



(21)申請案號：102138965

(22)申請日：中華民國 96 (2007) 年 12 月 06 日

(51)Int. Cl. : A61K31/728 (2006.01)

C08B37/08 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

(30)優先權：2006/12/06 美國

60/868,798

(71)申請人：生化學工業股份有限公司 (日本) SEIKAGAKU CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：宮本建司 MIYAMOTO, KENJI (JP)；吉岡敬二 YOSHIOKA, KEIJI (JP)；高橋勝哉 TAKAHASHI, KATSUYA (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 101094680A

US 6602859B

審查人員：黃文延

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：11 共 50 頁

(54)名稱

治療關節失調之長效藥劑

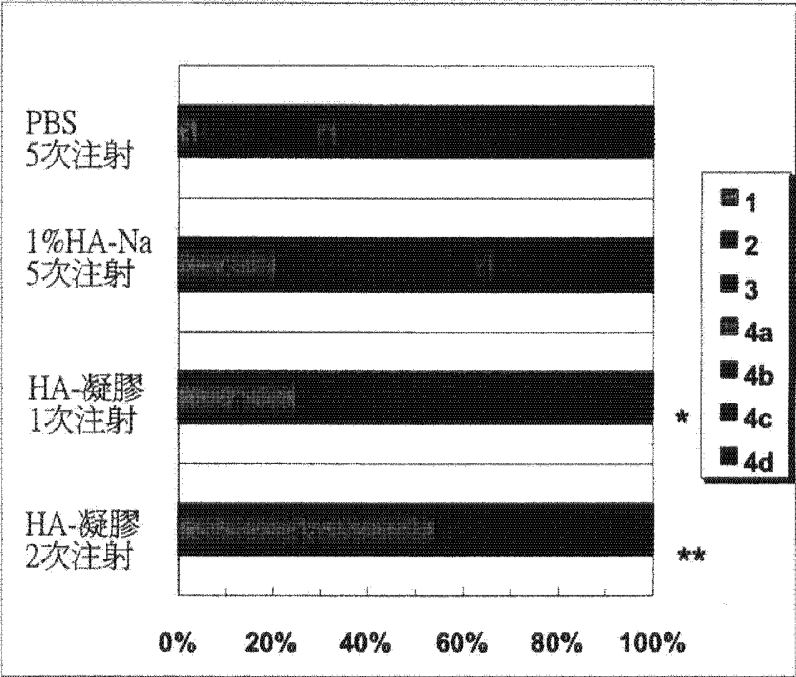
PHARMACEUTICAL AGENT HAVING LONG-LASTING EFFECT OF TREATING ARTHRITIC DISORDERS

(57)摘要

本發明係關於用於治療關節失調之供關節內投與之注射溶液，其包含：作為活性成分之經交聯之透明質酸衍生物，其中，該透明質酸之官能基之一部份與交聯基交聯至交聯程度達 0.6% 至 15% 之程度，且該經交聯之透明質酸之量具有持續長時間之鎮痛作用；以及醫藥上可接受之載劑；本發明亦關於用於減輕關節失調所造成之關節疼痛之鎮痛組成物，或用於抑制關節失調所造成之軟骨退化或滑膜發炎之組成物，各組成物包括經交聯之透明質酸衍生物及醫藥上可接受之載劑。

The present invention relates to an injection solution for intra-articular administration for treating arthritic disorders comprising a cross-linked hyaluronic acid derivative wherein part of functional groups of a hyaluronic acid are cross-linked with a cross-linking group to the extent of 0.6 to 15% of cross-linking extent as an active ingredient in an amount having a long-lasting analgesic effect and a pharmaceutically acceptable carrier, and an analgesic composition for suppressing a cartilage degeneration caused by arthritic disorders or a composition for suppressing a cartilage degeneration or an inflammation of synovium caused by arthritic disorders each comprising the cross-linked hyaluronic acid derivative and a pharmaceutically acceptable carrier.

指定代表圖：



第1圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

治療關節失調之長效藥劑

PHARMACEUTICAL AGENT HAVING LONG-LASTING EFFECT
OF TREATING ARTHRITIC DISORDERS

【技術領域】

【0001】本發明係關於藉由單次注射而具有持續長時間之鎮痛作用、軟骨保護作用及消炎作用之藥品。

【先前技術】

【0002】骨關節炎(OA)為關節退化所造成之關節疼痛及功能不良之臨床症候群，其比其他關節疾病侵犯更多的人。迄今骨關節炎為在美國及全世界最常見的關節失調，且為老年人殘疾主要原因之一。膝關節炎係常見但在基層照護中常難以處置的問題。習用的非手術處置，包括生活方式改變、物理治療及藥物治療，常無效或有殘留症狀。罹患有症狀之膝骨關節炎之病患之一選擇為藉由透明質酸之一系列關節內注射（在下文中稱為 IA-HA）來治療。透明質酸鈉為細胞外基質之天然成分，於關節內注射後對於 OA 患者作用如同潤滑劑及振動吸收劑，可緩解疼痛及改善膝功能。目前，在美國有五種 IA-HA 市售產品：SUPARTZ[®]、SYNVISC[®]、HYALGAN[®]、ORTHOVISC[®]及 EUFLEXXA。SYNVISC[®]為第一個在美國上市之 IA-HA 產品且為透明質酸鹽之經交聯衍生物之唯一水溶液，其他為透明質酸鈉(下文稱為 HA-Na)之水溶液。此等目前上市的 IA-HA 產品在效力上沒有明顯的差異。再者，此等

產品需要一系列(3 至 5 次)注射，換言之，單次注射無法產生長期回應。所以期望較少注射次數之新穎 IA-HA 產品，以減少侵入性及關節感染之潛在危險並藉由單次注射產生長期回應。

【0003】迄今有許多關於藉由不同的交聯方法從 SYNVISIC[®] 製造經交聯之透明質酸鹽之報告，例如藉由使用多官能環氧化合物作為交聯基所製造之經交聯之透明質酸鹽(見專利文獻 1)、經光交聯之透明質酸鹽(見專利文獻 2 至 4)及無交聯基之經分子內架橋之透明質酸鹽(見專利文獻 5)。目前正研究在對於保守性非藥物治療及/或單純鎮痛劑(例如乙醯酚胺(acetaminophen))反應不足之膝骨關節炎患者中以經交聯之透明質酸鹽作為與膝骨關節炎相關疼痛之最小侵入性治療劑。例如，據報告一種治療關節失調之注射劑可藉由使用包括具有或不具交聯結構之透明質酸鹽凝膠及磷脂之藥劑而改善，產生減少劑量之優點(見專利文獻 6)。

【0004】不過，許多有關經光交聯之透明質酸鹽產品主要著眼於產品之合成及一般性質，而未曾仔細檢視其在獨特應用方面之可用及限制條件及性質以及該經交聯之透明質酸鹽產品之特殊作用。SYNVISIC[®]與經光交聯之透明質酸鹽間之抗原性及刺激性質之比較被報告於參考文獻(見非專利文獻 1)中。

【0005】

專利文獻 1：JP-B2-5-74571

專利文獻 2：USP5462976

專利文獻 3：USP5763504

專利文獻 4：USP6031017

專利文獻 5：JP-A-2003-252905

專利文獻 6：JP-A-2002-348243

非專利文獻 1：“經光交聯之透明質酸鹽水膠在活體內之生物相容性及生物降解之評估” J. Biomed Mater Res. A 70:550-559 (2004)。

【發明內容】

【0006】開發本發明以解決先前上市之 IA-HA 產品有關作用無法持續或繼續數週之問題。

【0007】亦即，本發明如下述：

[1]一種用於治療關節失調之供關節內投與之注射溶液，其包括：

作為活性成分之經交聯之透明質酸衍生物，其中，透明質酸之官能基之一部分與交聯基交聯至交聯程度達透明質酸之構成雙醣單元總數之 0.6%至 15%之程度，且該經交聯之透明質酸衍生物之量足以顯示持續長時間或連續長時間的鎮痛作用；以及

醫藥上可接受之載劑。

[2]如[1]所述之注射溶液，其中，該經交聯之透明質酸衍生物之交聯基之取代度為該經交聯之透明質酸衍生物之構成雙醣單元總數之 3%至 50%。

[3]如[1]所述之注射溶液，其中，該經交聯之透明質酸衍生物之交聯度為構成交聯基總數之 5%至 40%。

[4]一種用於治療關節失調之供關節內投與之注射溶液，其包括：

經交聯之透明質酸衍生物，其中，該經交聯之透明質酸衍生物之交聯基之取代度為透明質酸之構成雙醣單元總數之 3%至 50%且交聯度為構成交聯基總數之 5%至 40%；以及

醫藥上可接受之載劑。

[5] 一種用於治療關節失調之供關節內投與之注射溶液，其包括：

經交聯之透明質酸衍生物，其中，交聯基之取代度為透明質酸之構成雙醣單元總數之 3%至 50%，交聯度為構成交聯基總數之 5%至 40%，且交聯程度為透明質酸之構成雙醣單元總數之 0.6%至 15%；以及

醫藥上可接受之載劑。

[6]如[1]至[5]之任一項所述之注射溶液，其中，該經交聯之透明質酸衍生物在該溶液中之濃度為該溶液總重之 0.5 重量%至 3.0 重量%。

[7]如[1]至[6]之任一項所述之注射溶液，其中，當該經交聯之透明質酸衍生物在該溶液中之濃度為約 1 重量%時，於關節內投與該溶液後 3 日，該經交聯之透明質酸衍生物在滑液中之殘留比與所投與之該經交聯之透明質酸衍生物相較，不低於 15%。

[8]如[1]至[6]之任一項所述之注射溶液，其中，於投與該溶液後，該鎮痛作用在投與部位持續 2 週或更久。

[9]如[1]所述之注射溶液，包括呈單位劑量形式之該經交聯之透明質酸衍生物，其中，單次投與時該單位劑量包括 0.3mg/kg 至 1.2mg/kg 之該經交聯之透明質酸衍生物。

[10]如[1]所述之注射溶液，其中，該經交聯之透明質酸衍生物具有下列特徵：

透明質酸之重量平均分子量為 500,000 至 2,500,000；

交聯基為桂皮酸或桂皮酸衍生物之殘基；

間隔基為胺基烷基醇之殘基；

交聯基之取代度為 10%至 25%；以及

在該經交聯之透明質酸衍生物中之交聯度為 10%至 30%，且其中，該經交聯之透明質酸衍生物在該溶液中之濃度為 0.7 重量%至 2.0 重量%。

[11]一種用於治療關節失調之供關節內投與之醫藥組成物，包括：

經交聯之透明質酸衍生物，其中，透明質酸之羧基之一部分與交聯基彼此交聯而經由醯胺鍵形成交聯；以及

醫藥上可接受之載劑；

該醫藥組成物具有可持續的鎮痛作用。

[12]如[11]所述之組成物，其中，透明質酸在光照射下與含有胺基之交聯基藉由光二聚反應或藉由光聚合反應而交聯，形成該經交聯之透明質酸衍生物，其中，該透明質酸之羧基與該交聯基之胺基鍵結。

[13]如[11]或[12]所述之組成物，其中，該透明質酸之該羧基與該交聯基交聯至交聯程度達透明質酸之構成雙醣單元總數之 0.6%至 15%之程度。

[14]如[11]至[13]之任一項所述之組成物，其中，於投與該組成物後，該鎮痛作用在投與部位持續 2 週或更久。

[15]如[11]至[14]之任一項所述之組成物，其中，當該經交聯之透明質酸衍生物的溶液之濃度為約 1 重量%時，於關節內投與該組成物後 3 日，該經交聯之透明質酸衍生物在滑液中之殘留比與所投與之該經交聯之透明質酸衍生物相較，不低於 15%。

[16]一種減輕關節失調所引起之關節疼痛之鎮痛組成物，包括：

作為活性成分之經交聯之透明質酸衍生物，其中，透明質酸之官能基之一部分與交聯基交聯至交聯程度達透明質酸之構成雙

醣單元總數之 0.6%至 15%之程度，且該經交聯之透明質酸衍生物之量足以顯示持續長時間或連續長時間之鎮痛作用；以及

醫藥上可接受之載劑。

[17]一種用於抑制關節失調所引起之軟骨退化之組成物，包括：

作為活性成分之經交聯之透明質酸衍生物，其中，透明質酸之官能基之一部分與交聯基交聯至交聯程度達透明質酸之構成雙醣單元總數之 0.6%至 15%之程度，且該經交聯之透明質酸衍生物之量足以顯示持續長時間或連續長時間之抑制作用；以及

醫藥上可接受之載劑。

[18] 一種用於抑制關節失調所引起之滑膜發炎之組成物，包括：

作為活性成分之經交聯之透明質酸衍生物，其中，透明質酸之官能基之一部分與交聯基交聯至交聯程度達透明質酸之構成雙醣單元總數之 0.6%至 15%之程度，且該經交聯之透明質酸衍生物之量足以顯示持續長時間或連續長時間之抑制作用；以及

醫藥上可接受之載劑。

[19]如[16]至[18]之任一項所述之組成物，其中，該關節失調為骨關節炎。

[20]如[19]所述之組成物，其中，該關節失調為外傷性關節失調。

[21]一種套組，其包括填充有如[1]至[20]之任一項所述之注射溶液或組成物的注射器。

【圖式簡單說明】

【0008】

第 1 圖為顯示兔內前交叉韌帶(ACL)橫切研究中形態總體評估之圖(動物之數目=12/組；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 對 PBS)。

第 2 圖為在兔子之 ACL 橫切研究中，股骨髁部之組織學發現(番紅 O/固綠(Fast green))。

第 2A 圖為來自磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)群之典型檢體。

第 2B 圖為來自 1%透明質酸鈉溶液(1%HA-Na)群之典型檢體。

第 2C 圖為來自 1 次注射經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)群之典型檢體。

第 2D 圖為來自 2 次注射 HA-凝膠群之典型檢體。

第 3 圖為顯示在大鼠中 HA-凝膠對於緩激肽所誘發之關節炎疼痛之鎮痛作用之圖(以 PBS、經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)或 1%HA-Na 治療之群之疼痛計分。數值以平均值 $\pm$ 標準偏差表示。N=12/群；*P<0.05，**P<0.01 對 PBS)。

第 3A 圖為顯示注射緩激肽前 1 週經由關節內投與之 HA-凝膠之鎮痛作用之圖。

第 3B 圖為顯示注射緩激肽前 2 週經由關節內投與之 HA-凝膠之鎮痛作用之圖。

第 3C 圖為顯示注射緩激肽前 4 週經由關節炎內投與之 HA-凝膠之鎮痛作用之圖。

第 4 圖為顯示硝酸銀所誘發之關節炎疼痛模型中經 PBS、HA-凝膠或 1%HA-Na 治療之群之負重率之圖(數值以平均值 $\pm$ 標準偏差表示。N=10/群；*P<0.05，**P<0.01 對 PBS)。

第 5 圖為顯示硝酸銀所誘發之關節炎疼痛模型中經 PBS、HA-凝膠或 1%HA-Na 治療之群之疼痛分數之圖(數值以平均值 $\pm$ 標準偏差表示。N=10/群)。

第 6 圖為顯示尿酸單鈉所誘發之關節炎性關節疼痛模型中異

常步伐分數改變之圖(MSU 注射前 0.5 小時經由關節內投與生理食鹽水、經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)或 1%HA-Na。數值以平均值±標準偏差表示。N=12/群)。

第 7 圖為顯示尿酸單鈉所誘發之關節炎性關節疼痛模型中異常步伐分數改變之圖(MSU 注射前 72 小時經由關節內投與生理食鹽水、經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)或 1%HA-Na。數值以平均值±標準偏差表示。N=12/群)。

第 8 圖為顯示在膝之滑液中 HA-凝膠之殘留比率之圖(數值以平均值±標準偏差表示。於每時點，N=5(10 個關節)/群；**P<0.01 對 int-HAD)。

第 9 圖為顯示在膝之滑膜中 HA-凝膠之殘留比率之圖(數值以平均值±標準偏差表示。於各時點，N=5(10 個關節)/群；*P<0.05，**P<0.01 對 int-HAD)。

第 10 圖及第 11 圖為顯示木瓜蛋白酶所誘發之關節炎模型中以經交聯之透明質酸鹽凝膠治療之群及以 PBS 治療之群之形態總評估之圖。

【實施方式】

【0009】下文藉由具體實施例及方法詳細說明本發明。此等詳細說明僅係例示所揭示之發明及所申請之專利範圍，絕非意圖限制本發明之範圍，本發明之範圍由隨附之編號申請專利範圍特定及明白請求。

【0010】在本說明書中，「骨關節炎」、「透明質酸」及「透明質酸鈉」被分別簡稱為「OA」、「HA」及「HA-Na」，以及可作為間隔基之化合物被稱為「間隔基化合物」。

【0011】在本發明中所使用之經交聯之透明質酸衍生物或經交聯之透明質酸化合物(下文稱為經交聯之 HA 衍生物)具有經由共價鍵結於 HA 之交聯基之分子內交聯或分子間交聯所形成之經交聯之結構。該經交聯之結構使得經交聯之 HA 衍生物成為三度空間網狀結構，藉此經交聯之 HA 衍生物溶於水性介質之溶液具有黏彈性水膠之物理性質。該溶液具有高於相同濃度之 HA 溶液之黏度。

【0012】經交聯之 HA 衍生物可為未形成鹽之游離形式或醫藥上可接受之鹽。例如經交聯之 HA 衍生物之醫藥上可接受之鹽，包括鈉鹽、鉀鹽、鎂鹽、鈣鹽等。

【0013】本發明所使用之透明質酸未特別限於糖胺聚醣，該糖胺聚醣以雙醣單元作為基本核心結構且藉由重覆該雙醣單元之 β 1,4 鍵結而構築成，其中，該雙醣單元由 N-乙醯基-D-葡萄糖胺與 D-葡萄糖醛酸經由 β 1,3 鍵結而構成；糖胺聚醣即通常所使用之透明質酸(HA)。

【0014】所使用之 HA 可為未形成鹽之游離形式或醫藥上可接受之鹽。HA 之醫藥上可接受之鹽包括與鹼金屬離子形成之鹽諸如鈉鹽、鉀鹽；與鹼土金屬離子形成之鹽諸如鎂鹽及鈣鹽；與無機鹼形成之鹽諸如銨鹽，以及與有機鹼諸如二乙醇胺、環己胺及胺基酸形成之鹽。HA 鹽較佳為與鹼金屬離子形成之鹽，尤其是與鈉離子形成之鹽，因為其對於活體具有高度親和性。

【0015】所用之 HA 可從自活生物體(諸如雞冠、臍帶、軟骨、皮膚等)之部分物質萃取而得之天然產物衍生。其亦可藉由化學合成或在微生物諸如酵母菌中藉由遺傳工程而製造。就作為藥物而

言，以使用具有高純度且實質不包括不可接受之雜質之 HA 為較佳。

【0016】HA 之重量平均分子量無特殊限定，例如可為 10,000 至 5,000,000。例如以 200,000 至 3,000,000 為較佳，以 500,000 至 2,500,000 為更佳。

【0017】在本發明中所用之交聯形式較佳為利用共價鍵結之交聯形式，因為其具有良好的鍵結安定性。

【0018】本發明所使用之交聯基，例如，以光反應性交聯基(即具有光反應性殘基之交聯基)為較佳，該光反應性交聯基可選自能藉由照射光線(紫外線)而進行光二聚反應或光聚合反應之化合物之任何殘基。舉例言之，作為該化合物之殘基者，例如有桂皮酸、經取代之桂皮酸、丙烯酸、馬來酸、富馬酸、山梨酸、香豆素(coumarin)、胸腺嘧啶等之殘基。在此等化合物之中，較佳為具有藉光照射能形成環丁烷環之伸乙烯基之化合物，且從光反應性及對活體之安全性之觀點而言，以桂皮酸或經取代之桂皮酸為更佳。

【0019】經取代之桂皮酸可以桂皮酸衍生物等為例，其中，在桂皮酸之苯環之任何位置之 1 或 2 個氫原子被具有 1 至 8 個碳原子之低碳烷基(例如甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基及第三丁基等)、具有 1 至 8 個碳原子之低碳烷氧基(例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基及丁氧基等)、胺基、羥基及類似基置換，該桂皮酸衍生物較佳為胺基桂皮酸及對-胺基桂皮酸。

【0020】本發明所使用之經交聯之 HA 衍生物對於身體內部的代謝環境，諸如 pH、離子強度及溫度等，必須具有適當的耐受

性，該適當的耐受性有助於在投與部位使作用持續長時間或連續長時間。較佳藉由醯胺鍵結將為交聯基之化合物殘基導入 HA 之羧基，因為醯胺鍵結在酸性或鹼性條件下對於水解有較佳的耐受性。

【0021】上述光反應性交聯基亦可經由具有胺基(被稱為間隔基)之化合物之殘基導入 HA 之羧基。此外使用間隔基可以改良交聯基與 HA 間之反應及光交聯反應。

【0022】在本發明中用作間隔基之化合物無特殊限定，只要其為具有至少一個胺基及能與光反應性交聯基鍵結之官能基之化合物即可，此等化合物例如較佳為胺烷基醇類、二胺類、胺基酸類及肽類等。慮及期望經交聯之 HA 衍生物於關節內投與期間對於代謝降解具抗性及適當保留其性質，例如以具有 2 至 18 個碳原子之胺烷基醇類為較佳，以具有 2 至 12 個碳原子之胺烷基醇類為更佳。特佳之例子為胺基戊醇、胺基丁醇、胺基丙醇及胺基乙醇，因為該等於交聯反應時給予 HA 與光反應性交聯基間適當的距離。

【0023】在本說明書中除非另有指示，交聯基可包括導入之間隔基化合物之殘基之交聯基，所以光反應性交聯基亦可包括導入之間隔基化合物之殘基之光反應性交聯基。已形成交聯結構之交聯基偶而被稱為經交聯基，尚未被交聯之交聯基有時稱為可交聯基。

【0024】合成本發明之經交聯之 HA 衍生物之方法無特殊限定，只要為可使 HA 與含交聯基之化合物經由醯胺鍵而化學鍵結之方法即可，例如使用諸如水溶性碳化二亞胺(例如 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDCI·HCl)、1-環己基-3-(2-(4-

甲基嗎啉鎗-4-基)乙基)碳化二亞胺-對甲苯磺酸鹽及 1-環己基-3-(2-嗎啉-4-基乙基)碳化二亞胺鹽酸鹽等)之水溶性縮合劑之方法；除了使用上述縮合劑，尚使用助縮合劑諸如 N-羥基琥珀醯亞胺(HOSu)及 N-羥基苯并三唑(HOBt)之方法；使用縮合劑諸如 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡-2-基)-4-甲基嗎啉鎗氯化物(DMT-MM)等之方法；活性酯化方法；酸酐方法及類似方法。此外，當使用已導入間隔基之交聯基作為交聯基時，該法可為事先將間隔基化合物導入 HA，然後將交聯基導入該連結有間隔基之 HA 之方法；或者事先將間隔基導入交聯基，然後將連結有間隔基之交聯基導入 HA 之方法。

【0025】之後，為了簡化代表，藉由上述方法所產生之連結有交聯基之 HA 衍生物在未建構成經交聯結構時，偶而被稱為未經交聯之產物或未經交聯之化合物。

【0026】將未經交聯之產物予以交聯之方法無特殊限定，只要係藉由交聯基間之反應形成經交聯結構之方法即可。

【0027】例如，在使用含光可交聯基之未經交聯產物之情況，較佳採用以光均勻地照射溶有未經交聯產物之溶液之方法。

【0028】雖然 HA 在水性介質中具有良好的溶解性，但在透明質酸衍生物內間隔基化合物被導入透明質酸所具有之羧基(該羧基賦予透明質酸親水性質)之情況，當取代度增加時，親水性質會降低。

【0029】所以，上述合成未經交聯產物之方法較佳包含下述之方法：包括進行鹼處理以增進未經交聯產物在水性介質中之溶解度之步驟。

【0030】鹼處理之方法沒有限定，只要其為使溶液變成鹼性之處理即可。所用之鹼劑可為有機鹽或無機鹽之形式。若考量在水性溶劑中處理，以使用無機鹼鹽為較佳。在此等無機鹼鹽中，弱鹼鹽諸如碳酸氫鈉及碳酸鈉比強鹼鹽諸如氫氧化鈉更適合使用，因為此等弱鹼鹽對於連結有交聯基之透明質酸衍生物轉變成低分子量化合物或交聯基之分解的影響較少。在此處，鹼處理通常可於 7.2 至 11 之 pH 值進行，較佳於 7.5 至 10 之 pH 值進行。所用鹼之量及鹼處理時間可視目標親水性質而適當地控制。例如，相對於每 1g 透明質酸，使用量為 500 mg 之碳酸氫鈉(即為透明質酸莫耳數之 10 倍以上莫耳量)時，鹼處理可於攪拌下進行 2 至 3 小時，藉此得到具有充分增加之親水性質之未經交聯之化合物。藉由上述方法得到之未經交聯之衍生物之 1.0 重量%溶液，於 24 °C 及 5.0 Kg/cm² 之壓力下能以不低於 2 mL/分鐘之速率通過具有 0.45 μ m 之孔尺寸及 25 mm 之直徑之多孔濾器。

【0031】未經交聯之產物之光線照射(光照)較佳於能使光反應性交聯基有效進行光二聚反應或光聚合反應之條件下施行。

【0032】所用光之波長及種類無特殊限定，只要光係選自所具波長能使光反應性交聯基進行光反應而不會使透明質酸之糖苷鍵斷裂者即可。例如，當所用之交聯基為桂皮酸或桂皮酸衍生物，以具有 200 至 600 nm 之波長之紫外光為較佳。所照射光之整體特性視期望的產物性質、期望的取代度、未經交聯產物溶液之濃度等而適當地選擇。關於較佳的光源，可以使用紫外燈、高壓水銀燈或金屬鹵化物燈。若需要，較佳可藉由例如濾光器將不要的波長從光源中除去。

【0033】本發明之經交聯之 HA 衍生物具有：藉著經由與 HA 共價鍵結之交聯基而行分子內交聯或分子間交聯所形成之經交聯結構。該經交聯結構使得經交聯之 HA 衍生物成為三度空間網狀結構，藉此經交聯之 HA 衍生物之溶液具有黏彈性水膠(具有黏性及彈性)之物理性質。該物理性質受到諸如交聯基之取代度、交聯度(degree of cross linking)、交聯反應時可交聯化合物之濃度等決定因子影響。所以將此等因子設定在適當範圍頗為重要。

【0034】此等適當範圍可視期望的產物性質而適當地決定。例如，本發明之交聯基之取代度，以 HA 之構成雙醣單元之總數為基準計，較佳為 3%至 50%，更佳為 5%至 30%，特佳為 10%至 25%。交聯反應時反應溶液之較佳濃度，以溶液之總重為基準計，例如為 0.5%至 10%，更佳為 0.7%至 2%。交聯度，以構成交聯基之總數為基準計，例如較佳為 5%至 40%，更佳為 7%至 35%，特佳為 10%至 30%。

【0035】此外，取代度(DS)可由 HA 之每個構成雙醣單元中交聯基之導入比率(%)算出，例如，每個構成雙醣單元具有 1 個交聯基之未經交聯化合物或每 200 個醣單元具有 1 個交聯基之未經交聯化合物之 DS 分別為 100%或 1%。

【0036】交聯度可由經交聯之基團與所導入之交聯基之比(%)計算出。例如在 HA 衍生物具有 100 個交聯基之情況，若 20 個交聯基(單體)反應形成 10 個二聚體，則交聯度為 20%。

【0037】一般皆同意若為溶質之經交聯透明質酸衍生物與介質(溶劑)相較為過量且在經交聯之透明質酸衍生物中有過多的架橋形成，則難以得到具有中度流動性之水膠溶液。

【0038】爲了藉由注射針進行關節內投與，本發明之經交聯之 HA 衍生物必須具有中度流動性。同時亦需要對於身體內部的代謝環境具有適當的耐受性以及在投與部位具有適當的駐留能力。所以太低的 DS 或交聯度較不宜。因此黏度與彈性之平衡頗爲重要。

【0039】依照上述條件設計之經交聯之 HA 衍生物之溶液可爲能通過 18 號至 25 號針之可注射溶液且可用作關節內投與用之注射溶液。

【0040】例如，從交聯程度(cross-linking extent)(爲 DS 與交聯度之乘積且以 HA 之每個構成雙醣單元中交聯基之二聚物之莫耳比(%)表示)之觀點而言，本發明之經交聯之 HA 衍生物具有之交聯程度，以 HA 之構成雙醣單元之總數爲基準計，較佳在 0.6%至 15%之範圍內，更佳在 1.0%至 7.5%之範圍內。

【0041】如下述實施例所示，就一治療週期而言，本發明之經交聯之 HA 衍生物藉由單次注射而非藉由一系列(3 至 5 次)之注射即可顯示更顯著的鎮痛作用。與單獨的 HA 溶液相比，其亦顯示保持較長時間的鎮痛作用，以及對於急性疼痛與慢性疼痛二者，其皆顯示有效且持續長時間或連續長時間的鎮痛作用。再者，其亦可藉由單次注射長時間提供對於滑膜之消炎作用及軟骨保護作用。

【0042】根據本發明，可以提供用於治療關節失調之供關節內投與之注射溶液及醫藥組成物，其中，該關節失調包括 OA、外傷性關節炎、發炎性關節失調、退化性關節失調等。該注射溶液包括作爲活性成分之本發明之經交聯透明質酸衍生物以及醫藥上

可接受之載劑；同樣地，該醫藥組成物包括作為活性成分之本發明之經交聯透明質酸衍生物以及醫藥上可接受之載劑。

【0043】關於醫藥上可接受之載劑，可列舉本發明之經交聯之 HA 衍生物之溶液所採用之水性介質。其例有注射用水、生理食鹽水及經磷酸鹽緩衝之食鹽水。注射所常用之添加劑諸如 pH 調整劑及張力劑亦可接受，除非本發明之注射溶液及醫藥組成物喪失期望的療效及產生副作用。此等添加劑之例有磷酸二氫鈉、磷酸氫二鈉及氯化鈉。

【0044】該注射溶液及醫藥組成物在治療期間藉由比市售 IA-HA 產品之劑量數(即治療期間一系列(3至5次)之注射)少之劑量數即可充分有效。

【0045】亦可提供套組，其包括充填有本發明之經交聯之 HA 衍生物溶液之注射器，若需要，該注射器可裝設柱塞泵、柱塞桿等。

【0046】根據上述方法及條件所產生之經交聯之 HA 衍生物可用於注射溶液及醫藥組成物。注射溶液或醫藥組成物用之較佳經交聯 HA 在交聯方面具有下列參數：

交聯程度為 0.6%至 15%且取代度為 3%至 50%；

交聯程度為 0.6%至 15%且交聯度為 5%至 40%；

取代度為 3%至 50%且交聯度為 5%至 40%；

交聯程度為 0.6%至 15%，取代度為 3%至 50%且交聯度為 5%至 40%；或

交聯程度為 1%至 7.5%，取代度為 10%至 25%且交聯度為 10%至 30%。

【0047】本發明之藥劑所治療之疾病無特殊限定，其可用作減輕關節失調所引起之關節疼痛、壓制關節失調所引起之滑膜發炎、壓制關節失調所引起之軟骨退化以及改善關節的運動範圍之治療劑。此外，本發明之藥劑不僅可用於治療，亦可用於預防上述疾病。

【0048】注射溶液或醫藥組成物之劑量無特殊限定，因其係應根據待治療之病患之特殊症狀、年齡、體重等而個別決定之事項。

【0049】一次投與時成年病人(50 至 70kg)之一般劑量範圍，以 HA 衍生物計，較佳為，例如，15 mg 至 60 mg，更詳細言之，例如 0.3 mg/公斤至 1.2 mg/公斤。注射溶液之較佳濃度，以溶液之總重為基準計，例如為 0.5%至 3.0%，更佳為 0.7%至 2.0%(連結有交聯基之 HA 衍生物)。注射溶液之用法，就一療程而言，較佳為，例如，單次注射或二次注射。醫藥組成物之可注射形式亦同樣。

【0050】本發明之注射溶液及醫藥組成物之可注射形式之較佳具體例之一可列舉於下：

經交聯之 HA 衍生物之性質如下：

HA 之重量平均分子量：500,000 至 2,500,000，

交聯基化合物：桂皮酸或桂皮酸衍生物，

間隔基化合物：胺基烷醇，以胺基戊醇、胺基丁醇、胺基丙醇或胺基乙醇為更佳，

交聯基之 DS：10%至 25%，以及

交聯度為 10%至 30%。

介質：食鹽水、磷酸鹽緩衝之食鹽水或注射用水，

經交聯之 HA 衍生物之溶液之濃度：0.7%至 2.0%。

【0051】溶液之性質：在相同的濃度條件下，具有比 HA 溶液高的黏彈特性及比 HA 溶液高的線形成能力(thread-formability)，且當於 24°C 以 0.2 ml/秒之速率從注射針擠出時，能通過 18 至 25 號針。

【0052】再者，交聯程度較佳在例如 1.0%至 7.5%之範圍內。其具有中度的流動能力，例如，1 重量%(以連結有交聯基之 HA 計算)之經交聯之 HA 衍生物凝膠，當於 24°C，在從水平方向向下 45°之方向以 0.2 ml/秒之速率從注射針擠出時，從 23 號注射針之針尖開放端可形成具有不小於 3 cm 之長度之連續線而不斷裂。

【0053】在本發明中，包括經交聯之 HA 衍生物之水膠狀態溶液例如在美國專利第 6,602,859 號中被提及，其內容以參考文獻方式納入本文。

實施例

【0054】本發明依據實施例更特定地說明於下。不過，無意藉此限定本發明之技術範圍。

<合成例>

【0055】將 400 mg 之具有 900,000 之重量平均分子量之透明質酸鈉(由 SEIKAGAKU 公司製造)與含有水及二噁烷之混合溶液於攪拌下混合。在生成之溶液中於室溫接續地混入 34 mg N-羥基琥珀醯亞胺(HOSu)/1 ml 水(0.6 當量/HA 雙醣單元(莫耳/莫耳))；29 mg 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDCI·HCl)/1 ml 水(0.3 當量/HA 雙醣單元(莫耳/莫耳))；51 mg 桂皮酸 4-(6-胺基己醯胺)乙酯鹽酸鹽/1 ml 水(0.3 當量/HA 雙醣單元(莫耳/莫耳))。將

生成之混合物攪拌 3 小時。將得到之混合物與 200 mg 碳酸氫鈉/3 ml 水進一步混合，攪拌 2 小時，繼而與 400mg 氯化鈉混合。將乙醇加入生成之反應溶液中以沉澱固體。將得到之固體依序用 80%(體積/體積)乙醇及乙醇清洗，繼而於室溫乾燥整夜，由此得到 360mg 之白色固體(結合有桂皮酸 4-(6-胺基己醯胺)乙酯之透明質酸)。以下將「結合有桂皮酸 4-(6-胺基己醯胺)乙酯之透明質酸」簡稱為 int-HAD 1。

【0056】再者，除了如下述改變 N-羥基琥珀醯亞胺(HOSu)、EDCI·HCl 及桂皮酸酯衍生物之當量外，進行與上述相同之步驟，由此得到具有彼此不同的導入百分比(取代度)之 int-HAD。

(int-HAD 2) HOSu、EDCI·HCl 及桂皮酸 3-胺基丙酯鹽酸鹽分別為 0.2、0.10 及 0.10 莫耳/莫耳 HA 雙醣單元。

(int-HAD 3) HOSu、EDCI·HCl 及桂皮酸 4-胺基丁酯鹽酸鹽分別為 1.0、0.5 及 0.5 莫耳/莫耳 HA 雙醣單元。

(int-HAD 4) HOSu、EDCI·HCl 及桂皮酸 5-胺基戊酯鹽酸鹽分別為 1.4、0.7 及 0.7 莫耳/莫耳 HA 雙醣單元。

(int-HAD 5) HOSu、EDCI·HCl 及桂皮酸 8-胺基辛酯鹽酸鹽分別為 0.6、0.3 及 0.3 莫耳/莫耳 HA 雙醣單元。

(int-HAD 6) HOSu、EDCI·HCl 及桂皮酸 3-胺基丙酯鹽酸鹽分別為 0.2、0.10 及 0.10 莫耳/莫耳 HA 雙醣單元。該 int-HAD 6 係藉由製備 int-HAD 2 之相同方法製備，不過桂皮酸 3-胺基丙酯之交聯度低於 int-HAD 2 之交聯度。

【0057】繼而，將得自上述(int-HADs 1 至 6)之導入桂皮酸衍生物之透明質酸分別溶解於 5mM 磷酸鹽緩衝生理食鹽水，以使所

得溶液之濃度，以透明質酸計算，成為 1.0 重量%。

【0058】繼而將得到之溶液分別用紫外線照射 20 至 40 分鐘。藉由紫外線照射使此等溶液變成凝膠形式(水膠)。以下將得到之凝膠稱為經交聯之透明質酸鹽凝膠。

【0059】以下實驗研究中之「經交聯之透明質酸鹽凝膠」(本文中有時稱為 HA-凝膠)係一種將藉由上述合成例所製備之 int-HAD 之 1.0%溶液經紫外光線照射而成之凝膠。在以下實驗研究中使用之「1%透明質酸鈉溶液(1%HA-Na)」為 SEIKAGAKU 公司所製造之 SUPARTZ[®](本文中有時稱為 HA-Na)。

【0060】經交聯之透明質酸鹽凝膠及 1%透明質酸鈉溶液(1%HA-Na)均使用衍生自雞/雞冠(chicken/rooster comb)之透明質酸。

實施例 1：在兔子體內經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)之關節內注射對於前交叉韌帶(Anterior Cruciate Ligament) (ACL)橫切所造成之關節炎之影響

目的

【0061】使用於本研究之兔 ACL 橫切模型已被接受為關節炎模型，其造成類似人類 OA 之軟骨降解。因此，此種模型已經常被用於評估透明質酸類製劑(SUPARTZ[®]、HYALGAN[®]、HEALON[®]、SYNVISC[®])。

【0062】本研究之目的係測定 HA-凝膠在 ACL 橫切模型中之效力。

方法

【0063】在 48 隻雄性兔中藉由橫切單側 ACL 誘發實驗性骨

關節炎(OA)。ACL 橫切後四週，將 HA-凝膠以每個關節 0.05mL/kg 之劑量投與至左後膝蓋之關節腔內共計一次或兩次(相隔二週)。將其效力與每週重複投與 PBS 或 1%透明質酸鈉溶液(1%HA-Na)一次共計五週之效力比較。在 ACL 橫切後九週將所有動物放血至死。繼而將左後膝蓋移出並藉由下述測定進行評估：軟骨退化之形態學評價、滑液體積及蛋白質含量、做為滑膜炎之指標之浸潤細胞數目及滑液中糖胺聚糖含量、以及供軟骨及滑膜組織病理學檢查之股骨髁部(femoral condyle)之番紅 O (safranin O)染色。

【0064】對於所有受試物質，注射體積均被設定為相同。

結果

【0065】在形態學評價中，評價各個動物在兩個部位(股骨髁部及脛骨平台(tibial plateaus))之改變，且將各組總計 24 個部位依據下列標準予以分級：

等級 1：表面完整無缺(未被印度墨水(Indian ink)染色)

等級 2：少許纖維化(表面殘留墨水如延伸之污斑)

等級 3：明顯纖維化

等級 4：侵蝕度(軟骨喪失而暴露其下骨頭)

4a：0mm<侵蝕度 $\leq$ 2mm (長度)

4b：2mm<侵蝕度 $\leq$ 5mm (長度)

4c：5mm<侵蝕度 (長度)

4d：5mmx2mm<侵蝕度(長度 x 寬度，以 mm 計)

【0066】在形態學評價中，在 HA-凝膠群組中之軟骨退化比 1%HA-Na 群組低(第 1 圖)。事實上，在一次及二次注射之 HA-凝膠群組中，與注射 PBS 五週之對照組相較，關節軟骨之退化明顯

較低。再者，若慮及注射次數，則 HA-凝膠清楚地顯示比 1%HA-Na 更能減少關節軟骨之退化。相對地，與 PBS 相較，1%HA-Na 投與減少軟骨退化，但其效力不明顯。關於嚴重度，此等受試物質間之比較如下：PBS>1%HA-Na >注射一次 HA-凝膠≥注射二次 HA-凝膠。HA-凝膠抑制軟骨退化之效力亦可由降低滑液中軟骨素-6-硫酸鹽(CS-6S)之增加而顯示。再者，從滑液、蛋白質及軟骨素-4-硫酸鹽(CS-4S)含量之增加呈現降低可以判定 HA-凝膠顯然可以改善滑膜炎之症狀。

【0067】再者，據報導滑液中之 CS-6S 係源自軟骨，而滑液中之 CS-4S 係因滑膜發炎而經由血管釋放。換句話說，降低 CS-6S 之增加意指預防軟骨退化，且降低 CS-4S 之增加意指預防滑膜發炎。

【0068】在第 2 圖中，(A)為來自 PBS 群組之典型試樣，(B)為來自 1%HA-Na 群組之典型試樣，(C)為來自一次注射 HA-凝膠群組之典型試樣，(D)為來自二次注射 HA-凝膠群組之典型試樣(原圖放大 x40)。

【0069】番紅 O 染色表示軟骨中之糖胺聚糖(GAGs)含量(GAGs：紅；骨頭及膠原纖維：綠)。

【0070】進行下列觀察並評分：未被番紅 O 染色/減少染色之軟骨基質之面積，軟骨基質中裂縫之形成，軟骨基質之纖維化，軟骨之缺陷，軟骨細胞數目之增加，軟骨細胞數目之減少，軟骨下骨頭之重建及軟骨基質中之血管侵入。關於嚴重度，此等受試物質間之比較如下：PBS>1%HA-Na >注射一次 HA-凝膠>注射二次 HA-凝膠。

【0071】總之，既然當滑膜炎不嚴重時軟骨退化較溫和，此等藉由 HA-凝膠誘發之改變可有益地交互作用，以減緩病理改變之進展。關節軟骨之組織病理學發現支持巨視評價(第 2 圖)。在滑膜炎之組織病理學檢查中，立方(cuboidal)/複層(stratified)滑膜上皮、皮下細胞滲透、皮下纖維化/水腫(edema)、皮下出血(hemorrhage)及皮下鈣堆積均在所有實驗群組中觀察到。此等改變在 HA-凝膠群中比在 PBS 群中不嚴重。

結論

【0072】此等數據顯示在 OA 之兔子 ACL 橫切模型中，投與 HA-凝膠一次或兩次(相隔 2 週)可抑制滑膜炎及軟骨退化二者。

實施例 2：在大鼠體內經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-Gel)之關節內注射對緩激肽(bradykinin)所誘發之關節炎疼痛之影響

目的

【0073】使用於本研究之關節炎疼痛模型為局部疼痛模型，其係藉由將緩激肽(一種內生性痛覺過敏(hyperalgesic)物質)與 PGE₂(一種疼痛增強劑)注射於大鼠之關節腔內而產生。該模型已被用於根據關節疼痛於步伐之行爲表現(例如「抬起腳」、「跛行」及「用三隻腳行走」)而評價透明質酸製劑之鎮痛作用。根據報導藉由此種模型所評價之鎮痛作用與在滑膜組織內透明質酸之濃度有相關性。

【0074】本研究之目的係檢測 HA-凝膠對於大鼠中緩激肽所誘發之關節炎疼痛之長期鎮痛作用，並與 1%HA-Na 及 PBS 比較。

方法

【0075】將測試物質以每關節 0.05mL 之劑量投與至雌性大

鼠左後腿之膝蓋關節腔。在投與後 1、2 及 4 週，將緩激肽(bradykinin) 溶液與 PGE2 之混合物注入相同關節以誘發關節炎疼痛。1%HA-Na 只在第 1 週時評估，既然此種治療典型地需要每週進行再注射 1 次。在盲目條件下，在注射緩激肽溶液後觀察動物之行走約 2 分鐘，並將疼痛之嚴重度在 5-點量表上計分(表 1)。

【0076】 表 1：由緩激肽(bradykinin)所誘發之關節炎疼痛模型：

給與疼痛分數之標準

分數	行為表現
0	正常或跛行≤5 秒
1	跛行 6 至 30 秒
2	呈現下列兩種表徵之一： 跛行≥31 秒 抬起腳≤5 秒
3	呈現下列兩種表徵之一： 抬起腳繼而跛行 以三條腿行走≤5 秒
4	以三條腿行走≥6 秒

結果

【0077】 與對照組比較，HA-凝膠在投與後 1、2 及 4 週之時間明顯地抑制緩激肽所誘發之疼痛反應(第 3 圖)。在 1 週時藉由 HA-凝膠產生之鎮痛作用比藉由 1%HA-Na 產生者顯著。

結論

【0078】 由此證明與做為陽性對照用之 PBS 及 1%HA-Na 相較，HA-凝膠投與至關節腔對緩激肽所誘發之關節炎疼痛更有效。與對照組相較，HA-凝膠提供持續至少 4 週之鎮痛作用。

實施例 3：在大鼠體內經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)之關節內注射對硝酸銀所誘發之關節炎疼痛之影響

目的

【0079】 本研究之目的為檢測在大鼠中 HA-凝膠對由硝酸銀所誘發之關節炎疼痛之疼痛舒緩作用。本模型已普遍地被使用做為許多非類固醇消炎藥物(NSAIDs)之鎮痛作用之評估。

方法

【0080】將 1%硝酸銀水溶液以每關節 0.05mL 之劑量注入 42 隻雄性大鼠左後腿之膝蓋關節腔中。在注射 24 小時後，依據動物步行及負重於發炎爪時之疼痛計分來分組。將疼痛嚴重性根據下列 4-點計分法進行評分：0 分表示正常或接近正常，1 分表示溫和跛行，2 分表示嚴重跛行及 3 分表示用三條腿步行。藉由使用重量活動性鎮痛計(weighting activity analgesia meter)(Tokken 公司製造)測量負重。將 HA-凝膠、1%HA-Na 或 PBS 以每關節 0.05mL 之劑量投與。在投與後第 1、2 及 3 日，以與上述相同之方式評價負載於發炎爪上之重量及疼痛計分。所評估之項目為負重率(%)=(在發炎之爪上之荷重(g)/體重(g)×100)及步行時之疼痛計分。

結果

【0081】在測試物質之投與後第 1 至 3 日之各個時點，在投與 HA-凝膠之動物中，發炎爪上之負重率明顯地高於投與 PBS 或 1%HA-Na 者(第 4 圖)。此外，在各個量測之時點，HA-凝膠之疼痛計分低於 PBS 或 1%HA-Na(第 5 圖)。

結論

【0082】此等數據證明將 HA-凝膠投與至關節腔比 PBS 及 1%HA-Na 對發炎性關節疼痛更有效。

實施例 4：經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)對於尿酸單鈉所誘發之犬關節炎性關節疼痛之鎮痛作用

目的

【0083】滑液中尿酸單鈉(MSU)之微結晶之沉積加重人類之急性發炎性關節疼痛。藉由關節內注射 MSU 結晶所誘發之實驗性

關節疼痛模型已被廣泛地用於評估透明質酸鈉及非類固醇消炎藥物之鎮痛作用。

【0084】本研究之目的為測定犬中 HA-凝膠對於 MSU 所誘發之關節疼痛之鎮痛作用。

方法

【0085】將 HA-凝膠、生理食鹽水或 1%HA-Na 以每關節 0.3 mL/kg 之劑量，經由關節內注射投與至雌性獵犬之左後肢之膝關節腔內。繼而於以受試物質治療 0.5 或 72 小時後，將尿酸單鈉 (MSU)，一種誘發發炎及嚴重疼痛之物質，注射於相同的關節。在注射 MSU 後 2、3、4、5、6 及 8 小時，評分步伐狀況並計算左後肢之重量承受率(weight-bearing rate)以做為關節疼痛指標。從此等指標計算時間曲線下面積(AUC)。

【0086】觀察步伐並根據下列標準將步伐狀況評分(做為不正常步伐計分)：0：未改變(正常步伐)，1：溫和(站立正常但步伐不自然)，2：中度(以四肢站立但經常提起左後肢(注射部位))，3：嚴重(當步行時只用左後肢尖端接觸地面)，及 4：非常嚴重(無法施加任何重量於左後肢；用三肢步行)。此外，三種秤用於載重量測：秤 A 為數位台秤(DP-6100GP；Yamato 尺度公司)；以及秤 B 及 C 為荷重元(load-cell)數位台秤(DP-6000；Yamato 尺度公司)。將前肢放置在秤 A 上，右後肢放置在秤 B 上，左後肢放置在秤 C 上。記錄所有三種秤上之值至接近 0.1kg。使用下列公式計算重量承受率：

$$\text{重量承受率} = 100 \times \text{平均 C} / (\text{平均 A} + \text{平均 B} + \text{平均 C})$$

結果

【0087】在測試物質治療 0.5 小時後注射 MSU 之實驗中，於經 HA-凝膠、生理食鹽水及 1%HA-Na 治療之群中，不正常步伐計分之平均 AUC 分別為 0.0、28.0 及 13.5(第 6 圖，表 2)。在所有治療之動物中，HA-凝膠呈現完全之鎮痛作用且未發現痛苦之行走。與生理食鹽水相較，1%HA-Na 亦呈現明顯之鎮痛作用，然而該作用明顯地低於 HA-凝膠。

【0088】在測試物質治療後 72 小時注射 MSU 之試驗中，經 HA-凝膠、生理食鹽水及 1%HA-Na 治療之群中異常步伐計分之 AUC 分別為 1.5、27.6 及 27.1(第 7 圖，表 3)。HA-凝膠依然呈現明顯之鎮痛作用，然而 1%HA-Na 對膝蓋關節疼痛之作用幾乎完全消失。

【0089】在此二實驗中，左後肢之重量承受率與該等之異常步伐計分一致。

【0090】表 2：尿酸單鈉所誘發之關節炎性關節疼痛模型：異常步伐計分之 AUC。

在 MSU 注射前 0.5 小時經關節內投與生理食鹽水、HA-凝膠及 1%HA-Na。

群	動物數目	異常步伐計分之 AUC
生理食鹽水(0.3mL/kg)	12	28.0±0.0
經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)(0.3mL/kg)	12	0.0**±0.0
1%HA-Na(0.3mL/kg)	12	13.5**.#±3.2

**p<0.01：與生理食鹽水明顯不同(Tukey-Kramer 多元比較測試)

##p<0.01：與經交聯之透明質酸鹽凝膠明顯不同(Tukey-Kramer 多元比較測試)

【0091】 表 3：尿酸單鈉所誘發之關節炎性關節疼痛模型：異常步伐計分之 AUC。

在 MSU 注射前 72 小時經關節內投與生理食鹽水、HA-凝膠及 1%HA-Na。

群	動物數目	異常步伐計分之 AUC
生理食鹽水(0.3mL/kg)	12	27.6±1.1
經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)(0.3mL/kg)	12	1.5**±4.5
1%HA-Na(0.3mL/kg)	12	27.1**±2.1

**p<0.01：與生理食鹽水明顯不同(Tukey-Kramer 多元比較測試)

##p<0.01：與經交聯之透明質酸鹽凝膠明顯不同(Tukey-Kramer 多元比較測試)

結論

【0092】 確認 HA-凝膠之單次關節內投與抑制 MSU 所誘發之關節炎性膝蓋關節疼痛。與 1%HA-Na 相較，HA-凝膠之鎮痛作用較優越且更為持久。

實施例 5：在兔體內膝蓋之關節腔及滑膜內之經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)之殘留比率

目的

【0093】 本研究之目的為調查在兔子體內關節內注射之 HA-凝膠之局部殘留。

方法

【0094】 將 HA-凝膠及其未經交聯之中間體(int-HAD)以 0.05mL/kg/關節之劑量投與至雄兔之左邊及右邊膝蓋關節腔(HA-凝膠及 int-HAD 之濃度：1%)。將動物在投與後第 1、3、5、7、14

及 28 日放血至死，並收集滑液及滑膜。經交聯之透明質酸鹽凝膠之殘留交聯劑，即反式桂皮酸(tCA)，藉由高效液相層析(HPLC)定量，以計算 HA-凝膠及 int-HAD 之殘留比率。

結果

【0095】從藉由 HPLC 量測之值計算殘留百分比。

【0096】關於從體外投與至關節腔之透明質酸鹽之代謝清除，一般已知為該透明質酸鹽從滑液逐漸移行至滑膜。

【0097】大部分 HA-凝膠在投與後 7 日內從滑液中消失，然而其在滑膜中殘留至 28 日。藉由比較 HA-凝膠及 int-HAD 之殘留比率，明顯地在投與後第 1、3 及 5 日於滑液中檢測到較高濃度之 HA-凝膠(第 8 圖)。根據第 8 圖，投與後第 3 日殘留於滑液中之 HA-凝膠約為所投與之 HA-凝膠之 15%。然而，在第 7、14 及 28 日滑膜中所殘留之經交聯透明質酸鹽凝膠之比率明顯較高(第 9 圖)。

結論

【0098】與未經交聯之透明質酸相較，所注射之 HA-凝膠殘留在滑液及滑膜中更長時間。另一方面，未經交聯之透明質酸快速地從滑液滲出，只有較低量殘留於滑膜中。因此，HA-凝膠可保持長期存在於關節中(例如在投與之部位)，因為其更緩慢地從滑液移行至滑膜，並且代謝比 int-HA 更為漸進。HA-凝膠殘留之增加可提供較優良之軟骨保護作用及持續長時間之鎮痛作用。

實施例 6：在兔子體內關節內注射經交聯之透明質酸鹽凝膠(HA-凝膠)對木瓜蛋白酶所誘發之關節炎之影響

【0099】本研究中使用之兔木瓜蛋白酶誘發之關節炎模型已

被接受為一種骨關節炎(OA)模型，其係藉由將木瓜蛋白酶(一種存在於木瓜中的半胱胺酸蛋白酶)注射於兔膝蓋關節腔而產生。

【0100】本研究之目的為測定 HA-凝膠在木瓜蛋白酶所誘發之關節炎模型中之功效。本研究進行兩次。

【0101】將兔(21 週齡，雄性)在用卡門(ketamine)進行全身麻醉(1mL/頭，i.v.)下以仰臥姿勢固定，並使用電剪剃去左後腿膝蓋關節附近之毛。將膝蓋關節之注射部位用 70%乙醇及 Isodine[®] 溶液消毒。

【0102】然後，將 0.8%木瓜蛋白酶溶液以每關節 500 μ L 之劑量投與至左後膝蓋之關節腔內，共計兩次(相隔 3 日)。

【0103】於本研究中使用總計 20 隻兔子，每組 5 隻。將木瓜蛋白酶溶液在即將注射之前藉由 L-半胱胺酸活化。

【0104】在第二次投與木瓜蛋白酶後一週，將 150 μ L 之受試物質(HA-凝膠或磷酸鹽-緩衝食鹽水(PBS))投與至左後腿之膝蓋關節腔，每週一次，共三週。

【0105】在最後投與測試物質後一週，將所有動物放血至死。繼而將左膝蓋關節移除，並從左膝蓋關節收集滑液及滑膜。

【0106】將左膝蓋關節藉由形態學檢查、滑膜及關節軟骨之組織病理學檢查、滑液體積及蛋白質含量進行評估。關於組織病理學檢查，石蠟切片(paraffin section)係從以福馬林固定之滑膜製成，並用蘇木紫-伊紅(HE)及亞路西安藍(alucian blue)染色。在以 EDTA 脫鈣及以番紅 O 染色後，觀察在股骨髁部及脛骨平台中之軟骨狀況。

【0107】在形態學評價中，根據實施例 1 之相同標準計分退

化嚴重度(第 10 及 11 圖)。與 PBS 相較，經交聯之透明質酸鹽凝膠減輕軟骨退化。然而，其效力並不明顯。研判為動物數目不足之故。

【0108】在軟骨之組織病理學檢查中，HA-凝膠減輕軟骨基質之退化，軟骨細胞之減少及番紅 O 染色之減低。

【0109】與 PBS 相較，使用於本研究之 HA-凝膠抑制軟骨退化。

【0110】使用於本研究之經交聯之透明質酸鹽凝膠之交聯程度分別為 1.72%(第 10 圖)及 2.06%(第 11 圖)，低於其他實施例研究中所用之 HA-凝膠。研判就達到改善關節疼痛及軟骨退化之明顯效力而言，交聯程度為必要因子。

(產業可利用性)

【0111】根據上述實施例，顯示在治療膝蓋 OA 時進行 HA-凝膠之關節內注射一次或兩次(相隔 2 週)具有相同或遠高於注射 HA-Na 五次之作用。同時確認 HA-凝膠在評估 NSAIDs 之動物模型中亦提供治療功效。

【0112】當將 HA-凝膠注射於膝蓋關節腔，大部分 HA-凝膠於 7 日內從滑液中消失。然而其殘留在滑膜中直到投與後 28 日。由於考慮到透明質酸在滑膜中之濃度與鎮痛作用相關，HA-凝膠之殘留增加利於持續長久之鎮痛作用。再者，HA-凝膠在 OA 患者中可望為良好之震動吸收體，而能舒緩疼痛並改善膝蓋功能，因為其具有比 HA-Na 溶液高的黏彈性。

【0113】由此提出一種關節疾病之治療劑，其具有下列優點：藉由單次注射可得到持續長時間的作用，一療程中劑量之次

數減少，及經由關節內投與時感染之風險降低。因此，對於關節失調病患之壓力可降低。

【符號說明】

無

公告本

發明摘要

※ 申請案號：102138965 (由96146443分割)

※ 申請日：96.12.6

※ IPC 分類：A61K 31/728 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

治療關節失調之長效藥劑

PHARMACEUTICAL AGENT HAVING LONG-LASTING EFFECT
OF TREATING ARTHRITIC DISORDERS

【中文】

本發明係關於用於治療關節失調之供關節內投與之注射溶液，其包含：

作為活性成分之經交聯之透明質酸衍生物，其中，該透明質酸之官能基之一部份與交聯基交聯至交聯程度達 0.6%至 15%之程度，且該經交聯之透明質酸之量具有持續長時間之鎮痛作用；以及

醫藥上可接受之載劑；

本發明亦關於用於減輕關節失調所造成之關節疼痛之鎮痛組成物，或用於抑制關節失調所造成之軟骨退化或滑膜發炎之組成物，各組成物包括經交聯之透明質酸衍生物及醫藥上可接受之載劑。

【英文】

The present invention relates to an injection solution for intra-articular administration for treating arthritic disorders comprising a cross-linked hyaluronic acid derivative wherein part of functional groups of a hyaluronic acid are cross-linked with a cross-linking group to the extent of 0.6 to 15% of cross-linking extent as an active ingredient in an amount having a long-lasting analgesic effect and a pharmaceutically acceptable carrier, and an analgesic composition for suppressing a cartilage degeneration caused by arthritic disorders or a composition for suppressing a cartilage degeneration or an inflammation of synovium caused by arthritic disorders each comprising the cross-linked hyaluronic acid derivative and a pharmaceutically acceptable carrier.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式

申請專利範圍

1. 一種含有經交聯之透明質酸衍生物之溶液，其中，該經交聯之透明質酸衍生物的透明質酸之官能基之一部份係以相對於透明質酸之構成雙醣單元總數的交聯程度為 1% 至 7.5% 之比率藉由交聯基交聯而成者，且

交聯基為桂皮酸或桂皮酸衍生物之殘基；

交聯基之取代度為 10% 至 25%；以及

在該經交聯之透明質酸衍生物中之交聯度為 10% 至 30%，

該交聯基與透明質酸之官能基之間之間隔基為胺基烷基醇之殘基，

透明質酸的官能基之一部份與間隔基係形成醯胺鍵結。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之溶液，其中，相對於該溶液總量，經交聯之透明質酸衍生物於該溶液中之濃度為 0.5 重量% 至 3.0 重量%。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之溶液，其中，相對於該溶液總量，經交聯之透明質酸衍生物於該溶液中之濃度為 1 重量%。
4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之溶液，其中，該溶液可通過 18 至 25 號注射針。
5. 如申請專利範圍第 3 項所述之溶液，其中，該溶液可通過 18 至 25 號注射針。