



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101573123 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 05

(21) 申请号 200780045074. 5

(22) 申请日 2007. 12. 06

(30) 优先权数据

60/868, 798 2006. 12. 06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 06. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2007/073987 2007. 12. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02008/069348 EN 2008. 06. 12

(73) 专利权人 生化学工业株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 宫本建司 吉冈敬二 高桥胜哉

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

(51) Int. Cl.

A61K 31/728 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007004675 A1, 2007. 01. 11,

审查员 肖西祥

权利要求书2页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

治疗关节炎病症的长效药剂

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗关节炎病症的关节内给药注射溶液,其以显示出长久镇痛效果的量包括交联的透明质酸衍生物作为活性成分以及包括药学可接受的载体,在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分官能团用交联基团交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6%至 15%的交联程度;以及涉及用于抑制由关节炎病症引起的软骨退化的镇痛组合物或用于抑制由关节炎病症引起的软骨退化或滑膜炎的组合物,其各自包含交联的透明质酸衍生物和药学可接受的载体。

1. 包括交联的透明质酸衍生物以及药学可接受的载体的组合物用于制备用于治疗关节炎病症的关节内给药用药物组合物的用途,在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分羧基用交联基团借助于间隔基彼此交联,所述间隔基通过酰胺键被连接到羧基以形成交联键,并且该交联的透明质酸衍生物具有以下特征:

透明质酸的官能团被交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6%至 15% 的交联程度,

透明质酸的重均分子量为 500,000 至 2,500,000,

交联基团是肉桂酸或肉桂酸衍生物的残基,

间隔基是氨基烷基醇的残基,

交联基团的置换度是 10%至 25%,和

在交联的透明质酸衍生物中的交联度是 10%至 30%。

2. 权利要求 1 的用途,其中交联的透明质酸衍生物在药物组合物中的浓度是 0.7 重量%至 2.0 重量%。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中与当交联的透明质酸衍生物在药物组合物中的浓度为约 1 重量%时被给药的交联的透明质酸衍生物相比,在关节内给药该药物组合物后第 3 天在滑膜液内交联的透明质酸衍生物的残留率为至少 15%。

4. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述治疗用于缓解由关节炎病症引起的关节疼痛。

5. 权利要求 1 或 2 的用途,其中交联的透明质酸衍生物以每个成年患者 15 毫克至 60 毫克的单位剂量被给予。

6. 权利要求 1 或 2 的用途,其中交联的透明质酸衍生物以 0.3 至 1.2 毫克 / 千克成年患者的单位剂量被给予。

7. 权利要求 1 或 2 的用途,其中交联的透明质酸衍生物具有交联程度 1%至 7.5%。

8. 权利要求 1 或 2 的用途,其中药物组合物具有当在 24℃下以 0.2 毫升 / 秒的速度从注射针中被挤出时能够穿过具有 18 到 25 针规的针的性质。

9. 用于治疗关节炎病症的药物组合物,包括交联的透明质酸衍生物以及药学可接受的载体,在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分羧基用交联基团借助于间隔基彼此交联,所述间隔基通过酰胺键被连接到羧基以形成交联键,并且该交联的透明质酸衍生物具有以下特征:

透明质酸的官能团被交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6%至 15% 的交联程度,

透明质酸的重均分子量为 500,000 至 2,500,000,

交联基团是肉桂酸或肉桂酸衍生物的残基,

间隔基是氨基烷基醇的残基,

交联基团的置换度是 10%至 25%,和

在交联的透明质酸衍生物中的交联度是 10%至 30%。

10. 权利要求 9 的药物组合物,其中交联的透明质酸衍生物在药物组合物中的浓度是 0.7 重量%至 2.0 重量%。

11. 权利要求 9 或 10 的药物组合物,其中与当交联的透明质酸衍生物在药物组合物中的浓度为约 1 重量%时被给药的交联的透明质酸衍生物相比,在关节内给药该药物组合物

后第 3 天在滑膜液内交联的透明质酸衍生物的残留率为至少 15%。

12. 权利要求 9 或 10 的药物组合物,其中所述治疗用于缓解由关节炎病症引起的关节疼痛。

13. 权利要求 9 或 10 的药物组合物,其中交联的透明质酸衍生物以每个成年患者 15 毫克至 60 毫克的单位剂量被给予。

14. 权利要求 9 或 10 的药物组合物,其中交联的透明质酸衍生物以 0.3 至 1.2 毫克 / 千克成年患者的单位剂量被给予。

15. 权利要求 9 或 10 的药物组合物,其中交联的透明质酸衍生物具有交联程度 1% 至 7.5%。

16. 权利要求 9 或 10 的药物组合物,其中药物组合物是具有当在 24℃ 下以 0.2 毫升 / 秒的速度从注射针中被挤出时能够穿过具有 18 到 25 针规的针的性质的溶液形式。

治疗关节炎病症的长效药剂

技术领域

[0001] 本发明涉及通过单次注射而具有长久镇痛效果、软骨保护效果和长期抗炎效果的药剂。

背景技术

[0002] 骨关节炎 (OA), 其临床综合征是由关节退化引起的关节疼痛和功能障碍, 比任何其它关节疾病影响更多的人。骨关节炎到目前为止在美国和在全世界范围内都是最常见的关节病症, 并且是导致老年人行为不能的最主要的原因之一。膝 OA 在初级保健中是常见的、但难以应对的问题。常规的非手术性管理 (包括生活方式改变、理疗和药理学治疗) 通常是无效的或者遗留未愈症状。具有症状性膝 OA 的受试者可选择包括一系列关节内注射透明质酸 (在下文中被称作 IA-HA) 的治疗。透明质酸钠是天然存在的胞外基质成分, 并且在关节内注射后充当润滑剂和减震剂的作用以在 OA 中缓解疼痛和改善膝功能。目前, 在美国有 5 种 IA-HA 的市售产品, SUPARTZ®, SYNVISIC®, HYALGAN®, ORTHOVISC®和 EUFLEXXA。SYNVISIC®是在美国第一个上市的 IA-HA 产品, 并且是唯一的透明质酸盐的交联衍生物的水性溶液, 其它产品是透明质酸钠 (在下文中称作 HA-Na) 的水性溶液。这些目前上市的 IA-HA 产品在有效性方面没有明显差别。另外, 这些产品采用 3 至 5 次的一系列注射, 换句话说, 通过单次注射不产生更长期的应答。因此, 期待要求注射次数更少的新的 IA-HA 产品, 从而降低侵入性和关节感染的潜在危险并且通过单次注射产生更长期的应答。

[0003] 迄今为止, 有许多报道涉及采用与 SYNVISIC®不同的交联方法得到交联的透明质酸盐, 例如, 通过采用多官能环氧化合物作为交联基团制备的交联的透明质酸盐 (参见专利文献 1), 光交联的透明质酸盐 (参见专利文献 2 到 4) 和没有交联剂的透明质酸盐的分子内桥接 (参见专利文献 5)。交联的透明质酸盐正作为对于保守的非药理学治疗和 / 或简单的镇痛药例如对乙酰氨基酚不能充分应答的受试者中与膝的骨关节炎有关的疼痛的微创治疗被研究。例如, 报告了一种用于治疗关节病症的注射剂, 其通过使用包括有或者没有交联结构的透明质酸盐和磷脂的药剂得到改善, 从而产生剂量数降低的优点。

[0004] 然而, 许多关于光交联的透明质酸盐产品的报道主要记录了该产品的合成和一般性质, 并没有仔细地考察对于独特应用的可用性和限制性条件及性质以及对于所述交联的透明质酸盐产品的特定效果。在 SYNVISIC®和光交联的透明质酸盐之间进行的抗原性和刺激性的比较已有文献报道 (参见非专利文献 1)。

[0005] 专利文献 1 : JP-B2-5-74571

[0006] 专利文献 2 : USP5462976

[0007] 专利文献 3 : USP5763504

[0008] 专利文献 4 : USP6031017

[0009] 专利文献 5 : JP-A-2003-252905

[0010] 专利文献 6 : JP-A-2002-348243

[0011] 非专利文献 1: " Evaluation of in vivo biocompatibility and biodegradation of photocrosslinked hyaluronate hydrogels " J.Biomed Mater Res. A 70 :550-559 (2004)。

发明内容

[0012] 发明公开

[0013] 开发了本发明以解决以前可获得的 IA-HA 产品所存在的问题,即,该产品的效果不长久或者不持续若干周。

[0014] 也就是说,本发明如下所述:

[0015] 用于治疗关节炎病症的关节内给药用注射溶液,其以显示出长久镇痛效果或长时间镇痛效果的量包括交联的透明质酸衍生物作为活性成分以及包括药学可接受的载体,在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分官能团用交联基团交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6% 至 15% 的交联程度。

[0016] [1] 所述的注射溶液,其中交联的透明质酸衍生物交联基团的置换度基于交联的透明质酸衍生物构成性二糖单位的总数为 3% 至 50%。

[0017] [1] 所述的注射溶液,其中交联的透明质酸衍生物交联度基于构成性交联基团的总数为 5% 至 40%。

[0018] 用于治疗关节炎病症的关节内给药用注射溶液,其包括交联的透明质酸衍生物以及药学可接受的载体,在该交联的透明质酸衍生物中交联的透明质酸衍生物交联基团的置换度基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 3% 至 50% 并且交联度基于构成性交联基团的总数为 5% 至 40%。

[0019] 用于治疗关节炎病症的关节内给药用注射溶液,其包括交联的透明质酸衍生物以及药学可接受的载体,在该交联的透明质酸衍生物中交联基团的置换度基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 3% 至 50%,交联度基于构成性交联基团的总数为 5% 至 40%,并且交联程度基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6% 至 15%。

[0020] [1] 至 [5] 中任一项所述的注射溶液,其中所述交联的透明质酸衍生物的溶液的浓度基于溶液的总重量为 0.5 重量% 至 3.0 重量%。

[0021] [1] 至 [6] 中任一项所述的注射溶液,其中与当交联的透明质酸衍生物的溶液的浓度为约 1 重量% 时被给药的交联的透明质酸衍生物相比,在关节内给药该溶液后第 3 天在滑膜液内交联的透明质酸衍生物的残留率为至少 15%。

[0022] [1] 至 [6] 中任一项所述的注射溶液,其中在给药部位处给予该溶液后所述镇痛效果持续或延续 2 周以上。

[0023] [1] 所述的注射溶液,其包括单位剂量形式的交联的透明质酸衍生物,其中该单位剂量包括当给药一次时为 0.3 毫克至 1.2 毫克 / 千克的交联的透明质酸衍生物。

[0024] [1] 所述的注射溶液,其中交联的透明质酸衍生物具有以下特征;

[0025] 透明质酸的重均分子量为 500,000 至 2,500,000,

[0026] 交联基团是肉桂酸或肉桂酸衍生物的残基,

[0027] 间隔基是氨基烷基醇的残基,

[0028] 交联基团的置换度是 10% 至 25%, 和

[0029] 在交联的透明质酸衍生物中的交联度是 10% 至 30%，并且其中交联的透明质酸衍生物的溶液的浓度是 0.7 重量% 至 2.0 重量%。

[0030] 用于治疗关节炎病症的关节内给药用药物组合物，其包括交联的透明质酸衍生物和药学可接受的载体并且具有持续的镇痛效果，在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分羧基用交联基团彼此交联以借助于酰胺键形成交联键。

[0031] [11] 所述的药物组合物，其中透明质酸通过使用光照射具有氨基基团的交联基团的光二聚反应或光致聚合反应进行交联以形成交联的透明质酸衍生物，并且其中透明质酸的羧基结合于交联基团的氨基。

[0032] [11] 或 [12] 所述的药物组合物，其中透明质酸的羧基用交联基团交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6% 至 15% 的交联程度。

[0033] [11] 至 [13] 中任一项所述的药物组合物，其中在给药部位处给予该组合物后所述镇痛效果持续或延续 2 周以上。

[0034] [11] 至 [14] 中任一项所述的药物组合物，其中与当交联的透明质酸衍生物的溶液的浓度为约 1 重量% 时被给药的交联的透明质酸衍生物相比，在关节内给药该组合物后第 3 天在滑膜液内交联的透明质酸衍生物的残留率为至少 15%。

[0035] 用于缓解由关节炎病症引起的关节疼痛的镇痛组合物，其以显示出长久镇痛效果或长时间镇痛效果的量包括交联的透明质酸衍生物作为活性成分以及包括药学可接受的载体，在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分官能团用交联基团交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6% 至 15% 的交联程度。

[0036] 用于抑制由关节炎病症引起的软骨退化的组合物，其以显示出长久抑制效果或长时间抑制效果的量包括交联的透明质酸衍生物作为活性成分以及包括药学可接受的载体，在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分官能团用交联基团交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6% 至 15% 的交联程度。

[0037] 用于抑制由关节炎病症引起的滑膜炎的组合物，其以显示出长久抑制效果或长时间抑制效果的量包括交联的透明质酸衍生物作为活性成分以及包括药学可接受的载体，在该交联的透明质酸衍生物中透明质酸的一部分官能团用交联基团交联至基于透明质酸的构成性二糖单位的总数为 0.6% 至 15% 的交联程度。

[0038] [16] 至 [18] 中任一项所述的组合物，其中所述关节炎病症是骨关节炎。

[0039] [20] [19] 所述的组合物，其中所述关节炎病症是创伤性关节炎病症。

[0040] [21] 药包，其包括填充有 [1] 至 [20] 中任一项所述的注射溶液或组合物的注射器。

[0041] 图 1 是表示兔的前十字韧带 (ACL) 横切研究的曲线：总体形态学评价。

[0042] 图 2 是对兔的 ACL 横切研究进行的股骨髁的组织检查所见（番红 O/ 坚牢绿）。

[0043] 图 2A 是得自磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 组中的典型样本。

[0044] 图 2B 是得自 1% 透明质酸钠溶液 (1% HA-Na) 组中的典型样本。

[0045] 图 2C 是得自 1 次注射交联的透明质酸盐胶凝 (HA- 凝胶) 组的典型样本。

[0046] 图 2D 是得自 2 次注射 HA- 凝胶组的典型样本。

[0047] 图 3 是表示 HA- 凝胶对血管舒缓激肽诱导的关节炎疼痛大鼠模型的镇痛效果。

[0048] 图 3A 是表示在注射血管舒缓激肽前 1 周关节内给予的 HA- 凝胶的镇痛效果的曲

线。

[0049] 图 3B 是表示在注射血管舒缓激肽前 2 周关节内给予的 HA- 凝胶的镇痛效果的曲线。

[0050] 图 3C 是表示在注射血管舒缓激肽前 4 周关节内给予的 HA- 凝胶的镇痛效果的曲线。

[0051] 图 4 是表示硝酸银诱导的关节炎疼痛模型的曲线 : 用 PBS、HA- 凝胶和 1% HA-Na 处理的组的负重率。

[0052] 图 5 是表示硝酸银诱导的关节炎疼痛模型的曲线 : 用 PBS、HA- 凝胶和 1% HA-Na 处理的组的疼痛记分。

[0053] 图 6 是表示尿酸一钠诱导的关节炎关节疼痛模型的曲线 : 异常步态记分的改变。

[0054] 图 7 是表示尿酸一钠诱导的关节炎关节疼痛模型的曲线 : 异常步态记分的改变。

[0055] 图 8 是表示在膝的滑膜液中 HA- 凝胶的残留率的曲线。

[0056] 图 9 是表示在膝的滑膜中 HA- 凝胶的残留率的曲线。

[0057] 图 10 和图 11 是表示木瓜酶诱导的关节炎模型的曲线 : 交联的透明质酸盐凝胶和 PBS 的总体形态学评价。

[0058] 优选方案的说明

[0059] 在下文中, 通过详细的实施方案和方法详细描述本发明。这些详细说明仅仅意在公开的本发明和本文所要求保护的实施例, 不以任何方式限制本发明的范围, 本发明的范围由权利要求书特别地指出和清楚地要求保护。

[0060] 在本说明书中, “骨关节炎”、“透明质酸”和“透明质酸钠”分别用“OA”、“HA”和“NA-Na”表示, 并且可用作间隔基的化合物被称为“间隔基化合物”。

[0061] 本发明使用的交联的透明质酸衍生物或交联的透明质酸化合物 (在下文中被称作交联的 HA 衍生物) 具有通过与 HA 共价结合的交联基团进行分子内交联或分子间交联所形成的交联结构。该交联结构使得交联的 HA 衍生物具有三维网络结构, 从而将交联的 HA 衍生物溶解到含水介质中所得的溶液具有粘弹性水凝胶的物理性质。在相同条件下该溶液比 HA 溶液具有更高的粘度。

[0062] 该交联的 HA 衍生物可以是未成盐的游离形式或者是药学可接受的盐形式。例如, 交联的 HA 衍生物的药学可接受的盐包括钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等。

[0063] 本发明使用的透明质酸不受特别地限制, 只要其是由通过 β 1, 3 键结合的 N- 乙酰基 -D- 葡萄糖胺和 D- 葡萄糖醛酸组成的二糖单位作为基本核心组织组成并通过该二糖单位的 β 1, 4 键重复构成的氨基多糖即可, 即, 是通常使用的透明质酸 (HA)。

[0064] HA 的使用形式可以是未成盐的游离形式或者是药学可接受的盐形式。HA 的药学可接受的盐包括与碱金属离子形成的盐诸如钠盐、钾盐, 与碱土金属离子形成的盐诸如镁盐和钙盐, 与无机碱形成的盐诸如铵盐, 以及与有机碱诸如二乙醇胺、环己胺和氨基酸形成的盐。HA 盐优选是与碱金属离子形成的盐, 特别是与钠离子形成的盐, 因为其对活体具有高亲合性。

[0065] 使用的 HA 可通过从活有机体的部分材料 (诸如鸡冠、脐带、软骨、皮肤等) 提取而得自天然产物。并且使用的 HA 也可经化学合成得到或者可在微生物诸如酵母中通过基因工程被制造。特别地, 被使用的 HA 优选具有高纯度并且实质上不含对药物而言是不受欢迎

的杂质。

[0066] HA 的重均分子量不受特别限制,但是可以举例说明 10,000 至 5,000,000,例如优选 200,000 至 3,000,000,更优选 500,000 至 2,500,000。

[0067] 本发明使用的交联形式优选是采用共价键形成的交联形式,因为良好的结合稳定性。

[0068] 本发明使用的交联基团的优选实例是光反应性交联基团(即,具有光反应性残基的交联基团),其可选自能够通过光(紫外线)照射经历光二聚反应或光致聚合反应的化合物的任何残基。例如,作为化合物的所述残基,有肉桂酸、被取代的肉桂酸、丙烯酸、马来酸、富马酸、山梨酸、香豆素、胸腺嘧啶等的残基。在这些化合物中,优选具有能够通过光照射形成环丁烷环的 1,2-亚乙烯基(vinylene)的化合物,并且从光反应性和对活体的安全性的角度考虑,肉桂酸或被取代的肉桂酸是更优选的。

[0069] 被取代的肉桂酸的实例是其中在肉桂酸的苯环的任何位置处的一个或两个氢原子被以下基团取代的肉桂酸衍生物等:含 1-8 个碳原子的低级烷基(例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基等)、含 1-8 个碳原子的低级烷氧基(例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基等)、氨基、羟基等,并且优选实例是氨基肉桂酸和对氨基肉桂酸。

[0070] 本发明使用的交联的 HA 衍生物必需具有适当的耐受体内代谢环境诸如 pH、离子强度、温度等的抗性,这有助于其在给药部位处的长久或长期的效果。优选酰胺键,依靠该键,化合物的作为交联基团的残基被引入到 HA 的羧基上,因为酰胺键具有更好的耐受在酸或碱条件下发生水解的抗性。

[0071] 上述的光反应性交联基团也可借助于具有氨基的化合物的残基(其被称作间隔基)被引入到 HA 的羧基上。另外,使用间隔基提供了交联基团与 HA 的反应以及光交联反应的改善。

[0072] 本发明使用的作为间隔基的化合物不受特别限制,只要其是具有至少一个氨基以及具有能够结合于光反应性交联基团的官能团的化合物即可,例如,优选提及氨基烷基醇、二胺、氨基酸、肽等。对于交联的 HA 衍生物,考虑到在关节内给药期间的合乎需要的耐受代谢降解的抗性和性质的适当保留,优选实例是具有 2-18 个碳原子的氨基烷基醇,更优选具有 2-12 个碳原子的氨基烷基醇。特别优选氨基戊醇、氨基丁醇、氨基丙醇和氨基乙醇,因为在交联反应时在 HA 和光反应性交联基团之间提供了合适的距离。

[0073] 除非另作说明,否则在本说明书中交联基团可包括被引入到间隔基化合物的残基中的交联基团,因此,光反应性交联基团还可包括被引入到间隔基化合物的残基中的光反应性交联基团。已形成交联结构的交联基团有时被称为已交联的基团,未交联的交联基团有时被称为可交联的基团。

[0074] 用于合成本发明的交联的 HA 衍生物的方法不受特别限制,只要其是有可能借助酰胺键使 HA 化学结合于可以是交联基团的化合物上的方法即可,例如,使用诸如以下的水溶性缩合剂的方法:水溶性碳二亚胺,例如 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI·HCl)、1-环己基-3-(2-吗啉基乙基)碳二亚胺对甲苯磺酸盐、1-环己基-3-(2-吗啉基乙基)碳二亚胺盐酸盐等;除了上述缩合剂之外还使用诸如以下的辅助缩合剂的方法:N-羟基琥珀酸亚胺(HOSu)和 N-羟基苯并三唑(HOBt);使用诸如以下的缩合剂的方法:4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMT-MM)等;活性

酯化方法；酸酐方法等等。另外，当引入有间隔基的交联基团被用作交联基团时，所述方法可以是这样一种方法，即其中预先将间隔基化合物引入到 HA 中、然后将交联基团引入到与间隔基连接的 HA 中，或者是这样的方法，即其中预先将间隔基引入到交联基团中、然后将与间隔基连接的交联基团引入到 HA 中。

[0075] 在下文中，为了使表述简单化，根据上述方法制造的、但是未构建交联结构的与交联基团连接的 HA 衍生物有时被称作非交联的产品或非交联的化合物。

[0076] 用于使非交联的产品交联的方法不受特别限制，只要该方法可通过在交联基团之间反应形成交联的结构即可。

[0077] 例如，在使用光交联基团的非交联的产品的情况中，优选用光照射均匀溶解有非交联的产品的溶液的方法。

[0078] 尽管 HA 自身在含水介质中具有良好的溶解度，在其中间隔基化合物被引入到透明质酸所具有的羧基的透明质酸衍生物的情况中，对 HA 的亲水性有所贡献，亲水性随着置换度的增加而降低。

[0079] 因此，上述的用于合成非交联的产品的的方法优选包括进行碱处理以改善非交联的产品在含水介质中的溶解度。

[0080] 碱处理方法不受特别限制，只要溶液经过该处理呈碱性即可。使用的碱试剂可以是有机盐或无机盐的形式。考虑到在水性溶剂中进行处理，优选使用无机碱盐。在这些无机碱盐中，弱碱盐诸如碳酸氢钠和碳酸钠比强碱盐诸如氢氧化钠更适合使用，因为这些弱碱盐对与交联基团连接的透明质酸衍生物向低分子化合物的转化的影响或对交联基团分解的影响较小。这里，碱处理可以在通常为 7.2 至 11、优选 7.5 至 10 的 pH 值下进行。使用的碱的量和碱处理时间可根据所需亲水性的不同进行适当地控制。例如，当碳酸氢钠的使用量基于 1 克透明质酸为 500 毫克（即，为透明质酸摩尔量的 10 倍以上）时，该碱处理在搅拌下进行 2 至 3 小时，从而获得具有足够增强的亲水性的非交联的化合物。通过上述方法获得的非交联的衍生物的 1.0 重量%溶液能够在 24℃ 和 5.0Kg/cm² 的压力下以至少 2 毫升 / 分钟的速率穿过孔径大小为 0.45 微米、直径为 25 毫米的多孔过滤器。

[0081] 优选非交联的产品的的光照射（光辐照）在使得光反应性交联基团有效地引起光二聚反应或光致聚合反应的条件下进行。

[0082] 使用的光的类型和波长不受特别限制，只要该光可选自具有能够使光反应性交联基团经历光致反应而不使透明质酸的糖苷键发生分解的波长的那些即可。例如，当使用的交联基团是肉桂酸或肉桂酸衍生物时，优选使用波长为 200 至 600 纳米的紫外线。根据生成物的所需性质、所需的置换度、非交联的产品溶液的浓度等来适当地选择被照射光的集合。作为优选的光源，可使用紫外灯、高压汞灯或金属卤化物灯。如有必要，优选例如通过截滤波器从光源除去不需要的波长。

[0083] 本发明的交联的 HA 衍生物具有通过与 HA 共价结合的交联基团 进行分子内交联或分子间交联而形成的交联结构。该交联结构使得交联的 HA 衍生物具有三维网络结构，从而交联的 HA 衍生物的溶液具有粘弹性水凝胶的物理性质，包括粘性和弹性。物理性质受诸如以下影响因素的影响：交联基团的置换度、交联度、在交联反应时可交联的化合物的浓度等。因此，重要的是设定这些因素在适当范围内。

[0084] 这些合适的范围可根据生成物的所需性质的不同来适当地确定。例如，本发明

的交联基团的置换度基于 HA 的构成性二糖单位的总数优选为 3% 至 50%、更优选 5% 至 30%，更优选 10% 至 25%。在交联反应时反应溶液的优选浓度基于溶液的总重量可以例如为 0.5% 至 10%、更优选 0.7% 至 2%。交联度基于构成性交联基团的总数可例如优选为 5% 至 40%、更优选 7% 至 35%，更优选 10% 至 30%。

[0085] 另外，置换度 (DS) 可以根据相对于 HA 的每个构成性二糖单位被引入的交联基团的比 (%) 来计算，例如，相对于每个构成性二糖单位具有一个交联基团的非交联的化合物、或相对于每 200 个构成性糖单元具有一个交联基团的非交联的化合物，DS 分别为 100% 或 1%。

[0086] 交联度可以根据已交联的基团与被引入的交联基团的比 (%) 来计算。例如，在具有 100 个交联基团的 HA 衍生物中，如果 20 个交联基团 (单体) 反应形成 10 个二聚体，则交联度是 20%。

[0087] 通常认为，如果作为溶质的交联的透明质酸衍生物相对于介质 (溶剂) 是过量的，则很难获得具有适中流动性的水凝胶溶液，并且在交联的透明质酸衍生物内形成过多的桥。

[0088] 本发明的交联的 HA 衍生物需要适中的流动性用于通过末梢带针的注射器进行关节内给药。同时，还需要适当的耐受体内代谢环境的抗性和合适的在给药部位处的滞留能力。因此，太低的 DS 或交联度并不是优选的。因此，粘度和弹性之间的平衡是重要的。

[0089] 根据上述条件设计的交联的 HA 衍生物的溶液可以是能够穿过具有 18 针规到 25 针规的针的可注射溶液并且可用作关节内给药用注射溶液。

[0090] 例如，站在作为 DS 和交联度的乘积并用相对于 HA 的每个构成性二糖单位而言交联基团的二聚体的摩尔比 (%) 表示的交联程度的立场上，本发明的交联的 HA 衍生物优选具有的交联程度基于 HA 的构成性二糖单位的总数为 0.6% 至 15%、更优选 1.0% 至 7.5%。

[0091] 正如如下所述的实施例中所示的，对于一个治疗期，本发明的交联的 HA 衍生物通过单次注射、而非通过 3 至 5 次的一系列注射，显示出更显著的镇痛效果。另外，本发明的交联的 HA 衍生物比只是 HA 的溶液保持更长的镇痛效果，并且对急性疼痛和慢性疼痛二者都显示出长久或长期的镇痛效果。另外，通过单次注射还提供了长期的对滑膜的抗炎效果和软骨保护效果。

[0092] 根据本发明，有可能提供用于治疗包括 OA、外伤性关节炎、炎性关节炎病症、退行性关节炎病症等在内的关节炎病症的关节内给药用注射溶液和药物组合物。该注射溶液包含本发明的交联的透明质酸衍生物作为活性成分以及包含药学可接受的载体，并且同样地，该药物组合物包含本发明的交联的透明质酸衍生物作为活性成分以及包含药学可接受的载体。

[0093] 该药学可接受的载体的实例是被用于本发明的交联的 HA 衍生物的溶液的含水介质。例如，有注射用水、生理盐水和磷酸盐缓冲盐水。对于注射通常还可接受添加剂，诸如 pH 调节剂和张力剂，否则，本发明的注射溶液和药物组合物丧失所需的治疗效果并产生副作用。例如，有磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠。

[0094] 该注射溶液和药物组合物通过在一个疗程内比市售的 IA-HA 产品的剂量数 (即，在一个疗程进行 3 至 5 次的一系列注射) 具有更少的剂量数而充分有效。

[0095] 还有可能提供包括填充有本发明的交联的 HA 衍生物的溶液的注射器的药包，如

果必要,其装备有柱塞、柱塞杆等。

[0096] 根据上述方法和条件制造的交联的 HA 衍生物可用于注射溶液和药物组合物。用于注射溶液或药物组合物的优选的交联的 HA 在交联方面具有以下参数:

[0097] 交联程度为 0.6%至 15%和置换度为 3%至 50%,

[0098] 交联程度为 0.6%至 15%和交联度为 5%至 40%,

[0099] 置换度为 3%至 50%和交联度为 5%至 40%,

[0100] 交联程度为 0.6%至 15%、置换度为 3%至 50%和交联度为 5%至 40%,或者

[0101] 交联程度为 1%至 7.5%、置换度为 10%至 25%和交联度为 10%至 30%。

[0102] 可用本发明的药剂进行治疗的疾病不受特别限制,并且本发明的药剂有可能被用于缓解由关节炎病症引起的关节疼痛和抑制由关节炎病症引起的滑膜炎症、抑制由关节炎病症引起的软骨退化和改善关节运动范围的治疗剂。另外,本发明的药剂有可能不仅用于治疗上述疾病而且还可用于预防上述疾病。

[0103] 注射溶液或药物组合物的剂量不受特别限制,因为该项应当根据特定的症状、待治疗受试者的年龄、体重等而异个别进行确定。

[0104] 基于 HA 衍生物,剂量的实例优选是对于一次给药每个成年患者(50-70 千克)为 15 毫克至 60 毫克的普通剂量范围,另外可以例如是 0.3 毫克/千克至 1.2 毫克/千克的范围。注射溶液的浓度的优选实例为基于溶液的总重量为 0.5%至 3.0%、更优选 0.7%至 2.0%(作为与交联基团连接的 HA 衍生物)。注射溶液的用法的优选实例是对于一系列治疗为单次注射或二次注射。这同样适用于药物组合物的可注射形式。

[0105] 本发明的注射溶液和药物组合物的可注射形式的优选实施方案之一可如下进行举例说明。

[0106] 交联的 HA 衍生物的性质如下所示:

[0107] HA 的重均分子量:500,000 至 2,500,000;

[0108] 交联基团的化合物:肉桂酸或肉桂酸衍生物,

[0109] 间隔基化合物:氨基烷基醇,更优选氨基戊醇、氨基丁醇、氨基丙醇或氨基乙醇,

[0110] 交联基团的 DS:10%至 25%,

[0111] 交联度:10%至 30%。

[0112] 介质:盐水、磷酸盐缓冲盐水或注射用水

[0113] 交联的 HA 衍生物的溶液的浓度:0.7%至 2.0%。

[0114] 溶液的性质:与在相同浓度条件下的 HA 的溶液相比,具有更高的粘弹性特性和更高的股线(tread)成形性,并且当在 24℃下以 0.2 毫升/秒的速度从注射针中被挤出时能够穿过具有 18 到 25 针规的针。

[0115] 另外,交联程度的优选实例是 1.0%至 7.5%。并且其具有适中的流动性,例如,1 重量%(作为与交联基团连接的 HA)的交联的 HA 衍生物胶凝当在 24℃下以 0.2 毫升/秒的速度从注射针中被挤出时,有可能自 23 针规注射针的末梢开口端起,在与水平方向偏离 45°的方向形成长度为至少 3 厘米的不间断的连续股线。

[0116] 在本发明中,包含交联的 HA 衍生物的水凝胶态溶液在例如美国专利 6,602,859 中有述,该文献作为参考并入本文。

[0117] 实施例

[0118] 基于以下实施例更具体地描述本发明。然而,本发明的技术范围决不受到该实施例的限制。

[0119] < 合成例 >

[0120] 400mg 的重均分子量为 900,000 的透明质酸钠 (由 SEIKAGAKUCORPORATION 制造) 与包含水和二氧杂环己烷的混合溶液在搅拌下进行混合。在室温下,向所得溶液中连续地混入 34mg 的 N-羟基琥珀酸亚胺 (HOSu)/1ml 的水 (0.6 当量/HA 二糖单位 (mol/mol)); 29mg 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDCI · HCl)/1ml 的水 (0.3 当量/HA 二糖单位 (mol/mol)); 51mg 的 4-(6-氨基己酰胺) 乙基肉桂酸酯盐酸盐/1ml 的水 (0.3 当量/HA 二糖单位 (mol/mol))。所得混合物搅拌 3 小时,所得混合物进一步与 200mg 的碳酸氢钠/3ml 的水混合,搅拌 2 小时,然后与 400mg 的氯化钠混合。将乙醇加入到所得反应溶液中以沉淀出固体。所得固体先后用 80% (vol./vol.) 的乙醇和乙醇洗涤,然后在室温下干燥过夜,从而获得 360mg 的白色固体与 4-(6-氨基己酰胺) 乙基肉桂酸酯结合的透明质酸:“与 4-(6-氨基己酰胺) 乙基肉桂酸酯结合的透明质酸”在下文中仅被称作 int-HAD 1。

[0121] 另外,进行与上面相同的过程,不同之处在于加入如下所述当量的 N-羟基琥珀酸亚胺 (HOSu)、EDCI · HCl 和肉桂酸酯衍生物,从而获得彼此具有不同的引入百分数 (置换度) 的 int-HAD。

[0122] (int-HAD 2) HOSu、EDCI · HCl 和 3-氨基丙基肉桂酸酯盐酸盐分别为 0.2、0.10 和 0.10mol/mol HA 二糖单位。

[0123] (int-HAD 3) HOSu、EDCI · HCl 和 4-氨基丁基肉桂酸酯盐酸盐分别为 1.0、0.5 和 0.5mol/mol HA 二糖单位。

[0124] (int-HAD 4) HOSu、EDCI · HCl 和 5-氨基戊基肉桂酸酯盐酸盐分别为 1.4、0.7 和 0.7mol/mol HA 二糖单位。

[0125] (int-HAD 5) HOSu、EDCI · HCl 和 8-氨基辛基肉桂酸酯盐酸盐分别为 0.6、0.3 和 0.3mol/mol HA 二糖单位。

[0126] (int-HAD 6) HOSu、EDCI · HCl 和 3-氨基丙基肉桂酸酯盐酸盐分别为 0.2、0.10 和 0.10mol/mol HA 二糖单位。int-HAD 6 的制备采用与制备 int-HAD 2 相同的方法进行,不同之处在于 3-氨基丙基肉桂酸酯的置换度低于 int-HAD 2 的置换度。

[0127] 然后,将得自上述的引入有肉桂酸衍生物的透明质酸 (int-HAD1-6) 分别溶解在 5mM 磷酸盐缓冲生理盐水中,从而使得所得溶液的浓度以透明质酸计算变为 1.0 重量%。

[0128] 并且将所得溶液分别用紫外线照射 20-40 分钟。这些溶液通过紫外线照射被转化为胶凝形式 (水凝胶),所得胶凝在下文中被称作交联的透明质酸盐凝胶。

[0129] 在下文的实验研究中的“交联的透明质酸盐胶凝”(在本文中有时被称作 HA-凝胶)是用紫外线照射由上述合成例制备的 int-HAD 的 1.0% 溶液获得的凝胶。在下文的实验研究中“1% 的透明质酸钠溶液 (1% HA-Na)”使用由 SEIKAGAKU CORPORATION 制造的 SUPARTZ® (在下文中有时被称作 HA-Na)。

[0130] 所用的交联的透明质酸盐胶凝和 1% 的透明质酸钠溶液 (1% HA-Na) 二者都得自家鸡/公鸡的鸡冠。

[0131] 实施例 1: 关节内注射交联的透明质酸盐胶凝 (HA-凝胶) 对兔的前十字韧带

(ACL) 横切诱导的关节炎的效果。

[0132] 目的

[0133] 在该研究中使用的兔 ACL 横切模型作为关节炎模型被接受, 起产生与人的 OA 类似的软骨退化。因此, 该模型经常被用来评价透明质酸制剂 (SUPARTZ®、HYALGAN®、HEALON®、SYNVISC®)。

[0134] 本研究的目的旨在考察 HA- 凝胶在 ACL 横切模型中的效力。

[0135] 方法

[0136] 通过横切单侧 ACL 在 48 只雄性兔中诱导实验性骨关节炎 (OA)。在 ACL 横切后四周, 以 0.05 毫升 / 千克 / 关节的剂量向左后膝的关节腔内给予 HA- 凝胶一次或两次 (间隔 2 周)。将其效力与每周给药一次重复给药 5 周的 PBS 或 1% 的透明质酸钠溶液 (1% HA-Na) 的效力进行比较。所有的动物在 ACL 横切后 9 周被处死。然后取出左膝关节并进行如下评价: 软骨退化的形态学评价, 滑膜液体积和蛋白质含量, 滑膜液中作为滑膜炎指标的浸润细胞数和氨基多糖含量, 和作为软骨和滑膜的组织病理学考察的股骨髁的番红 O 染色。

[0137] 注射体积被设定为对于所有供试物质是相同的。

[0138] 结果

[0139] 在形态学评价中, 评价了每个动物在两个部位 (股骨髁和胫骨坪) 内的改变并且根据以下标准对每组中的总共 24 个部位进行了计分。

[0140] 1 分: 完好的表面 (未被印度墨水染色)。

[0141] 2 分: 最小原纤化 (表面保持了作为细长形斑点的墨水)。

[0142] 3 分: 明显的原纤化

[0143] 4 分: 侵蚀 (软骨丧失, 暴露出下面的骨)。

[0144] 4a: $0\text{mm} < \text{侵蚀长度} \leq 2\text{mm}$

[0145] 4b: $2\text{mm} < \text{侵蚀长度} \leq 5\text{mm}$

[0146] 4c: $5\text{mm} < \text{侵蚀长度}$

[0147] 4d: $5\text{mm} \times 2\text{mm} < \text{侵蚀 (长度 mm} \times \text{宽度 mm)}$

[0148] 在形态学评价中, 与 1% HA-Na 相比, HA- 凝胶组的软骨退化更小 (图 1)。事实上, 在单次注射 HA- 凝胶组和二次注射 HA- 凝胶组中, 关节软骨的退化都比用 5 周注射 PBS 进行处理的对照组显著降低。另外, 考虑注射次数, HA- 凝胶清楚地表明了与 1% HA-Na 相比降低关节软骨的退化。相比之下, 给予 1% HA-Na 与给予 PBS 相比降低了软骨退化, 但是效力不显著。在供试物质之间的严重性比较如下排序: $\text{PBS} > 1\% \text{ HA-Na} > \text{单次注射 HA- 凝胶} \geq \text{二次注射 HA- 凝胶}$ 。HA- 凝胶对于抑制软骨退化的效力也通过在滑膜液中软骨素 6- 硫酸盐 (CS-6S) 的增加有所降低被证实。另外, HA- 凝胶似乎改善了滑膜炎的症状, 这根据滑膜液、蛋白质和软骨素 4- 硫酸盐 (CS-4S) 含量的增加所有降低进行判断。

[0149] 另外, 有报道说滑膜液中的 CS-6S 来自软骨, 并且滑膜液中的 CS-4S 由滑膜炎症所致通过血管释放。换句话说, CS-6S 的增加有所降低显示了软骨退化的预防, CS-4S 的增加有所降低显示了滑膜炎症的预防。

[0150] 在图 2 中, (A) 是得自 PBS 组的典型样本, (B) 是得自 1% HA-Na 组的典型样本, (C) 是得自单次注射 HA- 凝胶组的典型样本, 和 (D) 是得自二次注射 HA- 凝胶组的典型样本 (初始放大倍数 $\times 40$)。

[0151] 番红 O 染色显示出软骨内的氨基多糖 (GAG) 含量 (GAG : 红色, 骨和胶原纤维 : 绿色)。

[0152] 进行了以下的观察和计分 : 未染色的 / 番红氧染色减少的软骨基质区域, 软骨基质中裂痕形成, 软骨基质的原纤化, 软骨的缺陷, 软骨细胞数的增加, 软骨细胞数的降低, 软骨下骨的重塑以及血管向软骨基质内的浸润。在供试物质之间的严重性比较如下排序 : PBS > 1% HA-Na > 单次注射 HA- 凝胶 > 二次注射 HA- 凝胶。

[0153] 总之, 因为当滑膜炎不严重时软骨退化是较轻度的, 由 HA- 凝胶诱导的这些变化可以有利地相互作用以缓解病变的进展。关节软骨的组织病理学检查所见支持了肉眼可见评价 (图 2)。在滑膜的组织病理学检查中, 在所有的实验组中都观察到立方形的 / 分层的滑液上皮、上皮下的细胞浸润, 上皮下的纤维化 / 浮肿, 上皮下的出血和上皮下的钙沉积。这些变化在 HA- 凝胶组中比在 PBS 组中的严重性更低。

[0154] 结论

[0155] 这些数据显示在 OA 的兔 ACL 横切模型中, 给予 HA- 凝胶一次或两次 (间隔 2 周) 抑制了滑膜炎和软骨退化。

[0156] 实施例 2 : 关节内注射交联的透明质酸盐凝胶 (HA- 凝胶) 对大鼠的由血管舒缓激肽诱导的关节炎疼痛的效果。

[0157] 目的

[0158] 在本研究中使用的关节炎疼痛模型是由注射具有 PGE₂ (疼痛增强剂) 的血管舒缓激肽 (内源性痛觉过敏物质) 到大鼠的关节腔内制造的局部疼痛模型。这一模型已被用于基于作为关节疼痛的行为表现的步态诸如“抬爪”、“跛行”和“三腿行走”来评价透明质酸制剂的镇痛效果。有报道说通过该模型评价的镇痛效果与滑液组织中透明质酸的浓度相关。

[0159] 本研究的目的在于考察 HA- 凝胶与 1% HA-Na 和 PBS 相比对大鼠的由血管舒缓激肽诱导的关节炎疼痛的长久镇痛效果。

[0160] 方法

[0161] 供试物质以 0.05 毫升 / 关节的剂量被给予到雌性大鼠的左后腿的膝关节腔内。在给药后的第 1、2 和 4 周, 血管舒缓激肽溶液和 PGE₂ 的混合物被注射到相同的关节内以诱导关节炎疼痛。1% HA-Na 仅在第 1 周被评价, 因为该治疗典型地要求一周再注射一次。在盲条件下, 在注射血管舒缓激肽溶液后观察动物的行走约 2 分钟并且以 5 分等级对疼痛的严重性进行计分 (表 1)。

[0162] 表 1 : 由血管舒缓激肽诱导的关节炎疼痛模型 : 指派疼痛记分的标准

[0163]

记分	行为表现
0	正常或跛行 ≤ 5 秒
1	跛行 6-30 秒
2	显示出以下两种表现中的一种 : 跛行 ≥ 31 秒 抬爪 ≤ 5 秒
3	显示出以下两种表现中的一种 : 抬爪然后跛行 三腿行走 ≤ 5 秒
4	三腿行走 ≥ 6 秒

[0164] 结果

[0165] HA- 凝胶与对照组相比在给药后的时间点第 1、2 和 4 周显著抑制由血管舒缓激肽诱导的疼痛反应 (图 3)。在第 1 周 HA- 凝胶的镇痛效果比 1% HA-Na 更显著。

[0166] 结论

[0167] 证实了给予 HA- 凝胶到关节腔内比作为阳性对照进行测试的 PBS 和 1% HA-Na 更有效地对抗由血管舒缓激肽诱导的关节炎疼痛。同对照组比较起来, HA- 凝胶提供了长达至少 4 周的持续镇痛效果。

[0168] 实施例 3: 关节内注射交联的透明质酸盐凝胶 (HA- 凝胶) 对大鼠的由硝酸银诱导的关节炎疼痛的效果。

[0169] 目的

[0170] 本研究的目的旨在考察 HA- 凝胶对大鼠的由硝酸银诱导的关节炎疼痛的疼痛缓解效果。该模型已通常被用于评价许多非甾体抗炎药 (NSAID) 的镇痛效果。

[0171] 方法

[0172] 1% 的硝酸银水性溶液以 0.05 毫升 / 关节的剂量被注射进入 42 只雄性大鼠的左后腿的膝关节腔内。在注射后 24 小时, 根据发炎爪的行走时的疼痛记分和负重率将动物分派为不同的组。以 4 分规格对疼痛的严重性进行计分; 0 分为正常或几乎正常, 1 分为轻度跛行, 2 分为重度跛行, 3 分为三腿行走。负重率通过使用压迫行为测痛仪 (由 Tokken Inc. 制造) 进行测量。以 0.05 毫升 / 关节剂量给予 HA- 凝胶、1% HA-Na 或 PBS。在给药后第 1、2 和 3 天, 发炎爪的负重率和疼痛记分以上述相同方式进行评价。评价的项目是负重率 (%) ($= \text{发炎爪的负重 (g)} / \text{体重 (g)} \times 100$) 和行走时的疼痛记分。

[0173] 结果

[0174] 在给予供试物质后第 1-3 天的每个时间点, 在给予了 HA- 凝胶的动物中, 比给予 PBS 或 1% HA-Na 的动物中, 发炎爪的负重率显著更高 (图 4)。另外, 在每个时间点测量的 HA- 凝胶的疼痛计分比 PBS 或 1% HA-Na 的疼痛计分更低 (图 5)。

[0175] 结论

[0176] 这些数据证明了给予 HA- 凝胶到关节腔中比给予 PBS 和 1% HA-Na 对于炎性关节疼痛更有效。

[0177] 实施例 4: 交联的透明质酸盐凝胶 (HA- 凝胶) 对狗的由尿酸一钠诱导的关节炎性关节疼痛的镇痛效果

[0178] 目的

[0179] 滑膜液中尿酸一钠 (MSU) 微晶的沉积促进了人的急性炎性关节疼痛。由关节内注射 MSU 结晶诱导的实验性关节疼痛模型已被广泛地用于评价透明质酸钠和非甾体抗炎药的镇痛效力。

[0180] 本研究的目的旨在考察 HA- 凝胶对狗的由 MSU 诱导的关节疼痛 的镇痛效果。

[0181] 方法

[0182] 通过以 0.3 毫升 / 千克 / 关节的剂量向雌性 beagle 狗的左后肢的膝关节腔内进行关节内注射以给予 HA- 凝胶、生理盐水或 1% HA-Na。然后在用供试物质处理后 0.5 或 72 小时在相同关节处注射诱导炎症和严重疼痛的物质尿酸一钠 (MSU)。在注射 MSU 后的 2、3、4、5、6 和 8 小时, 进行步态计分并且计算左后肢的负重率作为关节疼痛指标。从这些指标计算时间曲线下面积 (AUC)。

[0183] 观察步态并根据以下标准对步态状态计分 (以异常步态得分显示): 0: 无变化 (正常步态), 1: 轻度 (站立正常, 但是步态不自然), 2: 适中 (4 肢站立, 但是通常抬左后肢 (注射部位)), 3: 严重 (当行走时仅左后肢末端接触地面), 和 4: 非常严重 (左后肢不能

有任何负重 ;3 肢行走)。另外,使用 3 个秤用于负重测量 :A 秤是数字式台秤 (DP-6100GP ; Yamato Scale Co., Ltd) ;B 秤和 C 秤是荷重元数字式台秤 (DP-6000 ;Yamato Scale Co., Ltd.)。将前肢处于 A 秤,右后肢处于 B 秤,和左后肢处于 C 秤。得自所有三个秤的值被记录到接近 0.1kg。使用下式计算负重率。

[0184] 负重率 = $100 \times \text{平均 C} / (\text{平均 A} + \text{平均 B} + \text{平均 C})$ 。

[0185] 结果

[0186] 在其中在用供试物质处理后 0.5 小时注射 MSU 的实验中,异常步态记分的平均 AUC 在 HA- 凝胶、生理盐水和 1% HA-Na 中分别是 0.0、28.0 和 13.5 (图 6,表 2)。HA- 凝胶表现出完全的镇痛效果并且在所有被处理的动物中未观察到痛苦的行走。1% HA-Na 与生理盐水相比也表现出显著的镇痛效果,但是该效果显著低于 HA- 凝胶。

[0187] 在其中在用供试物质处理后 72 小时注射 MSU 的实验中,异常步态记分的 AUC 在 HA- 凝胶、生理盐水和 1% HA-Na 中分别是 1.5、27.6 和 27.1 (图 7,表 3)。HA- 凝胶仍然表现出显著的镇痛效果,而 1% HA-Na 对膝关节疼痛的效果几乎完全被削弱。

[0188] 在两个实验中,左后肢的负重率的改变与异常步态记分中的那些改变是一致的。

[0189] 表 2 :由尿酸一钠诱导的关节炎性关节疼痛模型 :异常步态记分的 AUC

[0190] 生理盐水、HA- 凝胶和 1% HA-Na 在 MSU 注射前 0.5 小时被关节内给予。

[0191]

组	动物数	异常步态记分的 AUC
生理盐水 (0.3 毫升/千克)	12	28.0±0.0
交联的透明质酸盐凝胶 (HA-凝胶) (0.3 毫升/千克)	12	0.0**±0.0
1%HA-Na (0.3 毫升/千克)	12	13.5**' ##±3.2

[0192] **p < 0.01 :与生理盐水具有显著差异 (Tukey-Kramer 多次对比检验) ##p < 0.01 :与交联的透明质酸盐胶凝具有显著差异 (Tukey-Kramer 多次对比检验)

[0193] 表 3 :尿酸一钠诱导的关节炎性关节疼痛模型 :异常步态记分的 AUC

[0194] 生理盐水、HA- 凝胶和 1% HA-Na 在 MSU 注射前 72 小时被关节内给予。

[0195]

组	动物数	异常步态记分的 AUC
生理盐水 (0.3 毫升/千克)	12	27.6±1.1
交联的透明质酸盐凝胶 (HA-凝胶) (0.3 毫升/千克)	12	1.5**±4.5
1%HA-Na (0.3 毫升/千克)	12	27.1##±2.1

[0196] **p < 0.01 :与生理盐水具有显著差异 (Tukey-Kramer 多次对比检验)

[0197] ##p < 0.01 :与交联的透明质酸盐胶凝具有显著差异 (Tukey-Kramer 多次对比检验)

[0198] 结论

[0199] 证实了单次关节内给予 HA- 凝胶抑制了由 MSU 诱导的关节炎性膝关节疼痛。与 1% HA-Na 相比, HA- 凝胶的镇痛效果更优异并且更持久。

[0200] 实施例 5 :在兔膝的关节腔和滑膜中交联的透明质酸盐胶凝 (HA- 凝胶) 的残留率
[0201] 目的

[0202] 本研究的目的旨在考察在兔的关节内注射的 HA- 凝胶的局部滞留。

[0203] 方法

[0204] HA- 凝胶及其非交联的中间体 (int-HAD) 以 0.05 毫升 / 千克 / 关节的剂量 (HA- 凝胶和 int-HAD 的浓度 :1%) 被给予到雄兔的左和右两个膝关节腔内。在给药后第 1、3、5、7、14 和 28 天将动物处死, 收集滑膜液和滑膜。通过高效液相色谱法 (HPLC) 定量表示交联的透明质酸盐的残留的交联剂反式肉桂酸 (tCA), 以计算 HA- 凝胶和 int-HAD 的残留率。

[0205] 结果

[0206] 从 HPLC 测定值计算残留百分数。

[0207] 关于外来给予到关节腔的透明质酸盐的代谢分配, 通常已知透明质酸盐逐渐从滑膜液移动到滑膜。

[0208] 然而, 大部分的 HA- 凝胶在 7 天内从滑膜液消失, 其在给予后保留在滑膜内长达 28 天。通过比较 HA- 凝胶和 int-HAD 的残留率, 发现在给药后第 1、3 和 5 天在滑膜液中检测到显著更高量的 HA- 凝胶 (图 8)。根据图 8, 保留在滑膜液中的 HA- 凝胶在给药后第 3 天达到被给予的 HA- 凝胶的约 15%。然而, 在滑膜中, 交联的透明质酸盐胶凝的残留比在第 7、14 和 28 天显著更高 (图 9)。

[0209] 结论

[0210] 与非交联的透明质酸相比, 被注射的 HA- 凝胶在滑膜液和滑膜中保留达延长时段。另一方面, 非交联的透明质酸迅速地从滑膜液中散布出, 以更水平保持在滑膜中。因此, HA- 凝胶可以长期保留在关节 (即给药部位) 中, 因为其与 int-HA 相比更缓慢地从滑膜液移动到滑膜并且更逐渐地被代谢掉。HA- 凝胶的增加的滞留可促进优异的软骨保护效果和长久的镇痛效果。

[0211] 实施例 6 :关节内注射交联的透明质酸盐凝胶 (HA- 凝胶) 对兔的由木瓜酶诱导的关节炎的效果。

[0212] 在本研究中使用的兔的由木瓜酶诱导的关节炎模型已被接受为是通过注射木瓜酶 (存在于番木瓜中的巯基蛋白酶) 进入兔的膝关节腔内制造的骨关节炎 (OA) 模型。

[0213] 本研究的目的旨在考察 HA- 凝胶在由木瓜酶诱导的关节炎模型中的效力。该研究进行两次。

[0214] 将兔 (21 周龄) 在用氯胺酮全身麻醉 (1 毫升 / 头, i. v.) 下以仰卧姿势被固定, 并且用电动剪毛机剃除了左后腿的膝关节周围的较宽区域。膝关节的注射部位用 70% 乙醇和 Isodine® 溶液消毒。

[0215] 之后, 以 500 μ L / 关节的剂量向左后膝的关节腔内注射两次 (间隔 3 天) 的 0.8% 的木瓜酶溶液。

[0216] 总共 20 只兔, 每组 5 只兔, 用于该研究。在即将注射前用 L- 半胱氨酸活化木瓜酶溶液。

[0217] 在第二次注射木瓜酶后一周,将 150 μ L 的供试物质 (HA- 凝胶或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)) 给予到左后腿的膝关节腔内,每周一次,持续三周。

[0218] 所有的动物在给予供试物质后的 1 周被处死。然后取出左膝关节并从左膝关节收集滑膜液和滑膜。

[0219] 对左膝关节进行了形态学检查评价,滑膜和关节软骨的组织病理学考察,滑膜液体积和蛋白质含量。在组织病理学考察中,从用福尔马林固定的滑膜制备石蜡切片并用苏木精-曙红 (HE) 和阿辛蓝染色。在用 EDTA 脱钙和番红 O 染色后,在股骨髁和胫骨坪中观察软骨状况。

[0220] 在形态学评价中,根据实施例 1 的相同标准对退化严重性进行计分 (图 10 和图 11)。交联的透明质酸盐凝胶与 PBS 相比缓解了软骨退化。然而,其效力不显著。认为动物数不充分。

[0221] 在软骨的组织病理学考试中,通过 HA- 凝胶缓解了软骨基质的退化、软骨细胞递减和番红 O 染色减少。

[0222] 在本研究中使用的 HA- 凝胶与 PBS 相比抑制了软骨退化。

[0223] 在本研究中使用的交联的透明质酸盐凝胶的交联程度分别为 1.72% (图 10) 和 2.06% (图 11) 并且比在其它实施例研究中使用的 HA- 凝胶低。认为交联程度对于实现显著改善关节炎疼痛和软骨退化改善的效力是必要的。

[0224] 工业实用性

[0225] 根据以上的实施例,证实了关节内注射 HA- 凝胶一次或两次 (间隔 2 周) 比五次注射 HA-Na 对于膝 OA 的治疗具有相同的或者更高的有效性。还证实了 HA- 凝胶也提供在用于评价 NSAID 的动物模型中提供了治疗效力。

[0226] 当将 HA- 凝胶注射到膝关节腔中时,大部分 HA- 凝胶在 7 天内从滑膜液消失。然而,其在给药后保留在滑膜中长达 28 天。因为认为在滑膜中透明质酸的浓度与镇痛效果相关,因此 HA- 凝胶的滞留有所增加可促进长久的镇痛效果。另外,预期 HA- 凝胶是用于缓解疼痛的很好的冲击吸收剂,并改善了 OA 的膝功能,因为其比 HA-Na 溶液具有更高的粘弹性。

[0227] 暗示了用于关节疾病的治疗剂具有以下优点;单次注射的长久效果,一系列治疗的剂量数的降低,和在关节内给药中感染风险的降低。因此,可以降低对罹患关节病症的患者的应力。

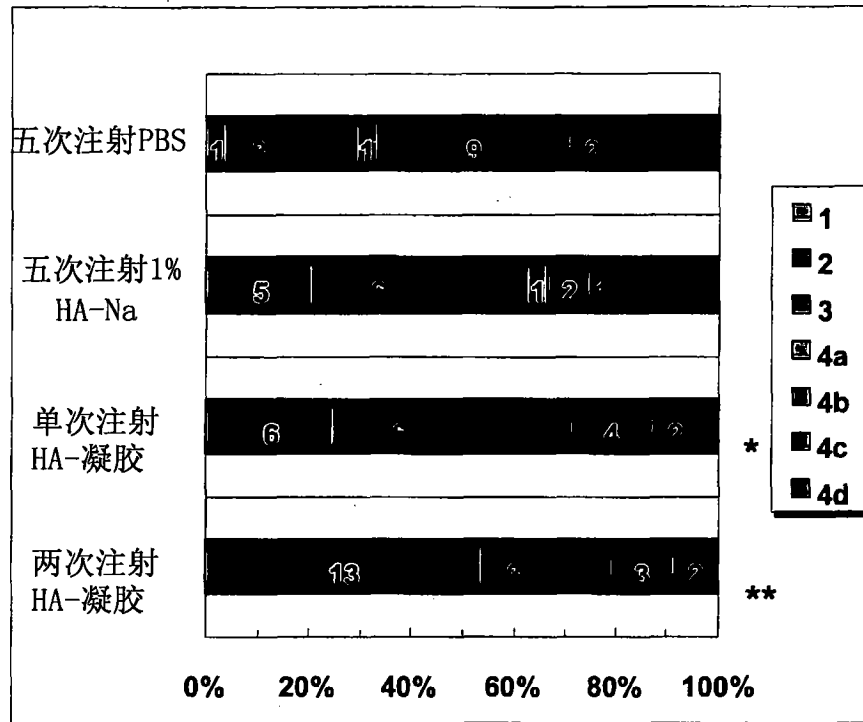


图 1

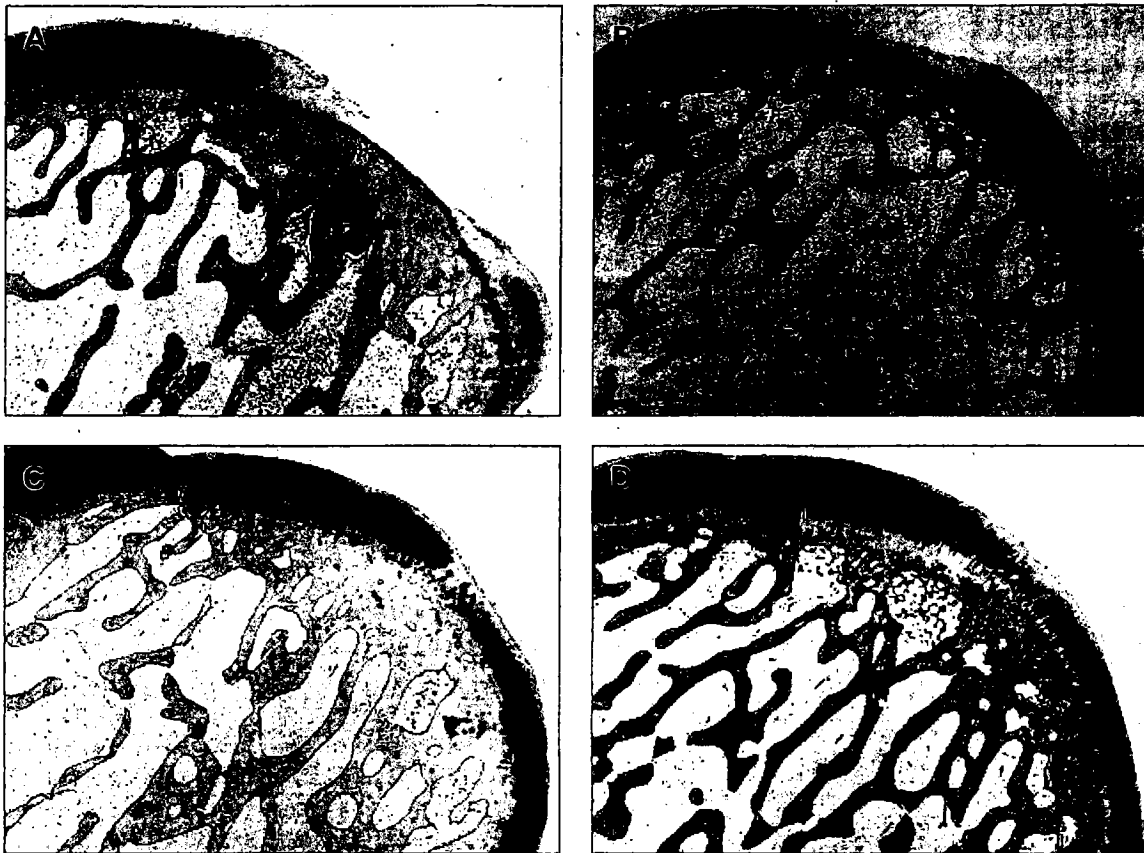


图 2

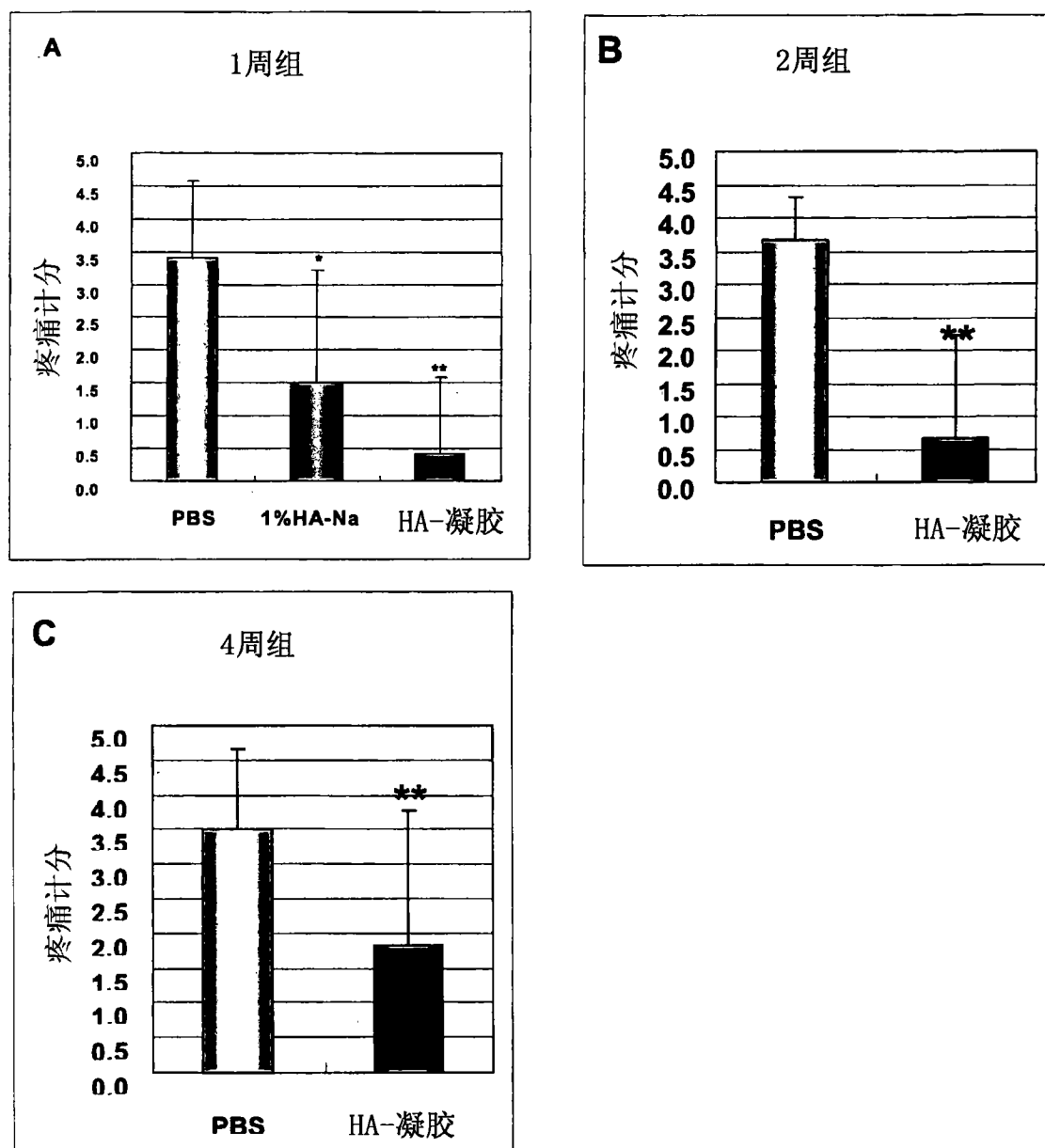


图 3

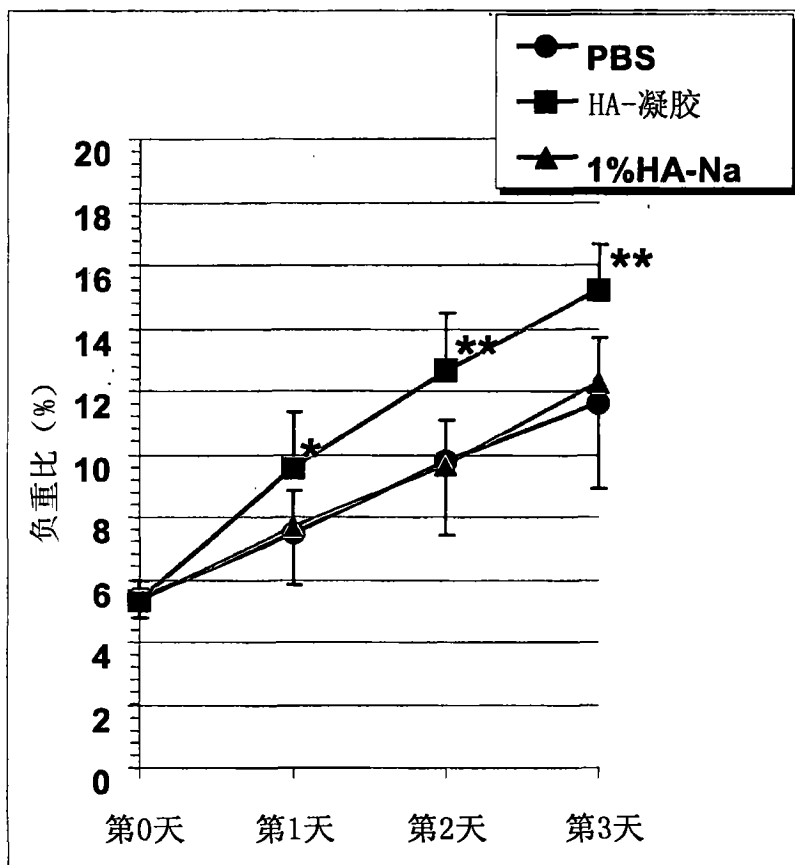


图 4

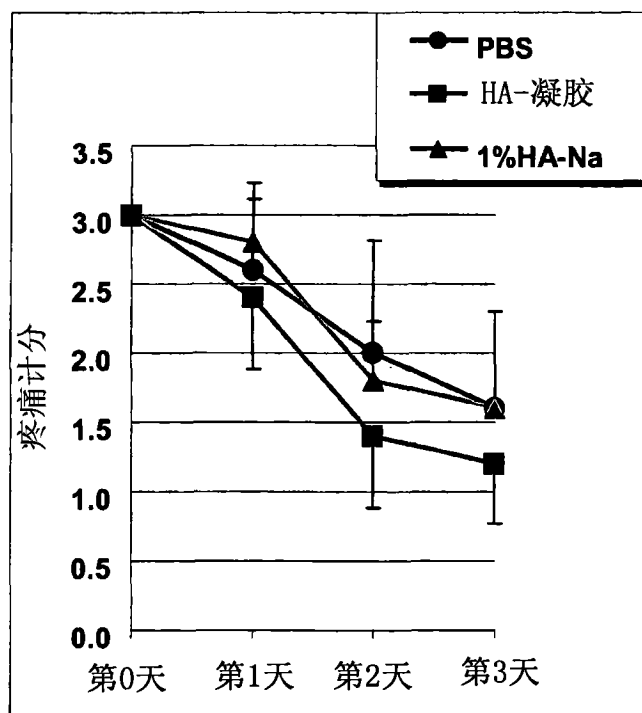


图 5

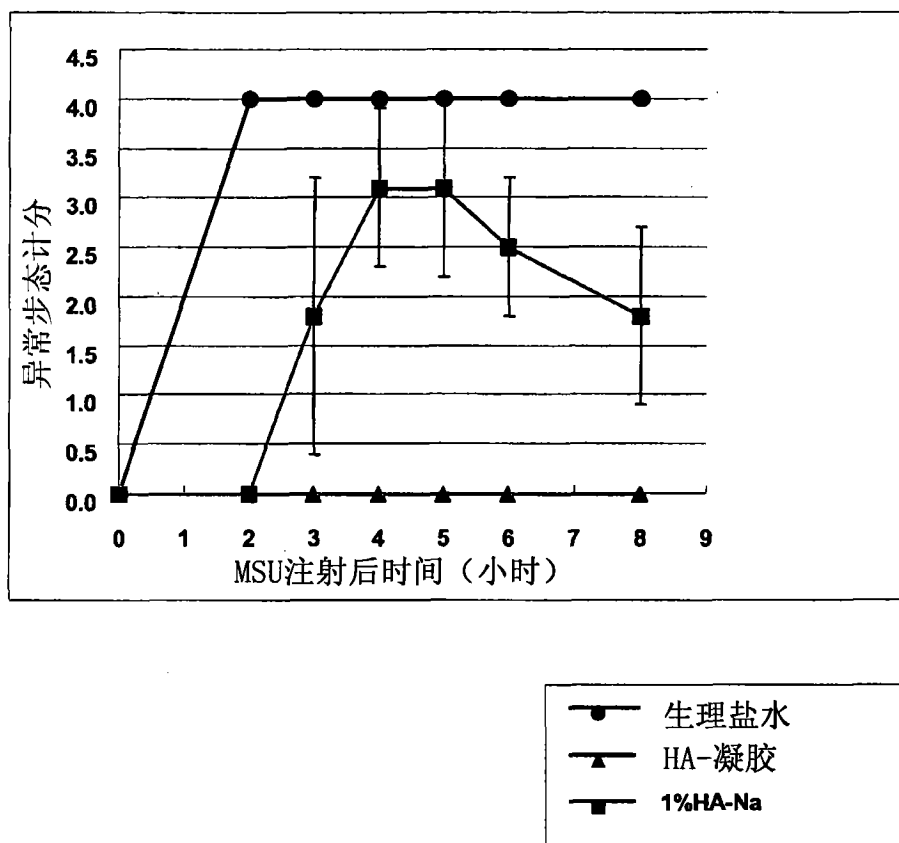


图 6

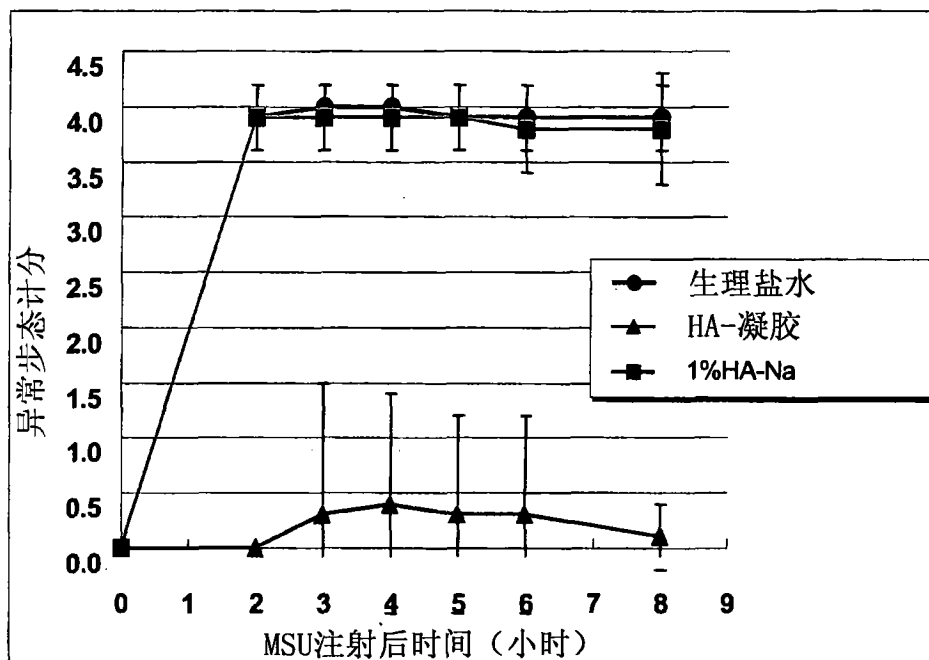


图 7

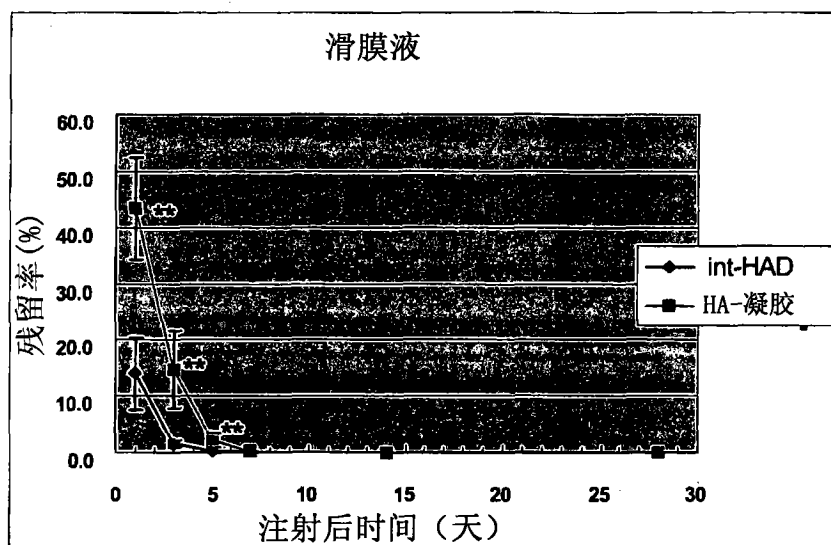


图 8

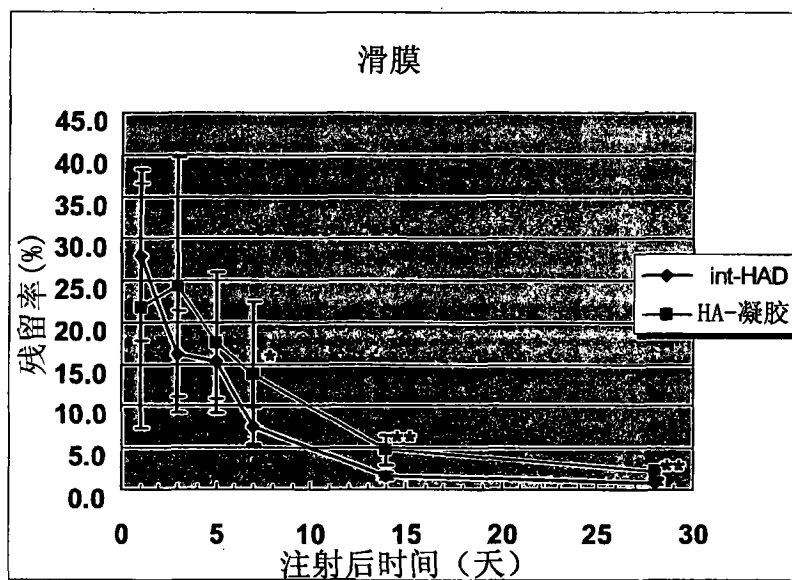


图 9

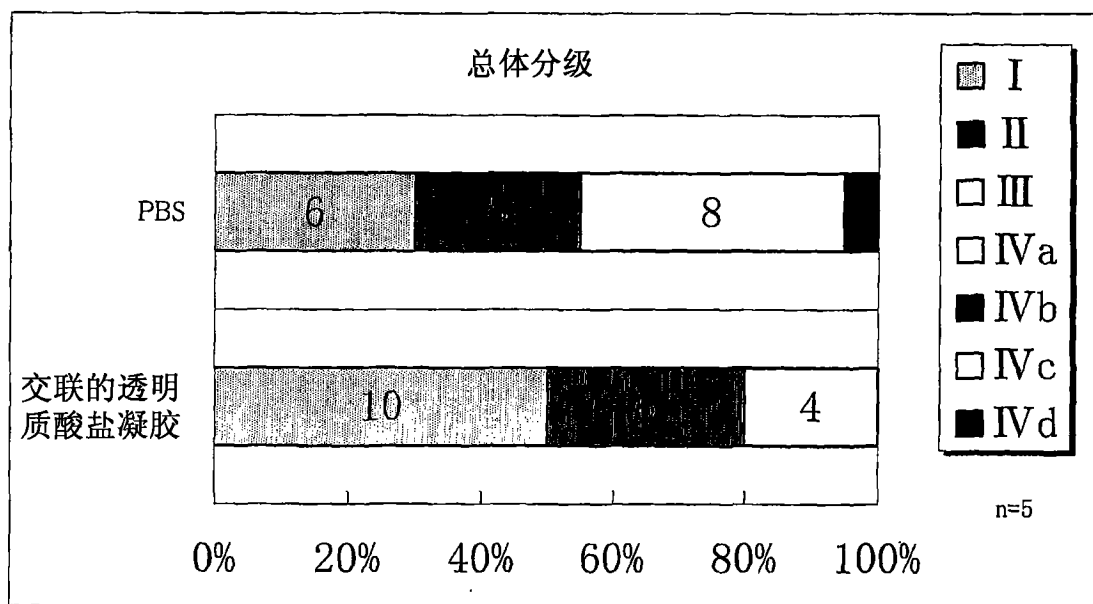


图 10

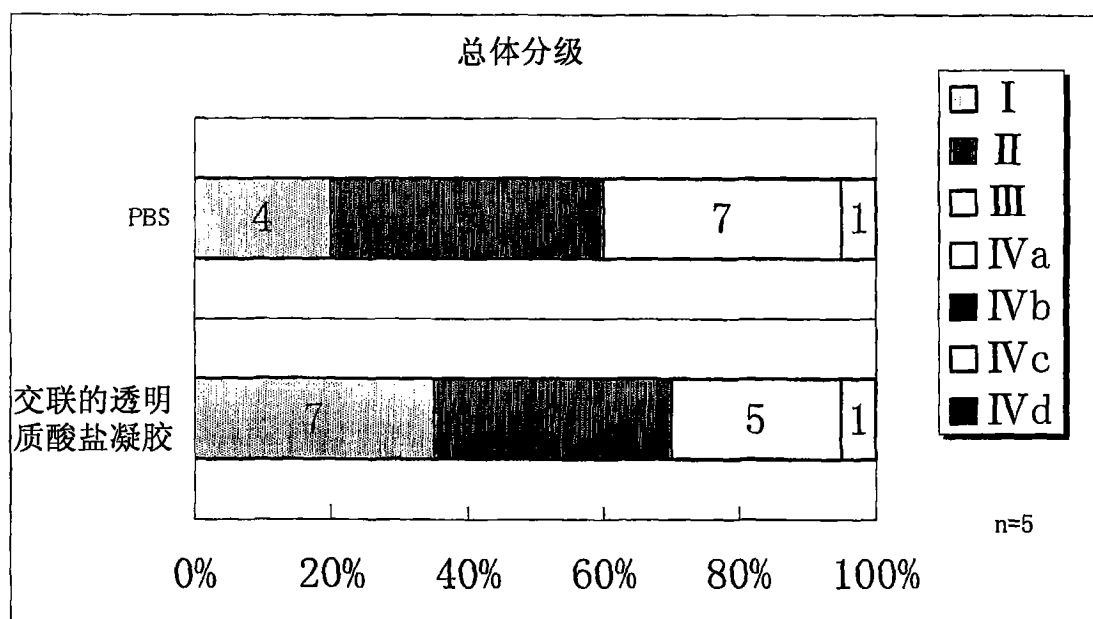


图 11