25Pa至约500Pa、约25Pa至约800Pa、约125Pa至约300Pa、约125Pa至约500Pa、约125Pa至约800Pa、约500Pa至约1,600Pa、约600Pa至约1,600Pa、约700Pa至约1,600Pa、约800Pa至约1,600Pa、约

900Pa至约1,600Pa、约1,000Pa至约1,600Pa、约1,100Pa至约1,600Pa、约1,200Pa至约1,600Pa、约500Pa至约2,500Pa、约1,000Pa至约2,500Pa、约1,500Pa至约2,500Pa、约2,000Pa至约2,500Pa、约1,300Pa至约1,600Pa、约1,400Pa至约1,700Pa、约1,500Pa至约1,800Pa、约1,600Pa至约1,900Pa、约1,700Pa至约2,000Pa、约1,800Pa至约2,100Pa、约1,900Pa至约2,200Pa、约2,000Pa至约2,300Pa、约2,100Pa至约2,400Pa或约2,200Pa至约2,500Pa的弹性模量。

[0082] 在另一实施方案中,本文公开的水凝胶组合物显示出粘性模量。在该实施方案的方面,水凝胶组合物显示出(例如)约10Pa、约20Pa、约30Pa、约40Pa、约50Pa、约60Pa、约70Pa、约80Pa、约90Pa、约100Pa、约150Pa、约200Pa、约250Pa、约300Pa、约350Pa、约400Pa、约450Pa、约500Pa、约550Pa、约600Pa、约650Pa或约700Pa的粘性模量。在该实施方案的其它方面,水凝胶组合物显示出(例如)至多10Pa、至多20Pa、至多30Pa、至多40Pa、至多50Pa、至多60Pa、至多70Pa、至多80Pa、至多90Pa、至多100Pa、至多150Pa、至多200Pa、至多250Pa、至多300Pa、至多350Pa、至多400Pa、至多450Pa、至多500Pa、至多550Pa、至多600Pa、至多650Pa或至多700Pa的粘性模量。在该实施方案的另外其它方面,水凝胶组合物显示出(例如)约10Pa至约30Pa、约10Pa至约50Pa、约10Pa至约100Pa、约10Pa至约150Pa、约70Pa至约100Pa、约50Pa至约350Pa、约150Pa至约450Pa、约250Pa至约550Pa、约350Pa至约700Pa、约50Pa至约150Pa、约100Pa至约200Pa、约150Pa至约250Pa、约200Pa至约300Pa、约250Pa至约350Pa、约300Pa至约400Pa、约350Pa至约450Pa、约400Pa至约500Pa、约450Pa至约550Pa、约500Pa至约600Pa、约550Pa至约650Pa或约600Pa至约700Pa的粘性模量。

[0083] 在另一实施方案中,本文公开的水凝胶组合物显示出 $\tan\delta$ 。在该实施方案的方面,水凝胶组合物显示出(例如)约0.1、约0.2、约0.3、约0.4、约0.5、约0.6、约0.7、约0.8、约0.9、约1.0、约1.1、约1.2、约1.3、约1.4、约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9、约2.0、约2.1、约2.2、约2.3、约2.4或约2.5的 $\tan\delta$ 。在该实施方案的其它方面,水凝胶组合物显示出(例如)至多0.1、至多0.2、至多0.3、至多0.4、至多0.5、至多0.6、至多0.7、至多0.8、至多0.9、至多1.0、至多1.1、至多1.2、至多1.3、至多1.4、至多1.5、至多1.6、至多1.7、至多1.8、至多1.9、至多2.0、至多2.1、至多2.2、至多2.3、至多2.4或至多2.5的 $\tan\delta$ 。在该实施方案的另外其它方面,水凝胶组合物显示出(例如)约0.1至约0.3、约0.3至约0.5、约0.5至约0.8、约1.1至约1.4、约1.4至约1.7、约0.3至约0.6、约0.1至约0.5、约0.5至约0.9、约0.1至约0.6、约0.1至约1.0、约0.5至约1.5、约1.0至约2.0或约1.5至约2.5的 $\tan\delta$ 。

[0084] 本说明书的方面部分地提供了本文公开的具有透明性和/或半透明性的水凝胶组合物。光学透明性是允许可见光通过材料的物理性质,而半透明性(也称为半透明或半透明度)仅允许光漫射通过。相对的性质是不透明性。透明材料清澈,而半透明材料不能清楚地看透。本文公开的水凝胶优选为光学透明或至少半透明。

[0085] 在一个实施方案中,本文公开的水凝胶组合物光学透明。在该实施方案的方面,水凝胶组合物漫射传导(例如)约75%的光、约80%的光、约85%的光、约90%的光、约95%的光或约100%的光。在该实施方案的其它方面,水凝胶组合物漫射传导(例如)至少75%的光、至少80%的光、至少85%的光、至少90%的光或至少95%的光。在该实施方案的另外其它方面,水凝胶组合物漫射传导(例如)约75%至约100%的光、约80%至约100%的光、约85%至约100%的光、约90%至约100%的光或约95%至约100%的光。在一个实施方案中,

本文公开的水凝胶组合物光学透明并且传导100%的可见光。

[0086] 可通过将水凝胶磨成颗粒进一步加工本文公开的水凝胶组合物并且任选与载体相例如水或盐水溶液混合以形成可注射或局部物质,如溶液、油、洗液、凝胶、软膏、乳膏、浆料、油膏或糊剂。因而,公开的水凝胶组合物可为单相或多相组合物。可将水凝胶碾磨成直径约10 μ m至约1000 μ m的粒度,例如约15 μ m至约30 μ m、约50 μ m至约75 μ m、约100 μ m至约150 μ m、约200 μ m至约300 μ m、约450 μ m至约550 μ m、约600 μ m至约700 μ m、约750 μ m至约850 μ m或约900 μ m至约1,000 μ m。

[0087] 本发明的方面部分地提供了本文公开的可注射的组合物。如本文所使用,术语“可注射”指材料具有使用带细针的注射装置向个体皮肤区域施用所述组合物所必需的性质。如本文所使用,术语“细针”指27G或更小的针。可通过如以上所讨论的那样确定水凝胶颗粒的尺寸实现本文公开的组合物的可注射性。

[0088] 在该实施方案的方面,本文公开的水凝胶组合物可通过细针注射。在该实施方案的其它方面,本文公开的水凝胶组合物可通过(例如)约27G、约30G或约32G的针注射。在该实施方案的另外其它方面,本文公开的水凝胶组合物可通过(例如)22G或更小、27G或更小、30G或更小或32G或更小的针注射。在该实施方案的另外其它方面,本文公开的水凝胶组合物可通过(例如)约22G至约35G、约22G至约34G、约22G至约33G、约22G至约32G、约22G至约27G或约27G至约32G的针注射。

[0089] 在该实施方案的方面,本文公开的水凝胶组合物可用约60N、约55N、约50N、约45N、约40N、约35N、约30N、约25N、约20N或约15N的挤压力,以100mm/min的速度注射。在该实施方案的其它方面,本文公开的水凝胶组合物可通过27G针,用约60N或更小、约55N或更小、约50N或更小、约45N或更小、约40N或更小、约35N或更小、约30N或更小、约25N或更小、约20N或更小、约15N或更小、约10N或更小或约5N或更小的挤压力注射。在该实施方案的另外其它方面,本文公开的水凝胶组合物可通过30G针,用约60N或更小、约55N或更小、约50N或更小、约45N或更小、约40N或更小、约35N或更小、约30N或更小、约25N或更小、约20N或更小、约15N或更小、约10N或更小或约5N或更小的挤压力注射。在该实施方案的另外其它方面,本文公开的水凝胶组合物可通过32G针,用约60N或更小、约55N或更小、约50N或更小、约45N或更小、约40N或更小、约35N或更小、约30N或更小、约25N或更小、约20N或更小、约15N或更小、约10N或更小或约5N或更小的挤压力注射。

[0090] 本发明的方面部分地提供了本文公开的显示出粘聚性的水凝胶组合物。粘聚性,也称为内聚粘着引力、粘合力或压缩力,是材料内相似分子之间起到将分子合成一体的作用的分子间引力引起的材料的物理性质。用克-力(gmf)表示粘聚性。除其它因素外,粘结性受初始游离糖胺聚糖聚合物的分子量比、糖胺聚糖聚合物的交联度、交联后残留的游离糖胺聚糖聚合物的量和水凝胶组合物的pH影响。组合物应有足够粘结性,以便保持位于施用部分。另外,在某些应用中,足够的粘结性对组合物保持其形状,并且因此在发生机械负载循环时保持功能性而言很重要。因而,在一个实施方案中,本文公开的水凝胶组合物显示出粘聚性,与水同等水平。在又一实施方案中,本文公开的凝胶组合物显示出足够粘聚性以保持位于施用部分。在又一实施方案中,本文公开的凝胶组合物显示出足够粘聚性以保持其形状。在又一实施方案中,本文公开的凝胶组合物显示出足够粘聚性以保持其形状和功能。

[0091] 本发明的方面部分地提供了本文公开的显示出生理上可接受的容积克分子渗透浓度 (osmolality) 的水凝胶组合物。如本文所使用, 术语“容积克分子渗透浓度”指溶液中渗透活性溶质的浓度。如本文所使用, 术语“生理上可接受的容积克分子渗透浓度”指与活生物体正常机能相符或其特有的容积克分子渗透浓度。因而, 在施用给哺乳动物时, 施用本文公开的水凝胶组合物显示大体上没有长期或永久性有害影响的容积克分子渗透浓度。容积克分子渗透浓度以每升溶剂中渗透活性溶质的渗透压摩尔 (Osmol/L 或 Osm/L) 表示。容积克分子渗透浓度与容积克分子浓度不同, 因为它测量了渗透活性溶质颗粒的摩尔数而不是溶质的摩尔数。因为某些化合物可在溶液中离解, 而其它的不能, 所以出现了不同。可由下列表达式计算溶液的容积克分子渗透浓度: $Osmol/L = \sum \phi_i \eta_i C_i$, 其中 ϕ 为渗透系数, 其说明了溶液的非理想程度; η 为分子离解成的颗粒 (例如离子) 的数量; 并且 C 为溶质的摩尔浓度; 且 i 为表示特定溶质同一性的指数。可使用测量溶液的常规方法测量本文公开的水凝胶组合物的容积克分子渗透浓度。

[0092] 在一个实施方案中, 本文公开的水凝胶组合物显示出生理上可接受的容积克分子渗透浓度。如本文所使用, 术语“重量克分子渗透浓度”指体内每千克溶剂中渗透活性溶质的浓度。如本文所使用, 术语“生理上可接受的重量克分子渗透浓度”指与活生物体正常机能相符或其特有的重量克分子渗透浓度。因而, 在施用给哺乳动物时, 施用本文公开的水凝胶组合物显示大体上没有长期或永久性有害影响的重量克分子渗透浓度。重量克分子渗透浓度以每千克溶剂中渗透活性溶质的渗透压摩尔 (osmol/kg 或 Osm/kg) 表示并且等于该溶液中存在的所有溶质的重量克分子浓度的总和。可使用渗压计测量溶液的重量克分子渗透浓度。在现代化实验室里最常用的仪器是冰点降低渗压计。该仪器测量了随重量克分子渗透浓度增加溶液中冰点发生的变化 (冰点降低渗压计) 或随重量克分子渗透浓度增加溶液中蒸汽压发生的变化 (蒸汽压降低渗压计)。

[0093] 在该实施方案的方面, 水凝胶组合物显示出 (例如) 约 100mOsm/L、约 150mOsm/L、约 200mOsm/L、约 250mOsm/L、约 300mOsm/L、约 350mOsm/L、约 400mOsm/L、约 450mOsm/L 或约 500mOsm/L 的容积克分子渗透浓度。在该实施方案的其它方面, 水凝胶组合物显示出 (例如) 至少 100mOsm/L、至少 150mOsm/L、至少 200mOsm/L、至少 250mOsm/L、至少 300mOsm/L、至少 350mOsm/L、至少 400mOsm/L、至少 450mOsm/L 或至少 500mOsm/L 的容积克分子渗透浓度。在该实施方案的另外其它方面, 水凝胶组合物显示出 (例如) 至多 100mOsm/L、至多 150mOsm/L、至多 200mOsm/L、至多 250mOsm/L、至多 300mOsm/L、至多 350mOsm/L、至多 400mOsm/L、至多 450mOsm/L 或至多 500mOsm/L 的容积克分子渗透浓度。在该实施方案的另外其它方面, 水凝胶组合物显示出 (例如) 约 100mOsm/L 至约 500mOsm/L、约 200mOsm/L 至约 500mOsm/L、约 200mOsm/L 至约 400mOsm/L、约 300mOsm/L 至约 400mOsm/L、约 270mOsm/L 至约 390mOsm/L、约 225mOsm/L 至约 350mOsm/L、约 250mOsm/L 至约 325mOsm/L、约 275mOsm/L 至约 300mOsm/L 或约 285mOsm/L 至约 290mOsm/L 的容积克分子渗透浓度。

[0094] 本发明的方面部分地提供了本文公开的显示出大体稳定性的水凝胶组合物。如本文所使用, 术语“稳定性”或“稳定”在提及本文公开的水凝胶组合物时, 指组合物在施用给个体之前, 在储存时不易于降解、分解或破碎到任何大体上或显著的程度。如本文所使用, 术语“大体热稳定性”、“大体上热稳定”、“高压釜稳定”或“蒸汽灭菌稳定”指本文公开的水凝胶组合物在受到如本文公开的热处理时大体上稳定。

[0095] 可通过使水凝胶组合物受热处理,例如在正常压力或加压下(例如,高压灭菌)的蒸汽灭菌,测定本文公开的水凝胶组合物的稳定性。优选在至少约100℃的温度下进行热处理约1分钟至约10分钟。可通过下列方式评估本文公开的水凝胶组合物的总体稳定性:1)测定灭菌后本文公开的水凝胶组合物的挤压力变化(ΔF),其中通过(有指定添加剂的水凝胶组合物的挤压力)减去(未加添加剂的水凝胶组合物的挤压力)测量,挤压力的变化小于2N表明水凝胶组合物大体上稳定;和/或2)测定灭菌后本文公开的水凝胶组合物的流变性变化,其中通过(有添加剂的凝胶制剂的 $\tan\delta 1\text{Hz}$)减去(没有添加剂的凝胶制剂的 $\tan\delta 1\text{Hz}$)测量, $\tan\delta 1\text{Hz}$ 的变化小于0.1表明水凝胶组合物大体上稳定。因而,本文公开的大体上稳定的水凝胶组合物在灭菌后保持了下列一种或多种特性:均匀性、挤压力、粘结性、透明质酸浓度、试剂浓度、容积克分子渗透浓度、pH或热处理之前水凝胶所需的其它流变特性。

[0096] 在一个实施方案中,使用维持本文公开的所需水凝胶性质的热处理加工包含糖胺聚糖聚合物和至少一种本文公开的试剂的水凝胶组合物。在该实施方案的方面,使用(例如)约100℃、约105℃、约110℃、约115℃、约120℃、约125℃或约130℃的热处理加工包含糖胺聚糖聚合物和至少一种本文公开的试剂的水凝胶组合物。在该实施方案的其它方面,使用(例如)至少100℃、至少105℃、至少110℃、至少115℃、至少120℃、至少125℃或至少130℃的热处理加工包含糖胺聚糖聚合物和至少一种本文公开的试剂的水凝胶组合物。在该实施方案的另外其它方面,使用(例如)约100℃至约120℃、约100℃至约125℃、约100℃至约130℃、约100℃至约135℃、约110℃至约120℃、约110℃至约125℃、约110℃至约130℃、约110℃至约135℃、约120℃至约125℃、约120℃至约130℃、约120℃至约135℃、约125℃至约130℃或约125℃至约135℃的热处理加工包含糖胺聚糖聚合物和至少一种本文公开的试剂的水凝胶组合物。

[0097] 可通过使水凝胶组合物受热处理,例如储存在约45℃环境中约60天,测定本文公开的水凝胶组合物的长期稳定性。可通过下列方式评估本文公开的水凝胶组合物的长期稳定性:1)估计45℃热处理后水凝胶组合物的清澈度和颜色,水凝胶组合物清澈且未着色表明水凝胶组合物大体上稳定;2)测定在45℃热处理后本文公开的水凝胶组合物的挤压力变化(ΔF),其中通过(45℃热处理之前,有指定添加剂的水凝胶组合物的挤压力)减去(45℃热处理之后,有指定添加剂的水凝胶组合物的挤压力)测量,挤压力的变化小于2N表明水凝胶组合物大体上稳定;和/或3)测定灭菌后本文公开的水凝胶组合物的流变性变化,其中通过(45℃热处理之前,有指定添加剂的凝胶制剂的 $\tan\delta 1\text{Hz}$)减去(45℃热处理之后,有指定添加剂的凝胶制剂的 $\tan\delta 1\text{Hz}$)测量, $\tan\delta 1\text{Hz}$ 的变化小于0.1表明水凝胶组合物大体上稳定。因而,用在45℃热处理之后保持了下列一种或多种特征评估本文公开的水凝胶组合物的长期稳定性:清澈度(透明和半透明)、均匀性和粘结性。

[0098] 在该实施方案的方面,水凝胶组合物在室温下大体上稳定(例如)约3个月、约6个月、约9个月、约12个月、约15个月、约18个月、约21个月、约24个月、约27个月、约30个月、约33个月或约36个月。在该实施方案的其它方面,水凝胶组合物在室温下大体上稳定(例如)至少3个月、至少6个月、至少9个月、至少12个月、至少15个月、至少18个月、至少21个月、至少24个月、至少27个月、至少30个月、至少33个月或至少36个月。在该实施方案的其它方面,水凝胶组合物在室温下大体上稳定(例如)约3个月至约12个月、约3个月至约18个月、约3个月至约24个月、约3个月至约30个月、约3个月至约36个月、约6个月至约12个月、约6个月至

约18个月、约6个月至约24个月、约6个月至约30个月、约6个月至约36个月、约9个月至约12个月、约9个月至约18个月、约9个月至约24个月、约9个月至约30个月、约9个月至约36个月、约12个月至约18个月、约12个月至约24个月、约12个月至约30个月、约12个月至约36个月、约18个月至约24个月、约18个月至约30个月或约18个月至约36个月。

[0099] 本组合物可任选包括但不限于其它药学上可接受的组分,包括但不限于缓冲剂、防腐剂、张力调节剂、盐、抗氧化剂、重量克分子渗透浓度调节剂、乳化剂、湿润剂等。

[0100] 药学上可接受的缓冲剂是可用于制备本文公开的水凝胶组合物的缓冲剂,条件是所得制剂在药学上可接受。药学上可接受的缓冲剂的非限制性实例包括乙酸盐缓冲剂、硼酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲盐水。可将任何浓度的药学上可接受的缓冲剂用于配制本文公开的药物组合物,条件是使用有效浓度的缓冲剂恢复治疗有效量的活性成分。生理上可接受的缓冲剂浓度的非限制性实例存在于约0.1mM至约900mM范围内。可调节药学上可接受的缓冲剂的pH,条件是所得制剂是在药学上可接受。应理解可根据需要使用酸或碱调节药物组合物的pH。可将任何缓冲的pH水平用于配制药物组合物,条件是使用该有效pH水平恢复治疗有效量的母体聚合物。生理上可接受的pH的非限制性实例存在于约pH5.0至约pH8.5的范围内。例如,本文公开的水凝胶组合物的pH可为约5.0至约8.0或约6.5至约7.5、约7.0至约7.4或约7.1至约7.3。

[0101] 药学上可接受的防腐剂包括但不限于焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、乙酰半胱氨酸、丁羟茴香醚和丁羟甲苯。药学上可接受的防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、氯丁醇、硫柳汞、醋酸苯汞、硝酸苯汞、稳定化氧氯组合物,例如PURITE® (Allergan, Inc. Irvine, CA) 和螯合剂,例如DTPA或DTPA-双酰胺、DTPA钙及CaNaDTPA-双酰胺。

[0102] 用于本文公开的水凝胶组合物中的药学上可接受的张力调节剂包括但不限于盐例如氯化钠和氯化钾;和甘油。可将所述组合物作为盐提供并且可与许多酸一起形成,包括但不限于,盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐倾向于比相应的游离碱形式更易溶于水或其它质子溶剂。应理解,在本文公开的药物组合物中可包括药学领域内已知的这些和其它物质。药学上可接受的组分的其它非限制性实例可在例如Ansel, 同上, (1999); Gennaro, 同上, (2000); Hardman, 同上, (2001); 和Rowe, 同上, (2003) 中找到,由此将其中每一个通过引用的方式整体并入。

[0103] 本发明的方面部分地提供了通过施用本文公开的水凝胶组合物治疗个体的软组织状况的方法。如本文所使用,术语“治疗”指减轻或消除个体中特征在于软组织缺陷、缺损、疾病和/或病症的软组织状况的美容或临床症状;或延迟或预防个体中特征在于软组织缺陷、缺损、疾病和/或病症的状况的美容或临床症状发作。例如,术语“治疗”可指减轻特征在于软组织缺损、疾病和/或病症的状况的症状,例如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。可通过观测一种或多种美容、临床症状和/或与所述状况相关的生理指标测定本文公开的水凝胶组合物在治疗特征在于软组织缺损、疾病和/或病症的状况中的效果。也可由对同步疗法的需要减少表明软组织缺损、疾病和/或病症改善。本领域的技术人员将了解与特定软组织缺损、疾病和/或病症相关的适当症状或指标并且将了解如何确定个体是否是用本文公开的化合物或组合物治疗的候选人。

[0104] 向个体施用根据本发明所述的水凝胶组合物。个体通常是任何年龄、性别或种族

的人类。通常,是常规程序治疗软组织状况的候选人的任何个体也是本文公开的方法的候选人。虽然体验到皮肤老化征兆的受试者是成人,但是体验到适合治疗的过早老化或其它皮肤状况(例如,疤痕)的受试者也可用本文公开的水凝胶组合物治疗。另外,目前公开的水凝胶组合物和方法可应用于寻求身体部位或区域的小/中度膨大、形状变化或轮廓变更的个体,这用现有软组织植入技术,在技术上不可能或在审美上不能接受。除全面告知应允公开所述程序的所有相关风险和利益外,术前评估通常包括常规史和身体检查。

[0105] 本文公开的水凝胶组合物和方法对治疗软组织状况有用。软组织状况包括但不限于软组织缺陷、缺损、疾病和/或病症。软组织状况的非限制性实例包括乳房缺陷、缺损、疾病和/或病症,例如乳房增大、乳房再造、乳房固定、乳房过小、胸部发育不全、波兰氏综合征(Poland's syndrome)、由于植入并发症引起的缺损如囊袋收缩和/或破裂;面部缺陷、缺损、疾病或病症,例如面部增大、面部再造、美索疗法、帕-罗二氏综合征(Parry-Romberg syndrome)、深部红斑狼疮、真皮麻点、疤痕、面颊凹陷、薄唇、鼻部缺陷或缺损、眶后缺陷或缺损、面部褶皱、细纹和/或皱纹,如眉间纹、鼻唇纹、口周纹和/或嘴角纹,和/或面部的其它轮廓畸形或缺陷;颈部缺陷、缺损、疾病或/或病症;皮肤缺陷、缺损、疾病或/或病症;其它软组织缺陷、缺损、疾病或/或病症,例如上臂、下臂、手、肩膀、背部、躯干(包括腹部)、臀部、大腿、小腿(包括腓)、脚(包括足底脂肪垫)、眼睛、生殖器或其它身体部位、区域或面积的增大或再造,或影响这些身体部位、区域或面积的疾病或病症;小便失禁、大便失禁、其它形式的失禁;和胃食管反流疾病(GERD)。如本文所使用,术语“美索疗法”指皮肤的非手术美容治疗技术,牵涉向表皮、真皮-表皮交界处和/或真皮经表皮内、真皮内和/或皮下注射呈多个小液滴施用的试剂。

[0106] 通常将基于所需改变和/或改善、所需软组织状况症状的减轻和/或消除、个体和/或医师所需临床和/或美容效果和治疗的部位或区域确定与本文公开的任何方法一起使用的水凝胶组合物的量。组合物施用的效果可用下列一种或多种临床和/或美容度量标准表示:软组织形状改变和/或改善、软组织尺寸改变和/或改善、软组织轮廓改变和/或改善、组织功能改变和/或改善、组织向内生长支持和/或新胶原蛋白沉积、组合物持续灌输、患者满意度和/或生活质量提高及可植入异物的使用减少。

[0107] 所述组合物和方法治疗面部软组织的效果可用下列一种或多种临床和/或美容度量标准表示:面部特征的尺寸、形状和/或轮廓改善,如嘴唇、面颊或眼部区域的尺寸、形状和/或轮廓改善;面部特征的尺寸、形状和/或轮廓改变,如嘴唇、面颊或眼部区域的尺寸、形状和/或轮廓改变;皮肤上的皱纹、褶皱或细纹减少或消除;对皮肤上的皱纹、褶皱或细纹有抗性;皮肤补水;皮肤弹性增加;皮肤粗糙减轻或消除;皮肤坚固度增加和/或改善;拉伸纹或妊娠纹减少或消除;肤色、光泽、亮度和/或光彩增强和/或改善;皮肤颜色增强和/或改善、皮肤苍白减轻或消除;组合物持续灌输;副作用减少;患者满意度和/或生活质量提高。

[0108] 作为又一个例子,对于小便失禁手术而言,用于括约肌支持的组合物和方法的效果可用下列一种或多种临床度量标准表示:失禁频率减小、持续灌输、患者满意度和/或生活质量提高及可植入外来填充剂的使用减少。

[0109] 在该实施方案的方面,施用的水凝胶组合物的量为(例如)约0.01g、约0.05g、约0.1g、约0.5g、约1g、约5g、约10g、约20g、约30g、约40g、约50g、约60g、约70g、约80g、约90g、约100g、约150g或约200g。在该实施方案的其它方面,施用的水凝胶组合物的量为(例如)约

0.01g至约0.1g、约0.1g至约1g、约1g至约10g、约10g至约100g或约50g至约200g。在该实施方案的另外其它方面,施用的水凝胶组合物的量为(例如)约0.01mL、约0.05mL、约0.1mL、约0.5mL、约1mL、约5mL、约10mL、约20mL、约30mL、约40mL、约50mL、约60mL、约70g、约80mL、约90mL、约100mL、约150mL或约200mL。在该实施方案的其它方面,施用的水凝胶组合物的量为(例如)约0.01mL至约0.1mL、约0.1mL至约1mL、约1mL至约10mL、约10mL至约100mL或约50mL至约200mL。

[0110] 通常将基于个体和/或医师所需的美容和/或临床效果及治疗的身体部位或区域测定治疗的持续时间。在该实施方案的方面,施用本文公开的水凝胶组合物可治疗软组织状况,例如约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月、约12个月、约13个月、约14个月、约15个月、约18个月或约24个月。在该实施方案的其它方面,施用本文公开的水凝胶组合物可治疗软组织状况,例如至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少13个月、至少14个月、至少15个月、至少18个月或至少24个月。在该实施方案的其它方面,施用本文公开的水凝胶组合物可治疗软组织状况,例如约6个月至约12个月、约6个月至约15个月、约6个月至约18个月、约6个月至约21个月、约6个月至约24个月、约9个月至约12个月、约9个月至约15个月、约9个月至约18个月、约9个月至约21个月、约6个月至约24个月、约12个月至约15个月、约12个月至约18个月、约12个月至约21个月、约12个月至约24个月、约15个月至约18个月、约15个月至约21个月、约15个月至约24个月、约18个月至约21个月、约18个月至约24个月或约21个月至约24个月。

[0111] 本发明的方面部分地提供了施用本文公开的水凝胶组合物。如本文所使用,术语“施用”指向个体提供本文公开的组合物任何递送机制,其潜在地导致了临床上、在治疗上或实验上有益的结果。用于向个体施用组合物的实际递送机制可通过本领域普通技术人员考虑包括但不限于以下的因素来确定:皮肤状况的类型、皮肤状况的位置、皮肤状况的原因、皮肤状况的严重性、所需缓解程度、所需缓解的持续时间、使用的特定组合物、使用的特定组合物的排泄率、使用的特定组合物的药效、使用的特定组合物中包括的其它化合物的性质、特定施用途径、特定特性、个体病史和风险因素(例如年龄、体重、健康状况等)或其任何组合。在该实施方案的一个方面,通过注射向个体的皮肤区域施用本文公开的组合物。

[0112] 通常将基于个体和/或医师所需美容和/或临床效果和/或治疗的身体部位或区域确定向个体患者施用水凝胶组合物的途径。本文公开的组合物可通过本领域普通技术人员已知的任何方式施用,包括但不限于带针注射器、手枪(例如,液压气动压缩手枪)、导管、局部或通过直接手术植入。可向皮肤区域,例如真皮区或皮下区施用本文公开的水凝胶组合物。例如,可利用直径约0.26mm至约0.4mm且长度范围从约4mm至约14mm的针注射本文公开的水凝胶组合物。可选地,针可为21-32G并且长度为约4mm至约70mm。优选地,针为一次性使用针。所述针可与注射器、导管和/或手枪组合。

[0113] 另外,本文公开的组合物可一次或分多次施用。最后,使用的定时将按照护理质量标准。例如,本文公开的水凝胶组合物可一次或分几个时段施用,时段间隔几天或几周。例如,个体可每1、2、3、4、5、6或7天或每1、2、3或4周施用本文公开的水凝胶组合物。向个体施用本文公开的水凝胶组合物可一个月或两个月一次或每3、6、9或12个月施用一次。

[0114] 本发明的方面部分地提供了真皮区。如本文所使用,术语“真皮区”指包含表皮-真皮交界处的皮肤和包括浅表真皮(乳头区)和深层真皮(网状区)的真皮的区域。皮肤由三个

主要的层组成：表皮，其提供了防水性并用作感染的屏障；真皮，其用作皮肤附属物的位置；和皮下组织（皮下脂肪层）。表皮不含血管，并通过从真皮的扩散得到滋养。组成表皮的主要细胞类型为角化细胞、黑素细胞、朗格汉斯细胞（Langerhans cell）和梅克尔细胞（Merkels cell）。

[0115] 真皮是表皮下由结缔组织组成的皮肤层并为身体缓冲应力和应变。真皮与表皮通过基膜紧紧连接。它也包含提供触感和热感的许多机械性刺激感受器/神经末梢。它含有毛囊、汗腺、皮脂腺、顶泌腺、淋巴管和血管。在真皮中的血管提供了营养并且从它自身的细胞以及从表皮的基层去除废物。真皮在结构上分为两个区：邻近表皮、称为乳头区的浅表区和称为网状区的深部较厚区。

[0116] 乳头区由松弛网形结缔组织构成。它因其指状突出物而被称为乳头，其向表皮延伸。乳头为真皮提供了与表皮互相交错的“崎岖不平的”表面，加强了两层皮肤之间的连接。网状区位于乳头区深处，并且通常厚很多。它由致密的不规则结缔组织构成，并由编织它的致密浓度的胶原、弹性和网状纤维得名。这些蛋白纤维给予真皮强度、延展性和弹性性质。也位于网状区之内的是毛发根部、皮脂腺、汗腺、感受器、指甲和血管。纹身油墨保留在真皮中。由怀孕产生的妊娠纹也位于真皮中。

[0117] 皮下组织位于真皮下面。其作用是连接皮肤真皮区与下面的骨和肌肉以及为它提供血管和神经。它由疏松结缔组织和弹性蛋白组成。主要的细胞类型为成纤维细胞、巨噬细胞和脂细胞（皮下组织含有50%的体脂）。脂肪用作身体的垫料（padding）和保温材料。

[0118] 在该实施方案的一个方面，通过向皮下区域的真皮区注射，向个体的皮肤区域施用本文公开的水凝胶组合物。在该实施方案的方面，通过向（例如）表皮-真皮交界区、乳头区、网状区或其任何组合注射，向个体的真皮区施用本文公开的水凝胶组合物。

[0119] 有利的是，本发明一些组合物对减少（例如）患者薄皮区内细纹的出现特别有用且有效。例如，提供了细纹治疗的方法，包括在不大于约1mm的深度，向患者施用本文其它地方描述的真皮填充剂组合物的步骤。

[0120] 本说明书的其它方面部分地公开了治疗皮肤状况的方法，包括向患有皮肤状况的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤，其中施用所述组合物改善了皮肤状况，从而治疗了皮肤状况。在该实施方案的一个方面，（皮肤状况是）治疗皮肤脱水的方法包括向患有皮肤脱水的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤，其中施用所述组合物为皮肤补水，从而治疗了皮肤脱水。在该实施方案的另一方面，治疗皮肤缺乏弹性的方法包括向患有皮肤缺乏弹性的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤，其中施用所述组合物增加了皮肤弹性，从而治疗了皮肤缺乏弹性。在该实施方案的又一方面，治疗皮肤粗糙的方法包括向患有皮肤粗糙的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤，其中施用所述组合物减少了皮肤粗糙，从而治疗了皮肤粗糙。在该实施方案的又一方面，治疗皮肤缺乏紧固度的方法包括向患有皮肤缺乏紧固度的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤，其中施用所述组合物使皮肤更紧，从而治疗了皮肤缺乏紧固度。

[0121] 在该实施方案的又一方面，治疗皮肤拉伸纹或妊娠纹的方法包括向患有皮肤拉伸纹或妊娠纹的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤，其中施用所述组合物减少或消除了皮肤拉伸纹或妊娠纹，从而治疗了皮肤拉伸纹或妊娠纹。在该实施方案的另一方面，治疗皮肤苍白的的方法包括向患有皮肤苍白的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤，其中施

用所述组合物增强了肤色或光彩,从而治疗了皮肤苍白。在该实施方案的另一方面,治疗皮肤皱纹的方法包括向患有皮肤皱纹的个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤,其中施用所述组合物减少或消除了皮肤皱纹,从而治疗了皮肤皱纹。在该实施方案的又一方面,治疗皮肤皱纹的方法包括向个体施用本文公开的水凝胶组合物的步骤,其中施用所述组合物使皮肤抗皮肤皱纹,从而治疗了皮肤皱纹。

[0122] 在一些实施方案中,真皮填充剂具有持续的生物利用率。例如,提供了在引入人类皮肤中时,(例如,经皮内或皮下引入人类以修正面部上的软组织孔隙缺损),向人类释放抗坏血酸(或其它维生素)至少约1个月或长达约20个月或更长时间的真皮填充剂。

[0123] 例如,为预测与填充剂持续时间一致的维生素C持续功效,对结合度进行评估。这种评估基于AA2G经醚化与HA结合的制剂。所述制剂在生理条件下稳定,但是开始由附着于细胞膜上的 α -葡萄糖苷酶开始释放抗坏血酸(AsA)。由于 α -葡萄糖苷酶附着于细胞膜上,所以AsA的释放在填充剂/细胞界面发生。进一步地,AsA从HA-AA2G的释放将伴有HA降解以使得AA2G对成纤维细胞可用。因此AsA的释放取决于HA的AA2G结合度和持续时间。结合度为约5mol%的凝胶可在至少长达1个月,例如介于约3~5个月时期内释放活性维生素C;10mol%结合度的凝胶可在至少长达6~8个月时期内释放活性维生素C;15mol%结合度的凝胶可在至少长达10~个月时期内释放活性维生素C;30mol%,长达一年半。

[0124]	结合度(mol%)	总的可用 AsA*(mM)	计算数值(月)**
	3	2.13	2.8
	5	3.55	3.1
	1	7.10	6.3
	15	10.65	9.4
	25	17.75	15.7
	30	21.13	18.8

[0125] *基于凝胶的参数:体积,0.1cc;浓度,24mg/ml。 $(0.1 \times 24 \times 3\% \times 1000) / (338 \times 0.1) = 2.13$ (mM)

[0126] **假设:

[0127] AsA以恒定速率释放。

[0128] AsA的有效浓度为0.05mM并且保持有效 >2 天 $2.13 \times 2 / (0.05 \times 30) = 2.8$ (个月)

[0129] 在本发明的一个实施方案中,提供了一种真皮填充剂,其包含与Star-PEG环氧化物交联的透明质酸并且具有以介于约3mol%和约40mol%之间的结合度与透明质酸结合的维生素C衍生物例如,AA2G(抗坏血酸2-葡萄糖苷)、维生食物(3-氨基丙基-L-抗坏血酸磷酸酯)和SAP(抗坏血酸磷酸钠)之一。

[0130] 制备这种真皮填充剂的方法包括使季戊四醇缩水甘油醚(Star-PEG环氧化物)与抗坏血酸2-葡萄糖苷(AA2G)按一定比例反应,反应温度和反应时间适合获得含有由4-臂环氧化物加帽的AA2G(AA2G-4臂环氧化物)、未反应的4臂环氧化物和游离AA2G的组合物。4-臂环氧化物加帽的AA2G(AA2G-4臂环氧化物)经环氧基与透明质酸结合。未反应的4臂环氧化物

物用作交联剂以交联透明质酸并且用作结合剂以进一步结合AA2G。

[0131] 在本发明的另一实施方案中,提供了一种真皮填充剂,其包含与BDDE交联的透明质酸并且具有以介于约3mol%和约10mol%之间的结合度与透明质酸结合的维生素C衍生物例如,AA2G(抗坏血酸2-葡萄糖苷)、维生素食物(3-氨基-L-抗坏血酸磷酸酯)和SAP(抗坏血酸磷酸钠)之一。

[0132] 制备这种真皮填充剂的方法包括使BDDE与抗坏血酸2-葡萄糖苷(AA2G)按一定比例反应,反应温度和反应时间适合获得含有由BDDE加帽的AA2G(AA2G-BDDE)、未反应的BDDE和游离AA2G的组合物。BDDE加帽的AA2G(AA2G-BDDE)经环氧基与透明质酸结合。未反应的BDDE用作交联剂以交联透明质酸并且用作结合剂以进一步结合AA2G。

[0133] 图9是显示 α -葡萄糖苷酶浓度对从AA2G-PBS溶液释放AsA的影响的表。AA2G向AsA的转化取决于 α -糖苷酶的浓度。当 α -糖苷酶浓度为6.3个单位/g凝胶时,AA2G在15min内几乎完全转化为AsA。当 α -糖苷酶浓度为4.7个单位/g凝胶时,需要30min将AA2G完全转化为AsA。进一步降低 α -糖苷酶浓度导致AA2G向AsA的转化缓慢。

[0134] 图10示出了来自根据本发明所述的结合真皮填充剂的游离AsA的释放曲线示意图(持续释放)(与反应时间相比的AA2G转化mol%)。在AA2G/HA混合物中AA2G在40min内完全转化为AsA。AA2H/HA结合物显示出AA2G转化为AsA的时间依赖性。

[0135] 图11A和11B示出了根据本发明所述的各种真皮填充剂的附加释放数据。更具体地,HA-AA2G凝胶中AA2G向AsA的转化取决于 α -糖苷酶浓度。高的 α -糖苷酶浓度导致AA2G向AsA快速转化。对于指定 α -糖苷酶浓度而言,不同制剂显示出AA2G向AsA转化的不同性质。

[0136] 在本发明的一个方面,提供了真皮填充剂,其对于治疗和消除细纹的出现特别有效,例如皮肤上相对浅表的皱褶,例如但不限于眼睛、泪沟区、前额附近的细纹、眼角纹、眉间纹等。

[0137] 在已经注射了真皮填充剂的皮肤部位出现蓝色变色(廷德尔效应)是一些真皮填充剂患者经历的重大不良事件。廷德尔效应在治疗浅表细小皱纹的患者中更常见。已经研发了本发明的实施方案,其提供了可在浅表注射以治疗细纹和皱纹,甚至在相对较薄的皮肤区域中注射,没有任何由廷德尔效应产生的蓝色变色的长效、半透明填充剂。细纹或浅表皱纹一般被理解为通常在皮肤最薄,即皮肤的真皮厚度小于1mm的面部区域(前额、外眦、唇红缘/口周线)中发现的皮肤上的皱纹或皱褶。在前额,平均真皮厚度对于正常皮肤而言为约0.95mm而对于起皱皮肤而言为约0.81mm。外眦周围的真皮甚至更薄(例如对于正常皮肤而言约0.61mm而对于起皱皮肤而言约0.41mm)。30或32G针(通常用于细纹凝胶应用的针)的平均外径为约0.30和约0.24mm。

[0138] 本发明提供了例如在本文其它地方描述的不会导致廷德尔效应的真皮填充剂组合物。例如,本发明的组合物包含与交联剂交联的透明质酸组分、除交联组分外的添加剂;当施用到患者的真皮区内时,相对于除没有所述添加剂外,大体上相同的组合物,所述组合物表现出廷德尔效应减小。所述组合物可大体上光学透明。

[0139] 在一个实施方案中,添加剂是维生素C衍生物,例如可与本文其它地方描述的透明质酸化学结合的AA2G。

[0140] 在一些实施方案中,交联组分是BDDE并且结合度介于约3mol%和约10mol%之间,或高达15mol%或更高。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含适于在注射后为患者提

供舒适的量的麻醉剂,例如利多卡因。

[0141] 还提供了治疗患者皮肤上的细纹的方法。所述方法通常包括向患者皮肤内引入例如本文所述的组合物的步骤。例如所述组合物包含透明质酸组分、交联透明质酸的交联组分和除交联组分外的添加剂的混合物,所述组合物大体上光学透明;并且其中相对于除没有所述添加剂外,大体上相同的组合物,真皮填充剂组合物表现出廷德尔效应减小。

[0142] 在本发明的一些实施方案中,所述组合物包含使用EDC化学与二胺或多胺交联剂交联的透明质酸组分。例如,所述交联剂可为HMDA。

[0143] 在交联剂为HMDA的本发明的某些实施方案中,所述组合物的 G' 高达约70Pa, G''/G' 介于约0.65和约0.75之间,挤压力约24N或更小,并且最终HA浓度介于约24mg/g和约25mg/g之间。

[0144] 在添加剂为HA-AA2G结合物或HA-维生食物结合物的本发明的某些实施方案中,结合度介于约3mol%和约10mol%之间,或高达约15mol%,或高达约40mol%。这些组合物的 G' 从至少约30Pa,更优选至少约40Pa到约100Pa, G''/G' 介于约0.30和约0.50之间,挤压力约27N或更小,并且最终HA浓度介于约24mg/g和约25mg/g之间。

[0145] 为了本发明的目的,如本文所使用的“结合度”定义为结合体的摩尔百分比,例如AA2G与透明质酸重复单元(例如,HA二聚体)。因此,10mol%结合度意指每100个HA重复单元含10个结合的AA2G。可使用下面实施例2中说明的方法,或本领域技术人员已知的其它方法计算结合度。

实施例

[0146] 实施例1:使用BDDE作为交联剂AA2G与交联的HA凝胶结合

[0147] 使400.6mg的低分子量透明质酸(LMW HA)在注射器中1802mg的1wt%NaOH中水合~30min。将800.7mg的AA2G放入小瓶中,接着放入713.7mg的BDDE和1416.8mg的10%NaOH。在添加到水合HA中之前,使以上溶液(pH>12)在50℃水浴中反应~20min。添加之后,通过在2个注射器之间来回传递使混合物混合~20次。将混合的糊剂放入小瓶和50℃水浴中~2.5h。将223.5mg的12M HCl添加到9.05g PBS(pH7.4)中。~2.5h后,形成HA-AA2G凝胶。将凝胶切成片,并且向其中添加HCl-PBS溶液。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀整夜。通过~60μm筛子筛分凝胶并且通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入15,000MWC RC透析袋中并且在PBS(pH7.4)缓冲液中透析。透析进行~185h,频繁更换PBS缓冲液。透析后,将凝胶放入注射器中并且储存在4℃冰箱中。

[0148] 实施例2:AA2G结合的测定

[0149] 透析之前和透析之后正确记录如实施例1所述的凝胶的重量。假设透析之后凝胶为~1g/mL。在1L PBS中每>8h,没有出现显而易见的AA2G时停止透析。使用UV/Vis分光光度计(Nanodrop2000C,ThermoScientific)在260nm下测量AA2G。使用2%HA中AA2G的不同浓度($A@260nm = 1.4838[AA2G(mM)]$)计算AA2G的校准曲线。

[0150] 透析之后HA的重量:HA的起始重量×(透析之前的实际重量/理论重量)

[0151] 透析之后AA2G的mmol:透析之后在方程式($A@260nm = 1.4838[AA2G(mM)]$)中将吸收设于260nm下。

[0152] AA2G的结合@:(AA2G的mmol/mmol的HA)×100%

[0153] 如实施例1中所述凝胶中的AA2G结合度为14.7mol%。

[0154] 实施例3:凝胶流变性的测定

[0155] 使用振荡平行板流变仪 (Anton Paar, Physica MCR301) 测量实施例1中获得的凝胶的性质。所用板的直径为25mm。板间间隙设为1mm。对于每次测量而言,在固定频率下应变扫描之前,首先进行在恒定应变下的频率扫描。在1%应变下由应变扫描曲线获得 G' (储能模量)。对凝胶而言值为1450Pa。

[0156] 实施例4:使用BDDE作为交联剂,以可调结合度和凝胶流变性AA2G与交联的HA凝胶结合

[0157] 程序与实施例1中描述的相似。通过调整交联剂与HA和AA2G摩尔比更改结合度。如实施例3中所述测量凝胶性质。详情如下:

[0158] 使400.8mg的LMW HA在注射器中1752.1mg的1%NaOH中水合~30min。将800.3mg的AA2G放入小瓶中,接着放入354.1mg的BDDE和1402.0mg的10%NaOH。在添加到水合HA之前,使以上溶液 ($\text{pH}>12$) 在50℃水浴中反应~20min。添加之后,通过在2个注射器之间来回传递使混合物混合~20次。将混合的糊剂放入小瓶和50℃水浴中~2.5h。将140.9mg的12M HCl添加到9.0053g PBS ($\text{pH}7.4$) 中。~2.5h后,形成HA-AA2G凝胶。将凝胶切成片,并且向其中添加HCl-PBS溶液。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀整夜。通过~60 μm 筛子筛分凝胶并且通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入15,000MWCO RC透析袋中并且在PBS ($\text{pH}7.4$) 缓冲液中透析。透析进行~164.5h,频繁更换PBS缓冲液。透析后,将凝胶放入注射器中并且储存在4℃冰箱中。结合度为13%。凝胶储能模量 (G') 为803Pa。

[0159] 实施例5:使用BDDE作为交联剂,AA2G与交联的HA凝胶结合,结合度为5.3%, G' 为~300Pa。

[0160] 使400.3mg的LMW HA在注射器中3002.0mg的1%NaOH中水合~30min。将800.5mg的AA2G放入小瓶中,接着放入264.3mg的BDDE和1100.0mg的10%NaOH。在添加到水合HA之前,使以上溶液 ($\text{pH}>12$) 在50℃水浴中反应~20min。添加之后,通过在2个注射器之间来回传递使混合物混合~20次。将混合的糊剂放入小瓶和50℃水浴中~2.5h。将104.2mg的12M HCl添加到8.5128g PBS ($\text{pH}7.4$) 中。~2.5h后,形成HA-AA2G凝胶,并且向其中添加HCl-PBS溶液。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀整个周末 (~55h)。通过~60 μm 筛子筛分凝胶并且通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入15,000MWCO RC透析袋中并且在PBS ($\text{pH}7.4$) 缓冲液中透析。透析进行~114h,频繁更换PBS缓冲液。透析后,将凝胶放入注射器中并且储存在4℃冰箱中。按实施例2和3中描述的程序测量结合度和凝胶流变性。结合度为5.3%。凝胶储能模量为~300Pa。

[0161] 实施例6:使用star-PEG环氧化物作为交联剂,AA2G与交联的HA凝胶结合,结合度为29.4%, G' 为~235Pa。

[0162] 使200.4mg的LMW HA在注射器中2000mg的1%NaOH中水合~30min。将400mg的AA2G放入小瓶中,接着放入312.7mg的star-PEG环氧化物和1026.5mg的10%NaOH。在添加到水合HA之前,使以上溶液在50℃水浴中反应~20min。添加之后,通过在2个注射器之间来回传递使混合物混合~20次。将混合的糊剂放入小瓶和50℃水浴中~2.5h。将187.4mg的12M HCl添加到3.034g PBS ($\text{pH}7.4$) 中。~2.5h后,形成HA-AA2G凝胶,并向其中添加HCl-PBS溶液。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀整个周末 (~68h)。通过~60 μm 筛子筛分凝胶并且

通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入15,000MWCO RC透析袋中并且在PBS (pH7.4) 缓冲液中透析。透析进行~95h, 频繁更换PBS缓冲液。透析后, 将凝胶放入注射器中并且储存在4℃冰箱中。按实施例2和3中描述的程序测量结合度和凝胶流变性。结合度为29.4%。凝胶储能模量为~235Pa。

[0163] 实施例7: 使用star-PEG环氧化物作为交联剂, AA2G与交联的HA凝胶结合, 结合度为27.8%, G' 为~363Pa。

[0164] 使200.3mg的LMW HA在注射器中2000mg的1%NaOH中水合~30min。将400.2mg的AA2G放入小瓶中, 接着放入313.4mg的star-PEG环氧化物和1022.6mg的10%NaOH。将以上溶液添加到水合HA中。添加之后, 通过在2个注射器之间来回传递使混合物混合~20次。将混合的糊剂放入小瓶和50℃水浴中~2.5h。将196.5mg的12M HCl添加到3.016g PBS (pH7.4) 中。~2.5h后, 形成HA-AA2G凝胶, 并向其中添加HCl-PBS溶液。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀整夜(~24h)。通过~60 μ m筛子筛分凝胶并且通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入15,000MWCO RC透析袋中并且在PBS (pH7.4) 缓冲液中透析。透析进行~98.5h, 频繁更换PBS缓冲液。透析后, 将凝胶放入注射器中并且储存在4℃冰箱中。按实施例2和3中描述的程序测量结合度和凝胶流变性。结合度为27.8%。凝胶储能模量为~363Pa。

[0165] 实施例8: 使用BDDE作为交联剂, AA2G与交联的HMW HA凝胶结合, 结合度为约10mol%, G' 为约240Pa。

[0166] 使400.3mg的HMW HA在注射器中2501.3mg的4wt%NaOH中水合~30min。将1200mg的AA2G放入小瓶中, 接着放入304.7mg的BDDE和1178.6mg的16wt%NaOH。在添加到水合HA之前, 使以上溶液 (pH>12) 在50℃水浴中反应~20min。添加之后, 通过在2个注射器之间来回传递使混合物混合~20次。将混合的糊剂放入20cc小瓶和50℃水浴中~2.5h。~2.5h后, 形成HA-AA2G凝胶。将226.6mg的12M HCl添加到8492.2mg10 $\times$ PBS (pH7.4) 中获得HCl-PBS溶液并且添加HCl-PBS溶液以使凝胶中和和膨胀。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀48h以上。通过~60 μ m筛子筛分凝胶并且通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入20,000MWCO CE透析袋中并且在PBS (pH7.4) 缓冲液中透析。透析进行~114h, 频繁更换PBS缓冲液。透析后, 将凝胶放入注射器中并且储存在4℃冰箱中。按实施例2和3中描述的程序测量结合度和凝胶流变性。结合度为10mol%。凝胶储能模量为约240Pa。

[0167] 实施例9: 使用BDDE作为交联剂, 维生食物与交联的LMW HA凝胶结合, 结合度为15mol%, G' 为约365Pa。

[0168] 使398.2mg的LMW HA在注射器中1753.24mg的1wt%NaOH中水合~40min。向膨胀的HA中添加BDDE (311.7mg) 并且继续让HA再膨胀80min。使膨胀的HA/BDDE混合物在50℃下预先反应20min。

[0169] 将801.9mg的维生食物单独溶于1459.7mg的10wt%NaOH中并且和与BDDE预先反应的HA混合。使混合物继续在50℃下再反应2.5h。~2.5h后, 形成HA-维生食物。将195mg的12M HCl添加到9004.0mg的10 $\times$ PBS (pH7.4) 中获得HCl-PBS溶液并且添加HCl-PBS溶液以使凝胶中和和膨胀。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀48h以上。通过~60 μ m筛子筛分凝胶并且通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入20,000MWCO CE透析袋中并且在PBS (pH7.4) 缓冲液中透析。透析进行~120h, 频繁更换PBS缓冲液。透析后, 将凝胶放入注射器中并且储存在4℃冰箱中。按实施例3中描述的程序测量凝胶流变性。使用与实施例2中描

述的AA2G测定相似的方法测定结合度为约15mol%。凝胶储能模量为约365Pa。

[0170] 实施例10: 维生食物经酰胺化学与线性HA结合

[0171] 使200.3mg的HMW HA在60cc注射器中10ml的水中水合。将500mg的维生食物溶于0.5ml水中并且将溶液中和到pH4.8。将197.7mg的EDC和149mg的NHS单独溶于6ml水中。将以上溶液(溶液和EDC/NHS溶液)添加到另一装有23.5ml水的60cc注射器中。通过在2个注射器之间来回传递混合20次。将混合物储存在一个注射器中并且浸入37℃浴中4h。最后用PBS(pH7.4)缓冲液透析溶液,直至没有观察到显而易见的维生食物。通过如实施例3描述的类似方法测定结合度。结合度为约10mol%。

[0172] 实施例11: AA2P与交联的HA凝胶的结合

[0173] 使200.4mg的LMW HA在注射器中1000mg的MES5.2缓冲液中水合~30min。将292mg的AA2P放入小瓶,接着添加300mg的star-PEG胺。使以上溶液在室温下反应整夜。用PBS缓冲液使凝胶水合并并且用PBS缓冲液透析以去除未反应的AA2P。如实施例2和3所述,表征最后的凝胶以测定结合度和凝胶流变性。结合度为约20mol%。储能模量(G')为约500Pa。

[0174] 实施例12

[0175] 用于减少细纹出现的具有AA2G的HA/BDDE真皮填充剂产品的配制

[0176] 对以上实施例中描述的任何凝胶,在透析后,向凝胶中添加适量游离HA凝胶以提高改变凝胶粘聚性和/或可注射性。例如,使游离HA纤维在磷酸盐缓冲液中膨胀,以便获得均匀粘弹性凝胶(“游离”HA凝胶)。在透析步骤之前,将这种未交联的凝胶添加到实施例1中获得的HA/BDDE交联凝胶中(例如,以获得具有约1%至约5%w/w游离HA的组合物)。然后将所得凝胶填充到易于填充的无菌注射器中并且在足够温度和压力下高压蒸汽灭菌至少约1min。高压蒸汽灭菌后,包装HA/AA2G最终产品并分发给医师以用作真皮填充剂浅表注射,改善眶周或其它面部区域中细纹的出现。

[0177] 实施例13

[0178] 包括利多卡因的HA-AA2G真皮填充剂的配制

[0179] 按照实施例12的程序,但是在透析步骤之后和添加游离HA凝胶之前,向混合物中添加利多卡因盐酸盐(利多卡因HCl)。首先将粉末形式的(利多卡因HCl)溶解于WFI中并且通过0.2 μ m过滤器过滤。向粘性HA/AA2G凝胶中添加NaOH稀溶液以便达到弱碱性pH(例如,介于约7.5和约8之间的pH)。然后将利多卡因HCl溶液添加到弱碱性凝胶中以达到最终所需浓度,例如约0.3%(w/w)的浓度。然后HA/AA2G/利多卡因混合物的所得pH为约7而HA浓度为约24mg/g。在装备有适当搅拌机的标准反应器中进行机械混合以便获得适当均匀性。

[0180] 实施例14

[0181] 含羧基官能团的添加剂与HA水凝胶的结合

[0182] 添加剂,例如视黄酸(AKA,维甲酸)、阿达帕林(adapalence)和 α -硫辛酸含有羧基官能团($-COOH$)。使用EDC化学经酯化作用,使这些添加剂与HA水凝胶结合。以下描述了根据本发明一个实施方案所述的结合的实例:

[0183] 使200mg的HMW HA在60cc注射器中10ml的pH4.8MES缓冲液中水合。在另一个注射器中,将200mg的视黄酸溶于5ml的水-丙酮混合物(水/丙酮体积比1:3)。通过注射器连接器混合以上两个注射器约20次。然后将197.7mg的EDC和149mg的NHS分别溶于单独注射器中的6ml水中。装有EDC和NHS的注射器与装有HA和视黄酸的注射器连接,以通过在2个注射器之

间来回传递使反应物混合至少20次。将混合物储存在一个注射器中并且浸入37℃浴中4h。用异丙醇透析凝胶以去除未结合的视黄醇,然后在无菌条件下用PBS缓冲液透析。将凝胶包装到无菌注射器中并于4℃下储存。

[0184] 实施例15

[0185] 含羟基官能团的添加剂与HA水凝胶的结合。

[0186] 添加剂,例如视黄醇(AKA,维甲酸)、过氧化氢酶、二甲氨基乙醇和g-生育酚含有羟基官能团(-OH)。使用EDC化学经酯化作用,使这些添加剂与HA水凝胶结合。以下描述了结合的典型实例:

[0187] 使200mg的HMW HA在60cc注射器中10ml的2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)缓冲液(pH4.8)中水合。在另一个注射器中,将200mg的视黄醇溶于5ml的水-丙酮混合物(水/丙酮体积比1:3)。通过注射器连接器混合以上两个注射器约20次。然后将197.7mg的EDC和149mg的NHS分别溶于单独注射器中的6ml水中。装有EDC和NHS的注射器与装有HA和视黄醇的注射器连接,以通过在2个注射器之间来回传递使反应物混合至少20次。将混合物储存在一个注射器中并且浸入37℃浴中4h。用异丙醇透析凝胶以去除未结合的视黄醇,然后在无菌条件下用PBS缓冲液透析。将凝胶包装到无菌注射器中并于4℃下储存。

[0188] 实施例16

[0189] 含羟基官能团的添加剂与HA水凝胶通过后改性的结合。

[0190] 这是一个两步过程。

[0191] 步骤1:用EDC/NHS处理交联HA凝胶,例如基于HA的商用真皮填充剂(例如, **JUVEDERM[®]**、Allergan、Irvine CA或 **Restylane[®]** Medicis Aesthetics, Inc.)以活化HA的羧基。

[0192] 步骤2:用含羟基的添加剂处理活化HA水凝胶。含羟基的添加剂为视黄醇、过氧化氢酶、二甲氨基乙醇和g-生育酚羟基官能团(-OH)。

[0193] 添加剂与交联HA凝胶结合的典型实例如下:

[0194] 在室温下使2gm的Juvederm凝胶与200gm的EDC和150mg的NHS混合。然后添加200mg在3ml丙酮-水混合物中的视黄醇。使以上混合物在37℃下反应4h。用异丙醇透析凝胶以去除未结合的视黄醇,然后在无菌条件下用PBS缓冲液透析。将凝胶包装到无菌注射器中并于4℃下储存。

[0195] 实施例17

[0196] 生长因子、肽或弹性蛋白与HA水凝胶的结合

[0197] 含有胺官能团的添加剂,例如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)和肽,可与HA结合以形成有益真皮填充剂。这些添加剂通过酰胺化化学与HA结合。以下描述了结合的典型实例:

[0198] 使200.3mg的HMW HA在10ml的MES pH5.4缓冲液中水合。添加20mg在100mg MES溶液中的EGF。向以上混合物,添加197.7mg的EDC和149mg。使所得反应混合物在37℃下反应4h。反应完成后,用异丙醇进一步透析凝胶,然后在无菌条件下用PBS缓冲液透析。将凝胶包装到无菌注射器中并于4℃下储存。

[0199] 本发明进一步提供了增强移植脂肪组织生活力的方法。所述方法可能通常包括向患者邻近移植脂肪组织的皮肤引入组合物的步骤,所述组合物为本文其它地方描述的组合物。

物。例如,所述组合物可包含透明质酸和与透明质酸共价结合的维生素C衍生物,其中结合度介于约3mol%和约40mol%之间。在本发明的其它方面,治疗皮肤的方法包括向皮肤内引入包含脂肪组织、透明质酸和与透明质酸结合的维生素C的组合物的步骤。

[0200] 实施例18

[0201] 生长因子、肽或弹性蛋白与HA水凝胶的结合

[0202] 为评估维生素C及其衍生物对人脂肪组织来源的干细胞(hASC)的促有丝分裂作用,hASC在组织培养塑料上,于补充或未补充呈游离形式的维生素C(抗坏血酸)或其衍生物(维生食物或AA2G)的完全MesenPro培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA)中培养4天。通过如生产商(ATCC,Manassas,VA)所描述的MTT测定法估计增殖。4天后,发现抗坏血酸0.25、0.5和1mM的浓度使增殖(按通过脱氢酶转化为紫色甲臍的黄色四唑MTT的量测量)(紫色甲臍被洗涤剂溶解)分别比缺乏抗坏血酸的对照提高60%、80%和96%。使用相同浓度的AA2G分别获得超过对照70%、60%和50%的增殖提高。用维生食物获得相似结果,分别显示比对照增加70%、60%和30%。总之,维生素C及其衍生物、AA2G和维生食物在含生长因子的培养基存在下提高了细胞培养中的hASC增殖。

[0203] 具有结合维生素C的交联HA凝胶

[0204] 在下面实施例19和20中描述了具有结合维生素C的基于交联HA的凝胶和使用1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)作为交联剂的制剂,根据本发明的某些实施方案,其表现出廷德尔效应减小和其它优点。在实施例19中,维生素C衍生物是抗坏血酸2-葡萄糖苷(AA2G)而在实施例20中,维生素C衍生物是抗坏血酸3-氨基磷酸酯(维生食物)。这些凝胶具有最佳流变性、优良的可注射性和高HA浓度(25mg/g)。虽然不希望受任何特定操作理论约束,但是本发明人已经发现在AA2G或维生食物存在下使HA与BDDE交联大大改变了凝胶的性质,相对于和BDDE交联的商用HA凝胶,凝胶具有高交联密度、高HA浓度、低粘性和低挤压力。因为交联期间存在AA2G或维生食物,所以目前形成的凝胶具有单独或经由BDDE,作为侧基和桥接HA链的交联剂与HA链偶联的这些抗坏血酸衍生物。凝胶的显微结构已经改变,导致凝胶即使通过细至30G的针,挤压力也非常低。而且,凝胶具有约3mol%至约10mol%或高达约15mol%的与HA结合的维生素C。在注射凝胶时,它们通过内源酶,例如来自成纤维细胞的 α -葡萄糖苷酶或磷酸酶释放活性维生素C。活性维生素C可引发皮肤胶原蛋白形成并且可起自由基清除剂的作用抑制凝胶降解。

[0205] 实施例19

[0206] 廷德尔效应减小的HA/AA2G凝胶的配制

[0207] 在添加1764.0mg的5wt%NaOH溶液后,使注射器中400.1mg的LMW HA和402.3mg AA2G的混合物水合60min。在单独小瓶中添加800.8mg的AA2G,接着添加1401.1mg的9.1wt% NaOH溶液和252.6mg的BDDE。使所得溶液(pH>12)在50℃水浴中反应~20min,之后将其转移到水合HA中。添加之后,通过将其在两个注射器之间来回传递使混合物混合~20次。然后将糊剂转移到小瓶中,之后将其置于50℃水浴中~2.5h。交联后,添加含197.0mg的12M HCl和9.18g10×PBS(pH7.4)的溶液以中和碱,并且使凝胶在定轨振荡器上膨胀72h。迫使其通过~60 μ m孔径的网筛分凝胶。通过将其在两个注射器之间来回传递混合筛过的凝胶~20次,之后将其转移到纤维素酯透析袋(MWCO~20kDa)中并且用PBS(pH7.4)缓冲液透析5天,每天更换缓冲液两次。透析后,将凝胶分配到1ml COC注射器中,在5000RPM下离心5min以去除气

泡,并且用湿蒸汽灭菌。该凝胶具有25mg/g的HA最终浓度,如实施例2中所述计算的约10mol%的AA2G mol%和约80Pa的G'。以相似方式制备其它凝胶,G'值为约60Pa至约80Pa。

[0208] 实施例19A

[0209] 廷德尔效应减小的具有利多卡因的HA/AA2G凝胶的配制

[0210] 向实施例19的凝胶添加一定量的利多卡因以生成具有利多卡因的HA/AA2G凝胶,其具有0.3%ww利多卡因。通过将利多卡因HCl溶于PBS缓冲液(pH~7.4)中制备利多卡因溶液。透析之后但是在灭菌之前,向实施例19中的凝胶添加等分试样的利多卡因溶液。然后完全混合凝胶以获得具有0.3%ww利多卡因浓度的均匀混合物。

[0211] 实施例20

[0212] 廷德尔效应减小的HA/维生食物凝胶的配制

[0213] 使401.0mg的LMW HA在注射器中2355.0mg的1wt%NaOH溶液中水合~45min。将303.8mg BDDE添加到水合HA中并且通过注射器间混合,混合10次。使混合物在50℃水浴中预先反应15min。将800.1mg的维生食物单独溶于950.6mg的15wt%NaOH中,接着溶于510.1mL Milli-Q水中。使用注射器间混合,使维生食物溶液与预热的水合HA/BDDE混合物来回混合30次。将混合物放回50℃水浴中并且再继续反应2h,之后将含有148.1mg的12M HCl和8523.1mg的10×PBS (pH7.4)的溶液添加到交联剂中。添加HCl-PBS溶液以中和凝胶并使其膨胀。使凝胶中和并且在定轨振荡器上膨胀48h以上。通过~60μm筛子筛分凝胶并且通过在2个注射器之间来回传递混合~20次。将凝胶放入20,000MWCO CE透析袋中并且在PBS (pH7.4)缓冲液中透析。透析进行~197h,频繁更换PBS缓冲液。透析后,将凝胶转移到1mL COC注射器中,在5000RPM下离心5min并用湿蒸汽灭菌。凝胶的HA最终浓度为24mg/g。

[0214] 经1-乙基-3-[3-二甲基氨丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)化学交联的HA凝胶

[0215] 在下面实施例21和22中描述了根据本发明的某些实施方案,表现出廷德尔效应减小和其它优点的基于交联HA的凝胶的制备。在实施例21中,使用为己二胺(HMDA)的交联剂而在实施例20中使用为3-[3-(3-氨丙基)-2,2-双(3-氨基-丙氧基甲基)-丙氧基]-丙胺(4臂胺-4AA)的交联剂,经EDC化学制备凝胶。在温和条件下,例如室温和例如pH5.4下进行交联。可调整反应条件以制备具有最佳凝胶性质、优良可注射性和高HA最终浓度(~24mg/g)的高度网状凝胶。发明人已经发现,在非常低的水合或反应浓度下,用适量HMDA或4AA,连同偶联剂,即1-乙基-3-[3-二甲基氨丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或磺酰基-NHS(磺基-NHS)使HA交联可能有利。凝胶的交联点将相互远离,因此高度交联的材料具有高阻尼力。相反,HA与BDDE在如此低的水合或反应浓度下的交联可能由于交联剂相对无效而不可行。

[0216] 实施例21

[0217] 廷德尔效应减小的HA/HMDA凝胶的配制

[0218] 将20.0g的100mM MES缓冲液(pH5.2)添加到装有1000.0mg的LMW HA的注射器中。通过将260.9mg HMDA.HCl溶于2010.5mg的100mM MES缓冲液(pH5.2)中,并且添加2μL的1M NaOH使pH达到5.2制备HMDA溶液。通过将254.2mg的EDC溶于1188.4mg 100mM MES缓冲液(pH5.2)中制备EDC溶液,并且于单独小瓶中,将44.3mg的NHS溶于1341.8mg的100mM MES缓冲液(pH5.2)中。HA完全水合后,~1h,向水合HA中添加790μL的HMDA溶液。通过注射器间混合匀化混合物10次。然后将490μL EDC和490μL NHS溶液添加到匀化糊剂中并且通过注射器

间混合再混合10次。然后将混合物转移到小瓶中并且在添加17.9ml的1×PBS缓冲液(pH7.4)之前,在室温下交联5h。在迫使其通过60 μ m孔径的网之前,使凝胶在滚筒上膨胀3天。将筛分的凝胶放在纤维素酯膜透析管MWC020KDa中并且用1×PBS透析4天,每天更换缓冲液两次。将凝胶分配在1ml COC注射器中,在5000RPM下离心5min,并用湿蒸汽灭菌。凝胶的HA最终浓度为25mg/g。

[0219] 实施例22

[0220] 廷德尔效应减小的HA/4AA凝胶的配制

[0221] 将32.55g的100mM MES缓冲液(pH5.2)添加到装有1000.4mg的LMW HA的注射器中。通过将256.3mg4AA溶于1039.8mg的100mM MES缓冲液(pH5.2)中,并且添加380 μ l的6M HCl使pH达到5.2制备4AA溶液。通过将251.2mg的EDC溶于1013.8mg100mM MES缓冲液(pH5.2)中制备EDC溶液,并且于单独小瓶中,将74.7mg的NHS溶于2020.0mg的100mM MES缓冲液(pH5.2)中。HA完全水合后,~1h,向水合HA中添加260 μ l的4AA溶液。通过注射器间混合匀化混合物10次。然后将277 μ l EDC和273 μ l NHS溶液添加到匀化糊剂中并且通过注射器间混合再混合10次。然后将混合物转移到小瓶中并且在添加6.4ml的10×PBS缓冲液(pH7.4)之前,在室温下交联5h。在迫使其通过60 μ m孔径的网之前,使凝胶在滚筒上膨胀3天。将筛分的凝胶放在纤维素酯膜透析管MWC020KDa中并且用1×PBS透析4天,每天更换缓冲液两次。将凝胶分配在1ml COC注射器中,在5000RPM下离心5min,并用湿蒸汽灭菌。凝胶的HA最终浓度为23mg/g。

[0222] 实施例23

[0223] 实施例19-22的凝胶流变性的测定

[0224] 使用振荡平行板流变仪,Anton Paar Physica MCR301,测量凝胶的流变性。在间隙高度为1mm时使用25mm的板直径。在25℃恒温下进行测量。每次测量由2%恒定应变和频率对数增长下1-10Hz的频率扫描组成,接着是随应变对数增长,5Hz恒定频率下1-300%的应变扫描。在1%应变下由应变扫描获得储能模量(G')和粘性模量(G'')。

[0225] 由实施例19-22获得的凝胶的储能模量和粘性模量

[0226]

样品ID	储能模量(G') Pa	粘性模量(G'') Pa
实施例19	84	25
实施例20	83	33.7
实施例21	67	42
实施例22	41	29.5

[0227] 实施例24

[0228] 实施例19-22的凝胶的挤压力测量

[0229] 使用Instron5564和Bluehill2软件测量将凝胶挤出30G针所需的力。将凝胶从1ml COC注射器挤出30G1/2TSK针。按100mm/min的速度推动活塞11.35min,并记录挤压力。

[0230] 由实施例19-22获得的凝胶的挤压力

[0231]

样品ID	挤压力(N)
实施例19	25

实施例20	24
实施例21	22
实施例22	19.5

[0232] 实施例25

[0233] 实施例19-22的凝胶的生物相容性试验

[0234] 在史-道二氏大鼠 (Sprague Dawley rat) 的背面皮内植入50 μ l弹丸注射的凝胶。在1周时取出植入物并用苏木精和伊红 (H&E) 染色和是单核炎性细胞标志物的CD68染色, 通过组织学分析植入物。基于染色程度为CD68的3张20 $\times$ 图像评分0-4。然后平均这些值以给出样品得分。每种凝胶分析4个样品。

[0235] 实施例19-22的平均CD68得分

[0236]

样品ID	得分
实施例1	1.8

[0237]

实施例2	1.6
实施例3	2.7
实施例4	1.3

[0238] 实施例26

[0239] 实施例19-22的凝胶的细胞毒性试验, ISO10993-5。

[0240] 根据ISO10993-5的琼脂糖覆盖法, 通过NAMSA进行凝胶的体外细胞毒性试验:《医疗器械生物学评价》-第5部分: 体外细胞毒性试验。向三个复孔添加0.1ml放在滤盘上的试验样品, 以及0.9%NaCl溶液、作为阴性对照的1cm长的高密度聚乙烯和作为阳性对照的1 $\times$ 1cm²乳胶部分。将每一个放在直接覆盖单层L929小鼠成纤维细胞的琼脂糖表面。37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂中孵育24h后, 从宏观和微观上检查培养物的任何异常细胞形态和细胞裂解。基于靠近样品的裂解区, 为试样评分0-4。因为试样样品未显示出引起任何细胞裂解或毒性的迹象, 所以来自实施例1、3和4的试验材料得分为0。

[0241] 廷德尔效应的定量分析

[0242] 为了进一步支持目视观测和进行HA填充剂的比较优势分析, 认为必须进行廷德尔效应的定量分析。同样在文献中没有对真皮填充剂有特异性的廷德尔效应的定量技术。然而, 基于对光散射及光和皮肤相互作用的现有科学理解, 采用基于(a) 比色法和(b) 光谱学的两种不同方法量化皮肤上的廷德尔效应。基于这些技术, 定义了3种不同的定量参数(如下所示)来测量体内廷德尔效应。

[0243] a) 廷德尔效应目测得分: 标度范围为1-5, 增量为0.5。对肤色正常且没有蓝色变色的注射部分给予得分1。对厚且明显的蓝色变色(通常与Restylane或Juvéderm Ultra Plus相关)给予最高得分5。在为试样盲评分之前, 为3名独立观察者培训标度。

[0244] b) 皮肤颜色的蓝色组分-“b”: 使用色度计(CM2600D, Konica Minolta, NJ) 量化从注射了不同填充剂的皮肤部位出射的光的蓝色组分。这通过使用L-a-b色标的“b”组分实现。

[0245] c) 从皮肤出射的“蓝光%”: 使用便携式分光光度计(CM2600D, Konica Minolta,

NJ) 量化总可见光范围内从皮肤出射的蓝光%。这可通过求400–490nm可见光谱下的面积的积分并且用光谱(400–700nm)下的总面积将其标准化而实现。

[0246] 实施例27

[0247] 凝胶的廷德尔评估

[0248] 使用直线注射法,通过27G1/2TSK针向2月龄无毛大鼠的大腿皮内注射凝胶。浅表植入凝胶以模拟临床细纹程序。在凝胶植入后进行廷德尔试验48h。进行廷德尔试验后,使动物安乐死以提高由于缺乏血红蛋白,廷德尔效应的对比度。

[0249] 图12中示出了植入2天后,来自实施例19和21的凝胶的图像。还示出了商用Juvéderm Refine和Restylane Touch的图像以便比较。在商用Juvéderm Refine和Restylane Touch的图像中蓝色线(廷德尔效应)清晰可见。来自实施例19、19A(未示出)和21的凝胶未表现出廷德尔效应。

[0250] 使用增量为0.5的目测得分1–5,为注射部位评分。得分为1的注射部位未显示出皮肤变色,而得分为5的注射部位显示出皮肤严重的蓝色变色。还借助于色度计(CM2600D, Konica Minolta, NJ)对注射部位进行了光谱分析。皮肤颜色的蓝色组分“b”和从皮肤出射的蓝光%(400–700nm)独立测量。图13和14示出了目测廷德尔得分和出射蓝光%。来自实施例19和21的凝胶未表现出廷德尔效应并且具有较低的目测廷德尔得分和出射蓝光值%。对于Juvéderm Refine和Restylane Touch而言,廷德尔得分和出射蓝光值%较高。Belotero Soft未显示出廷德尔效应并且值比得上实施例19和21的凝胶。见图13和14。

[0251] 实施例28

[0252] 通过组织学对凝胶的体内持续时间评估

[0253] 在史-道二氏大鼠的背面皮内植入50 μ l弹丸注射的本发明的凝胶和商用凝胶。在1周时取出植入物并用苏木精和伊红(H&E)染色通过组织学分析。就在注射部分取切片。从每个组织样品切两个切片并且使用缝合指示器缝合H&E染色切片。然后将样品分组并且根据剩余材料的量评分如下:没有(0%)、低(25%)、中(50%)和高(100%)。见图15。

[0254] 实施例28A

[0255] 通过MRI对凝胶的体内持续时间评估

[0256] 使用磁共振成像(MRI)研究评估在雌性史-道二氏大鼠中皮内注射后,40周内本发明凝胶和商用凝胶的体积和表面积随时间的变化。按每种植入物150 μ l靶体积注射凝胶。使植入物位于肩膀稍近尾部的两个对侧部位、稍远离膝盖吻侧的两个对侧部位和中点介于头尾之间的两个对侧部位。可在7Tesla70/30Bruker Biospec MRI扫描仪上进行扫描。在植入当天(第0周)和植入后12、24、40周收集图像。下面图16中示出了凝胶绝对体积与时间的图。高持久性凝胶在植入40周时具有高绝对体积。

[0257] 实施例29

[0258] 用于治疗眶周纹的本发明组合物

[0259] 40岁的瘦小女人在眶周区出现细小皱纹并且要求真皮填充剂治疗。使用30G针,医师向她每只眼睛下方和泪沟区中的细纹浅表引入0.6ml根据本发明所述基于HA的凝胶(例如实施例19中描述的凝胶)。虽然在浅表引入凝胶,但是未观察到蓝色变色并且患者对结果满意。

[0260] 正如所示,本发明的组合物,例如实施例19和21的组合物,廷德尔效应减小或不明

显,并且相对于某些基于HA的商用凝胶,例如Juvederm Refine/Surgiderm18和Belotero Soft,在体内的持续时间长很多。例如,相对于商用“细纹”制剂Belotero Soft,本发明的实施例19不但具有至少与这种商用凝胶一样有利的廷德尔得分,而且有利地表现出高很多的体内持续时间。

[0261] 实施例30

[0262] 用于改善细纹出现的本发明的可注射组合物

[0263] 单独和组合的添加剂,例如维生素A、维生素B、维生素C、维生素D、维生素E及其衍生物以便于生成多种大体上光学透明、可注射的基于HA的凝胶的方式与交联透明质酸凝胶结合。如本文其它地方所定义,按重量计HA组分至少90%,例如大体上完全为低分子量HA,或约100%低分子量HA。使用任何适合方式使这些添加剂与HA水凝胶结合。筛分并加工结合的凝胶以生成可注射、pH中性、粘性组合物,其HA浓度至少约20mg/g,例如约23、约24mg/g、约25mg/g、高达约30mg/g并且适合通过细规格针注射。凝胶的G' 值至少约50Pa、约60Pa、约70Pa、约80Pa,高达或不大于约100Pa。包装凝胶并使用高压锅、紫外光或其它适合方式灭菌。

[0264] 每种凝胶对浅表注射均有用,例如在不大于约1.0mm的深度注射到患者皱纹,例如眶周区、鼻唇沟区、泪沟区、颈部区或将受益于真皮填充的任何其它面部区域的皮肤中。尽管浅表引入凝胶,但是未观察到由于廷德尔效应的变色并且患者满意结果。

[0265] 最后,应理解,虽然已参考各实施方案描述了本说明书的方方面面,但是本领域的技术人员将易于认识到,公开的特定实施例仅仅是说明了本文公开的主题原理。因此,应理解,公开的主题决不限于本文描述的特殊方法、方案和/或试剂等。因而,在不背离本说明书的精神的前提下,本领域的技术人员可根据本文的教导对公开的主题做许多不同修改或变化或替代构型。在不背离所附权利要求中定义的本发明精神的前提下,可做详细变化。最后,本文使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案,而非旨在限制本发明的范围,该范围仅由权利要求定义。另外,其意图是以上描述中所含的或附图中示出的所有材料应该仅解释为说明性而非限制性。因此,本发明不限于精确显示和描述的那些。

[0266] 本文描述了本发明的某些实施方案,包括发明人已知用于进行本发明的最佳模式。当然,描述的这些实施方案的变型对于本领域的普通技术人员在阅读前述描述后将会变得显而易见。发明人期望技术人员视情况采用此类变型,而且发明人意在使本发明以不同于本文具体描述的方法实施。因此,如适用法律许可,本发明包括所附权利要求中叙述的主题的所有修改和等同形式。而且,除非本文另外指出或另外与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖其所有可能变型中的上述元素的任何组合。

[0267] 不应将本文公开的本发明的替代元素或实施方案的分组理解为限制。每个组的成员可单独或以与该组其它成员或本文找到的其它元素的任何组合提及和要求保护。预计,组的一个或多个成员可因方便和/或专利性的原因包括在组中或从中删除。当任何此类包括或删除发生时,说明书都被视为含有被修改的组,从而完成了用于所附权利要求的所有马库西群组(Markush group)的书面描述。

[0268] 除非另外指出,表达成分的量、性质(例如用于说明书和权利要求的分子量、反应条件等)的所有数字在所有情况下都将被理解为被术语“约”修饰。如本文所使用,术语“约”指如此定量的项目、参数或术语涵盖在规定项目、参数或术语的值上下 $\pm 10\%$ 的范围。因

此,除非指出相反,否则在说明书和所附权利要求中列出的数字参数为近似值,其可根据本发明力图得到的所需性质改变。至少,并不像试图将等同原则的应用限于权利要求的范围一样,每个数字参数应至少根据报告的有效数位的数字并通过应用普通约数技术来理解。尽管列出本发明广泛范围的数值范围和参数为近似值,但在特定实施例中列出的数值都尽可能精确地报告。然而,任何数值固有地含有必定由在其各自的测试测量中发现的标准偏差引起的某些误差。

[0269] 除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,用否则于描述本发明的上下文中(尤其是在下面权利要求的上下文中)的术语“一个”、“一种”、“所述”和类似指示物应理解为包括单数和复数。本文值范围的叙述仅仅旨在用作单独提及属于该范围的每个独立值的速记方法。除非本文另外指出,否则将每个单独值并入说明书中就如在本文中对其单独叙述一样。除非本文另外指出或另外与上下文明显矛盾,否则本文描述的所有方法可以任何适合顺序进行。使用本文提供的任何和所有实施例或示例性的措辞(例如,“例如”)仅旨在更好地说明本发明,而不构成对另外要求保护的本发明范围的限制。不得将说明书中的措辞理解为指出对实施本发明必不可少的任何不要求保护的元素。

[0270] 可使用由措辞组成或基本上由措辞组成,将本文公开的特定实施方案进一步限制于权利要求中。当用于权利要求时,无论是作为存档的修正或是每次加入的修正,过渡术语“由……组成”都排除了在权利要求中未指定的任何元素、步骤或成分。过渡术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限于特定的材料或步骤和不会实质上影响基本特性和新特性的材料或步骤。本文固有或明确地描述和启用了如此要求保护的本发明的实施方案。

[0271] 在本说明书中引用和鉴定的所有专利、专利公布和其它公布为了描述和公开(例如)在此类公布中描述的可与本发明联合使用的组合物和方法的目的,单独且明确地通过引用整体并入本文。在本申请的申请日期之前,这些公布仅为它们的公开而提供。就这点而言不应理解为承认由于先前的发明或任何其它原因,无权使发明人先于此类公开。关于日期的所有声明或关于这些文档内容的陈述基于申请人可得的信息,并不构成关于这些文档的日期或内容正确性的任何承认。

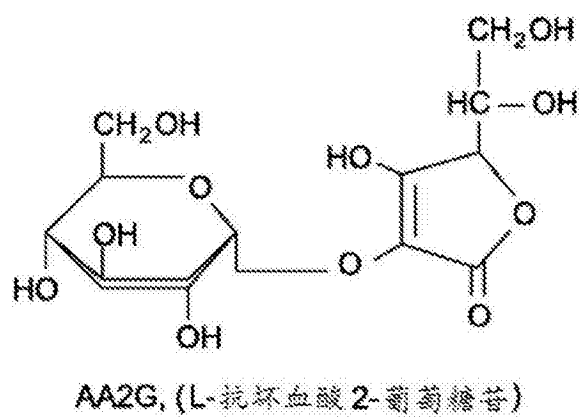


图1

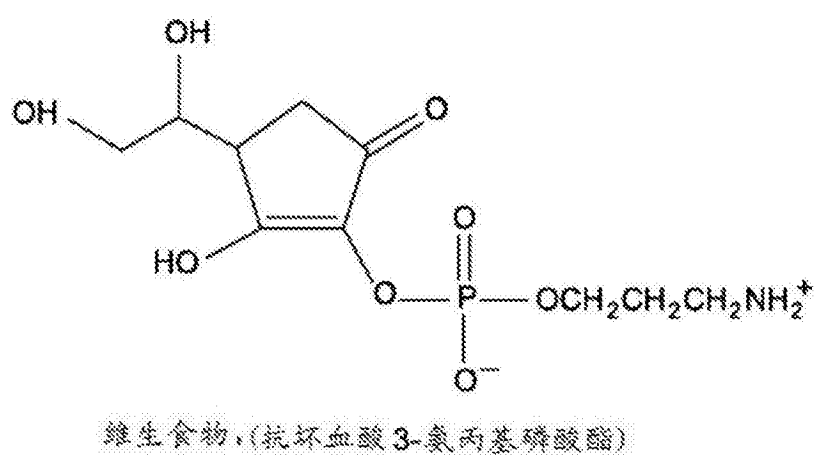


图2

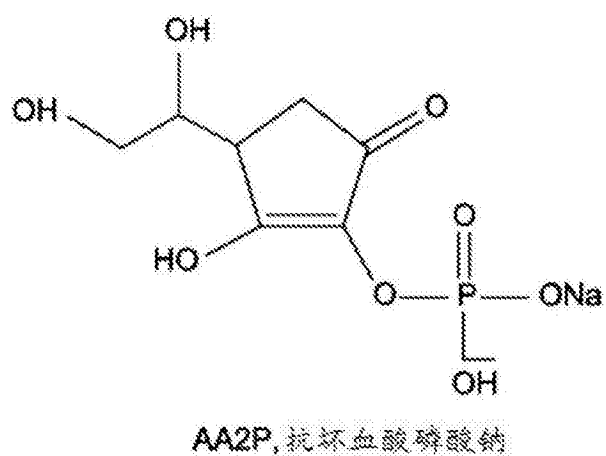
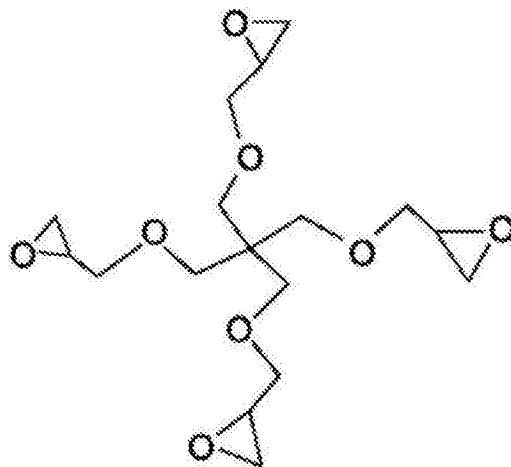


图3



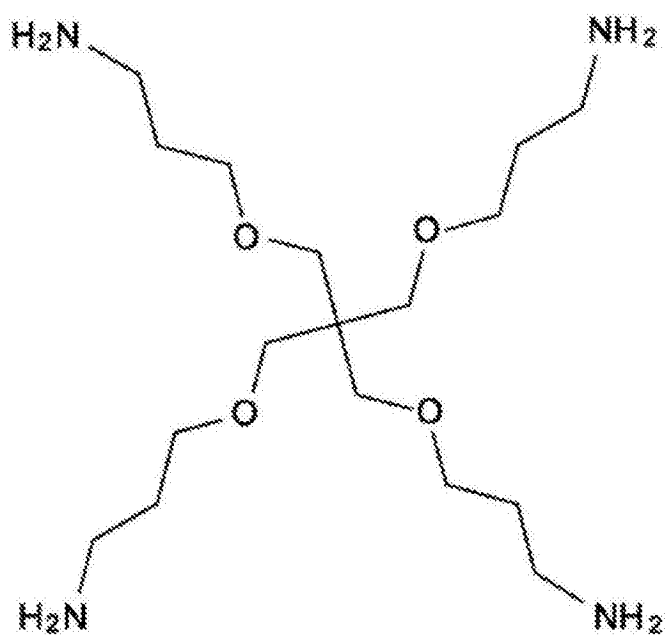
BDDE, 1,4-丁二醇二缩水甘油醚

图4



Star-PEG 环氧化物, 季戊四醇缩水甘油醚

图5



Star-PEG 胺, 季戊四醇(3-氨基丙基)醚

图6

样品 ID	交联剂	结合度 (HA-AA2G, mol%)	G' (Pa)	
	 BDDE	12	69	
		9.78	291	
		10.47	377	
		12.44	1160	
	 Star 臂 PEG 环氧化物	32.26	132	
		31.25	263	
		20.48	421	
		31.87	1160	

HA-AA2G/ 环氧基: 凝胶合成结果

图7

结合度 (HA-AA2G, mol%)	凝胶浓度 (mg/ml)	G' (Pa)	
8.0	25	42	
12.0	17	69	
11.6	24	113	
12.6	24	237	
9.8	17	291	
10.5	17	377	
8.5	26	700	
13.0	22	1010	
11.9	23	1260	

HA-AA2G (BDDE)

图8

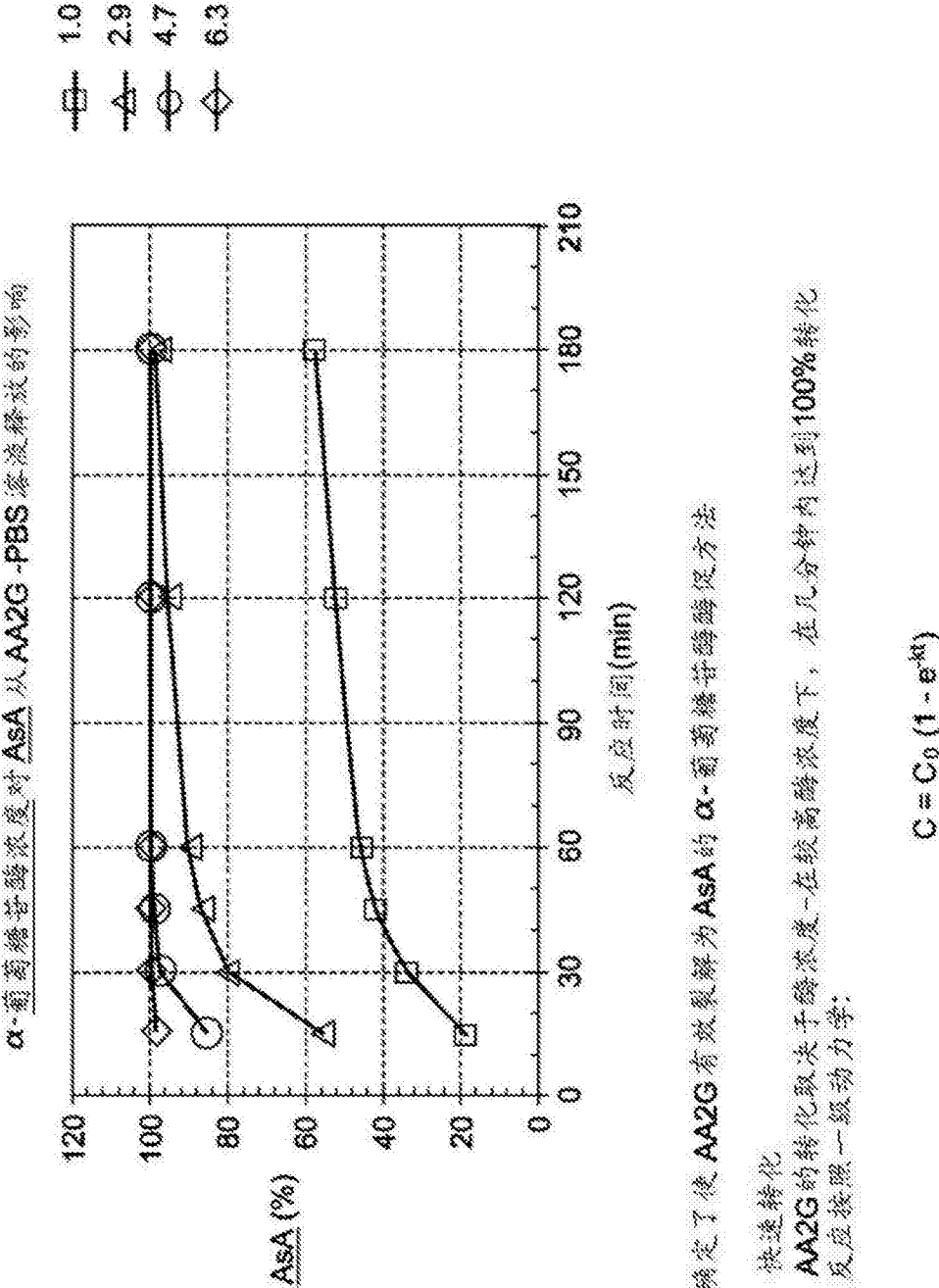
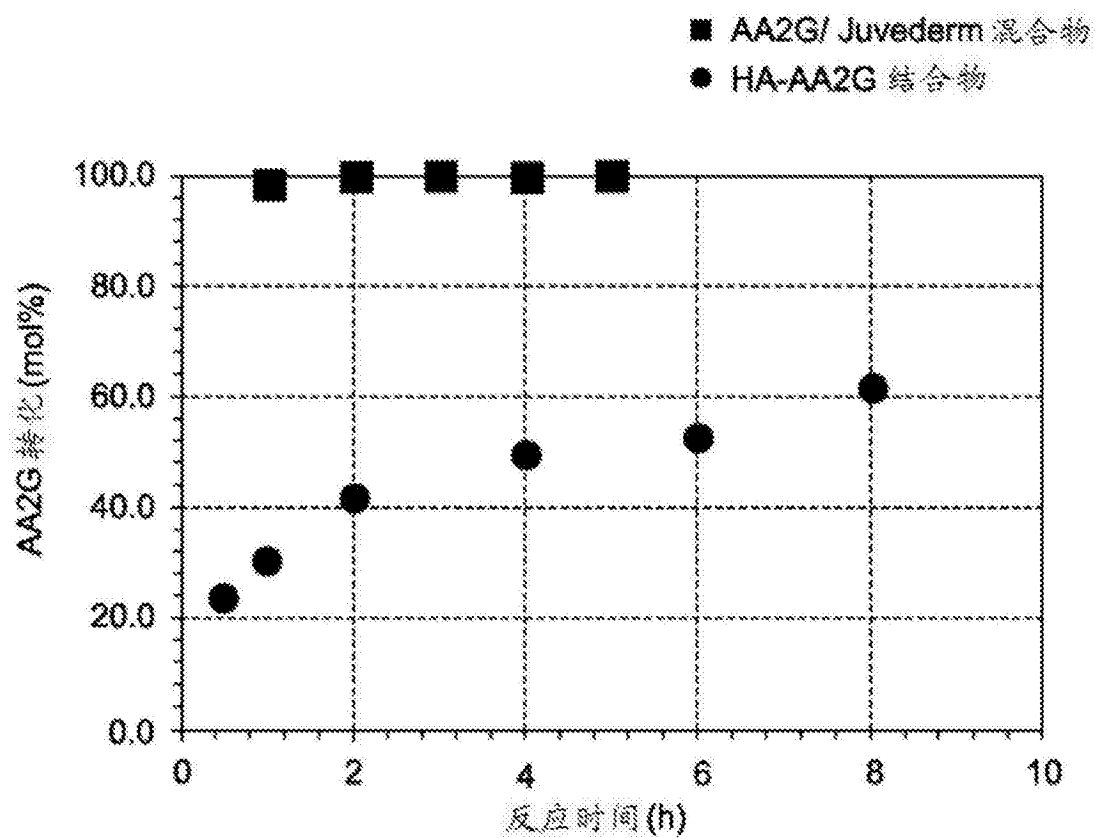


图9



- 在 HA-AA2G 物理混合物中 AA2G 立即转化为 AsA。
- HA-AA2G 结合物显示出持续转化为 AsA

图10

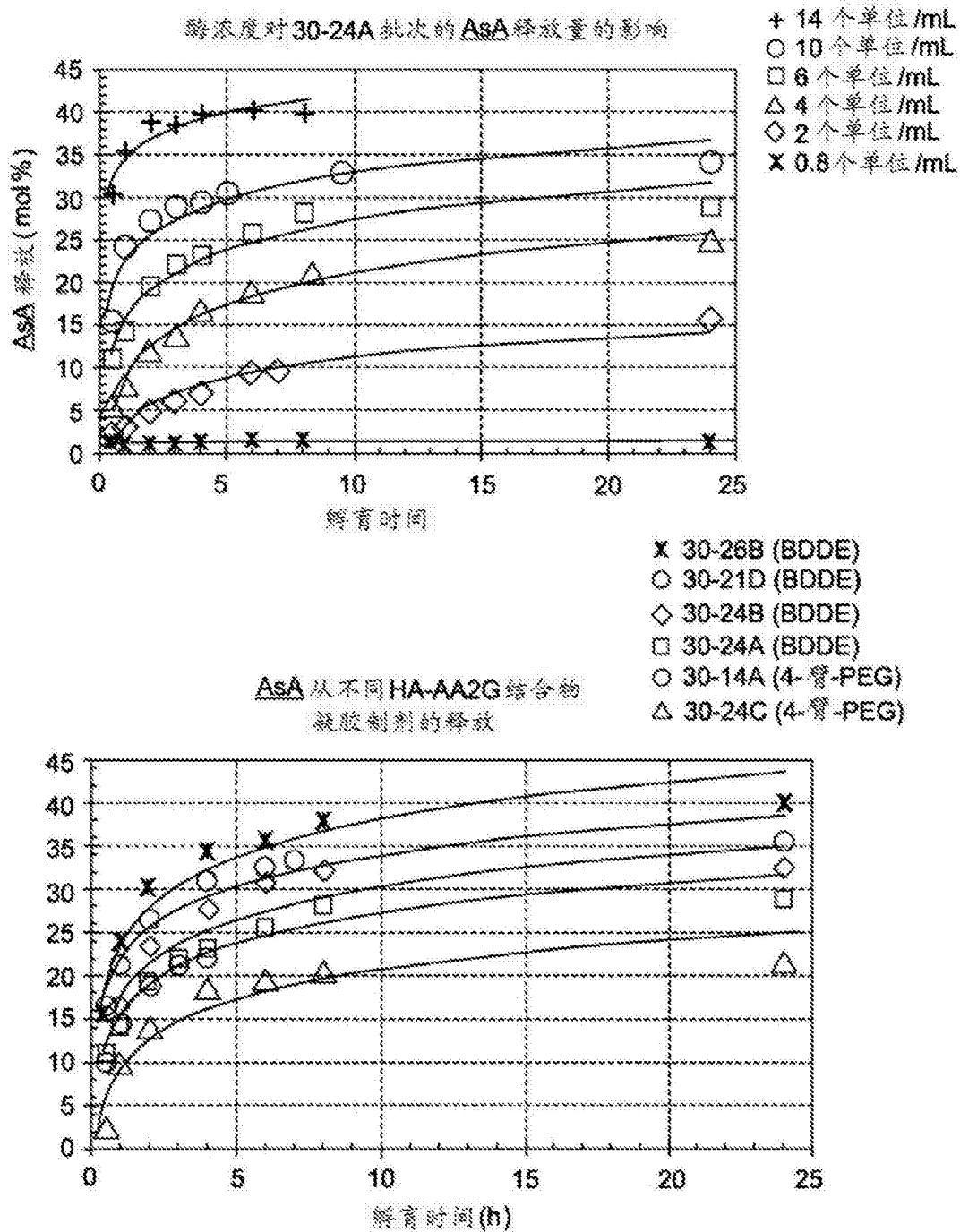
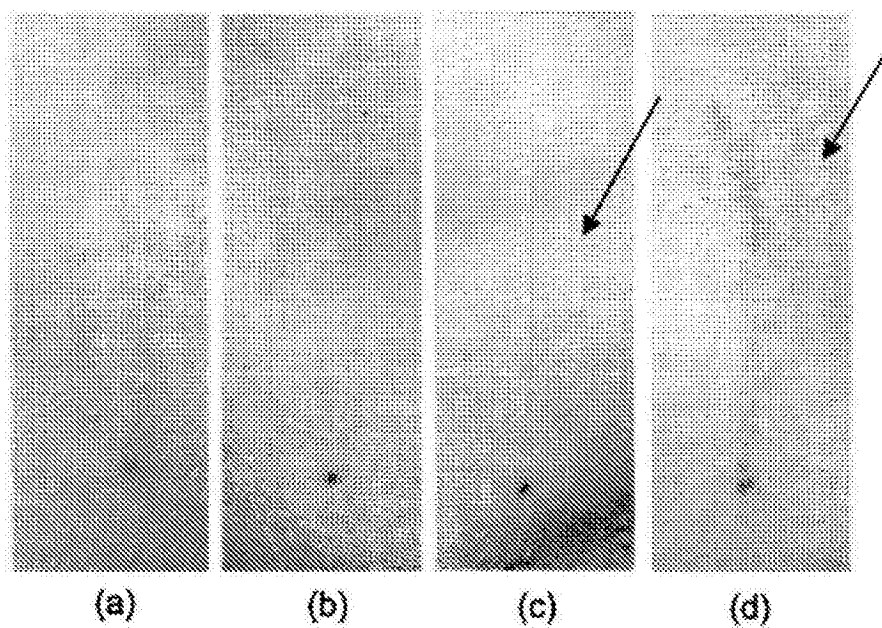


图11A

交联剂	结合度(AsA 摩尔数/ AA2G 摩尔数)%
BDDE	9.78
BDDE	10.04
BDDE	10.49
BDDE	13.76
Star-PEG	19.30
Star-PEG	31.87

对相同制剂而言,释放的量随酶浓度的增加而增加。

图11B



来自 (a) 实施例19、(b) 实施例21、(c) Juvederm Refine 和 (d) Restylane Touch 的凝胶的图像

图12

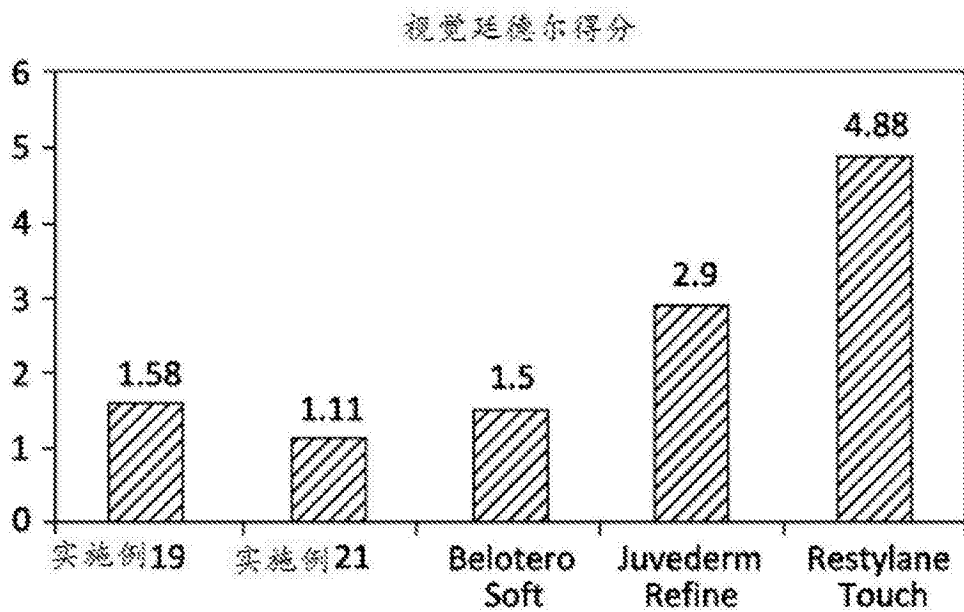


图13

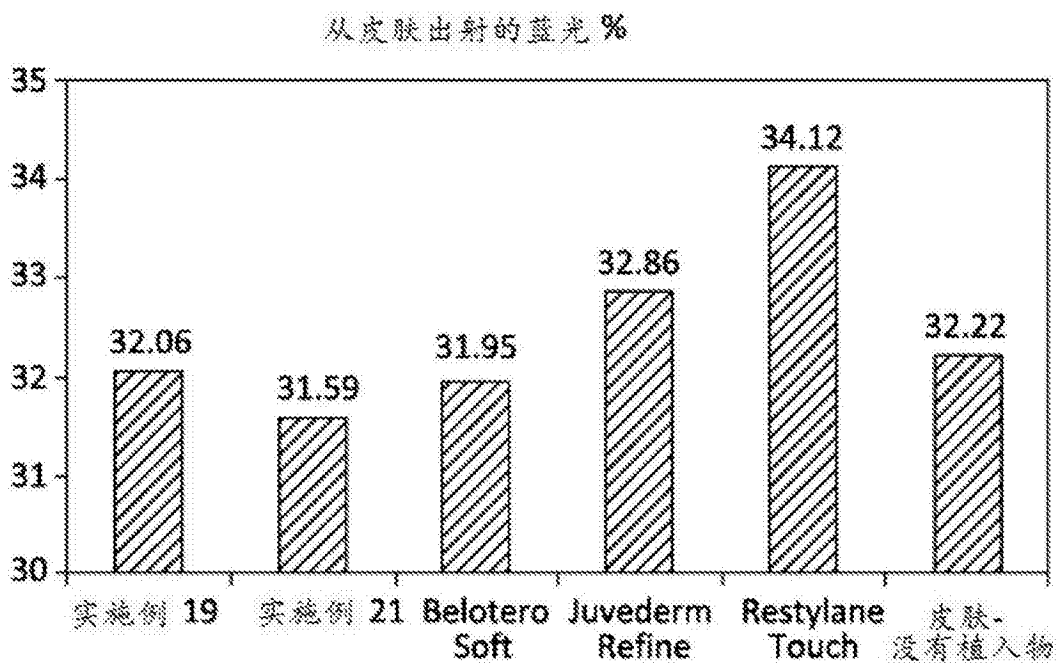


图14

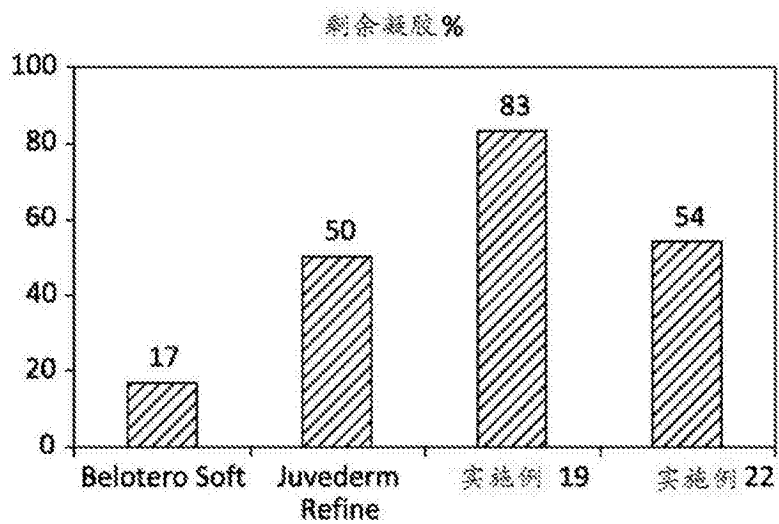


图15

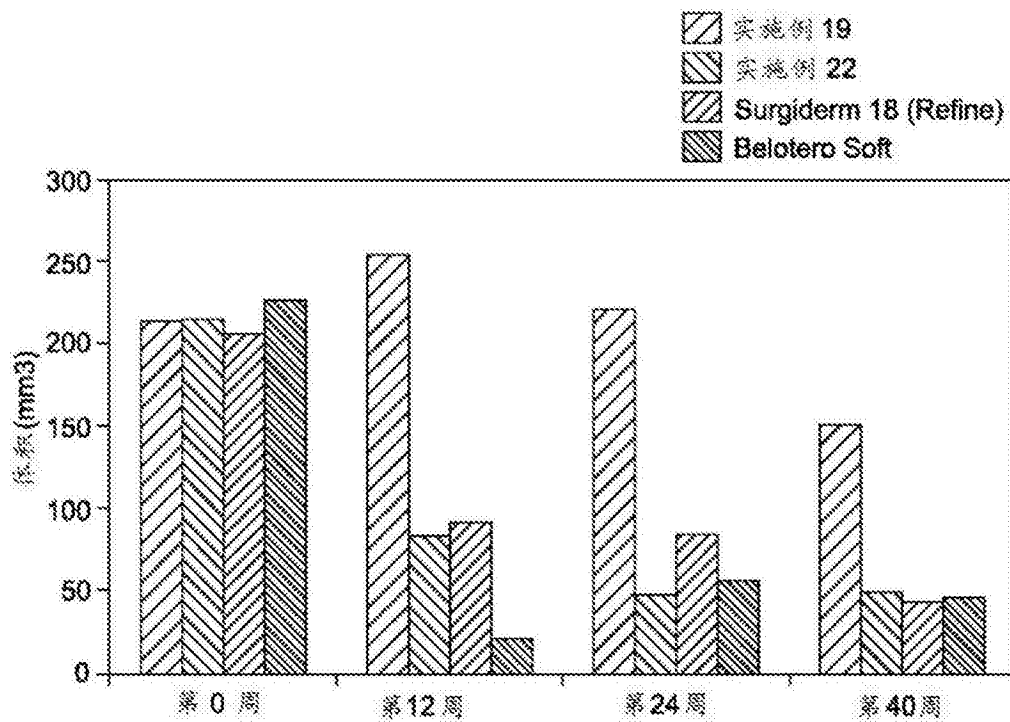


图16