(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103120702 B
(45)授权公告日 2014.11.05

(21)申请号 201210562963.1
(22)申请日 2006.10.12
(30)优先权数据
2005-297170 2005.10.12 JP
2006-160478 2006.06.09 JP
(62)分案原申请数据
200680038019.9 2006.10.12
(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 高桥胜哉 下岛裕司
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
A61K 31/728(2006.01)
A61K 31/726(2006.01)
A61K 47/48(2006.01)
A61P 1/02(2006.01)

(56)对比文件
US 6602859 B2,2003.08.05,摘要,权利要求书.

审查员 张婷

权利要求书1页 说明书21页 附图19页

(54)发明名称

包含疏水基团结合型糖胺聚糖在制备预防或治疗角膜上皮层病症的药物中的用途

(57)摘要

本发明是包含疏水基团结合型糖胺聚糖在制备预防或治疗角膜上皮层病症的药物中的用途。提供了一种,即使较低频率给药也能够对粘膜中的病症如炎症和损伤持续发挥治疗效果的施用于粘膜的药剂,这是因为该药剂通过在粘膜上皮层表现高停留性而长时间停留在发病部位,所述施用于粘膜的药剂包含借助结合链引入疏水基团的糖胺聚糖(GAG)作为活性成分。

CN 103120702 B

1. 糖胺聚糖的用于制备预防或治疗口腔干燥的药物的用途，所述糖胺聚糖为借助结合链引入疏水基团的糖胺聚糖，其中，

所述糖胺聚糖为透明质酸或其盐；

所述疏水基团为芳链烯基；

所述结合链为 -CONH-；

在所述结合链和所述疏水基团之间存在间隔链，所述间隔链在疏水基团侧进一步具有结合链，所述间隔链为 $-COO-(CH_2)_m-$，其中 m 为 1 至 18 的整数；和

所述糖胺聚糖分子通过所述疏水基团彼此交联。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述疏水基团为苯乙烯基。

3. 根据权利要求 2 所述的用途，其中在疏水基团侧进一步具有结合链的所述间隔链为 $-COO-(CH_2)_6-$。

包含疏水基团结合型糖胺聚糖在制备预防或治疗角膜上皮层病症的药物中的用途

[0001] 本申请是国际申请日为 2006 年 10 月 12 日，申请号为 200680038019.9（国际申请号为 PCT/JP2006/320801），发明名称为“包含疏水基团结合型糖胺聚糖在制备预防或治疗角膜上皮层病症的药物中的用途”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含疏水基团结合型糖胺聚糖作为活性成分的施用于粘膜的药剂，及其制备方法。

背景技术

[0003] 通常，作为对粘膜病症如炎症和损伤具有治疗效果的物质，已知的有作为代表性糖胺聚糖（下文称为“GAG”）的透明质酸（例如，专利文件 1）。然而，在角膜、口腔和鼻腔中的粘膜，以及与外界接触的结膜，及在膀胱中的粘膜中，粘膜表面被分泌物和排泄物如泪液、唾液和尿冲洗，从而去除异物。因此，需要保持 GAG 固有的医疗效果并在这些粘膜组织中发挥高停留性的 GAG 衍生物。

[0004] 同时，通过将光交联基团如肉桂酸结合到透明质酸，并进一步对其进行碱处理使水溶性增加的光反应性透明质酸是已知的（例如，专利文件 2）。为了提供医疗材料如进行光交联的抗粘结材料，已提供了通过将光交联基团如肉桂酸结合到透明质酸的光反应性透明质酸，但该光反应性透明质酸并不旨在提高在粘膜组织中的停留性。

[0005] [专利文件 1] 日本公开未审专利公报 No. 平 -1-238530

[0006] [专利文件 2] 日本公开未审专利公报 No. 2002-249501

发明内容

[0007] 本发明要解决的问题

[0008] 本发明旨在提供施用于粘膜的药剂，该药剂在粘膜中发挥优良的停留性和药理作用。

[0009] 解决问题的手段

[0010] 作为为解决上述问题而深入研究的结果，本发明人发现，通过借助结合链将疏水基团结合到 GAG 的“疏水基团结合型 GAG”可用作施用于粘膜的药剂中非常优良的活性成分，这是因为，此 GAG 保持了 GAG 所固有的对粘膜病症如炎症和损伤的治疗效果，且当施用于粘膜上时表现出高停留性，从而完成了本发明。

[0011] 本发明涉及含有糖胺聚糖 (GAG) 的施用于粘膜的药剂，在该糖胺聚糖中借助结合链引入了疏水基团。

[0012] 发明效果

[0013] 本发明施用于粘膜的药剂即使低频率给药也能对粘膜病症如炎症和损伤持续发挥治疗效果，这是因为其可通过在粘膜中表现高停留性而长时间停留在发病部位。

附图说明

[0014] 图 1 是表示透光率光谱的图；

[0015] 图 2 是表示治愈面积百分比的图；

[0016] 图 3 是表示治愈面积的图；

[0017] 图 4 是表示治愈率的图；

[0018] 图 5 是表示治愈面积的图；

[0019] 图 6 是表示治愈率的图；

[0020] 图 7 是表示治愈面积的图；

[0021] 图 8 是表示治愈率的图；

[0022] 图 9 是表示治愈面积的图；

[0023] 图 10 是表示治愈率的图；

[0024] 图 11 是表示在兔角膜上皮剥除部位的停留性的图；

[0025] 图 12 是表示在兔角膜上皮剥除部位的停留性的图；

[0026] 图 13 是表示在用紫外线照射后眼球的照片的图；

[0027] 图 14 是表示在摘除的角膜中水蒸发量的图；

[0028] 图 15 是表示在去除的角膜中水蒸发量的图；及

[0029] 图 16 是表示在用于口腔干燥的模型仓鼠中水蒸发量比率变化的图；

[0030] 图 17 是表示治愈面积的图；

[0031] 图 18 是表示治愈率的图；

[0032] 图 19 是表示治愈面积的图；

[0033] 图 20 是表示治愈率的图。

具体实施方式

[0034] 以下，将通过进行本发明的最佳实施方式更详细地描述本发明。

[0035] 在此，烷基指具有所述数量碳原子的直链或支链的脂族烃基。链烯基指具有至少一个双键的具有所述数量碳原子的直链或支链的脂族烃基。炔基指具有至少一个三键的具有所述数量碳原子的直链或支链的脂族烃基。

[0036] 芳基指具有 6 至 20 个碳原子作为环构成原子的单环或多环芳烃基。杂芳基指具有 3 至 20 个碳原子和一个或多个选自氮、硫和氧原子的杂原子作为环构成原子的单环或多环芳烃基。

[0037] 芳烷基指被以上定义的芳基所取代的以上定义的烷基。芳 链烯基指被以上定义的芳基所取代的以上定义的链烯基。芳炔基指被以上定义的芳基所取代的以上定义的炔基。

[0038] 氨基酸基团指通过化学键从天然或合成的氨基酸失去羧基、氨基或羟基所衍生的基团。

[0039] 在此，”治疗”包括粘膜病症的预防、病情的控制（防止恶化）、改善（减缓）和疗法。该”粘膜病症”指粘膜所固有的形态、性质和功能以某种形式紊乱的状态。例如，该粘膜病症可包括诸如损伤、缺损、糜烂、炎症、溃疡和干燥的状态。

[0040] 作为活性成分包含于本发明的施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的GAG可为任何GAG，只要该GAG结合了衍生自具有水不溶性和油溶性的疏水化合物的具有疏水性的基团即可。该疏水基团借助结合链结合至GAG。如后面所述，并不需要GAG的所有组成单元都结合疏水基团。

[0041] 1)GAG

[0042] 包含于本发明施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的GAG，是具有由氨基糖和糖醛酸（或半乳糖）组成的二糖的重复长链结构的酸性多糖。该GAG的实例包括透明质酸、软骨素、硫酸软骨素、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和硫酸角质素，其中，优选透明质酸。这些GAG可为其药学上可接受的盐。该盐的实例包括钠盐、钾盐、镁盐和钙盐，其中，优选钠盐。因此，在本发明施用于粘膜的药剂中的GAG最优选透明质酸钠。GAG的来源不特别限定，GAG可源自动物或微生物，或化学合成。例如，当使用透明质酸钠时，可例举源自鸡冠花(cock's comb)的那些。GAG的分子量不特别限定，但其重均分子量优选200,000至3,000,000，更优选500,000至2,000,000，最优选600,000至1,200,000。当使用透明质酸或其药学上可接受的盐时，其重均分子量优选200,000至3,000,000，更优选500,000至2,000,000，最优选600,000至1,200,000。

[0043] 2)疏水基团

[0044] 在包含于本发明施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的GAG中的疏水基团为任何基团，只要该疏水基团衍生自具有水不溶性和油溶性的化合物即可。该基团的实例可包括具有2至18个碳原子的烷基、具有2至18个碳原子的链烯基、具有2至18个碳原子的炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、芳链烯基、芳炔基和氨基酸基团。

[0045] 具有2至18个碳原子的烷基可包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、叔戊基、异戊基、新戊基、正庚基、5-甲基己基、4,4-二甲基-戊基、1,1-二甲基-戊基和正辛基。其中，可优选包括具有2至6个碳原子的烷基如正丁基。

[0046] 具有2至18个碳原子的链烯基可包括乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-甲基-1-丙烯基、1-戊烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-庚烯-1-基和2-庚烯-1-基。其中，可优选包括具有具有2至6个碳原子的链烯基如1-丁烯基。

[0047] 具有2至18个碳原子的炔基包括乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-庚炔基、2-庚炔基和3-庚炔基。其中，可优选包括具有2至6个碳原子的炔基如1-丁炔基。

[0048] 芳基可包括基团如苯基、萘基、蒽基和菲基。

[0049] 杂芳基可包括基团如呋喃基、亚硫酰基、噻唑基、噁唑基、吡咯基、吡啶基、嘧啶基和吲哚基。

[0050] 芳烷基可包括基团如苄基、苯乙基、萘甲基和萘乙基。

[0051] 芳链烯基可包括基团如2-苯基-乙烯基和对氨基苯乙烯基。

[0052] 芳炔基可包括基团如2-苯基-乙炔基和对氨基苯基乙炔基。

[0053] 氨基酸基团可包括衍生自以下的基团：脂族氨基酸如甘氨酸、丙氨酸和β-丙氨酸；支链脂族氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸；芳族氨基酸如苯丙氨酸和酪氨酸；以及杂环氨基酸如色氨酸和组氨酸。

[0054] 这些疏水基团可用基团如羟基、羧基、氰基、氨基（其可用上述烷基单取代或二取

代）、硝基、氧和烷基羰氧基单取代或多取代。

[0055] 在上述疏水基团中，可优选包括为含芳基的疏水基团的芳基、芳烷基、芳链烯基和芳炔基，尤其优选包括用烷基羰氧基取代的芳链烯基和芳基。作为该芳链烯基，可具体使用苯乙烯基和对氨基苯乙烯基。作为芳基可优选使用基团如 $CH_3-(CH_2)_1-COO-$ 苯基（其中 1 表示 0 或 1 至 18 的整数）。

[0056] 这些疏水基团还可具有功能，例如由于在疏水基团中具有双键而带来的紫外线吸收能力，如由官能团如包含在疏水基团中的以上示例的苯乙烯基所示。例如，当将本发明施用于粘膜的药剂用作后面所述的滴眼液时，可通过使用具有紫外线吸收能力的官能团作为疏水基团而使该滴眼液具有有效吸收有害紫外线的功能。另外，例如，当将本发明施用于粘膜的药剂用于治疗角膜上皮层病症如角膜干燥（干眼症）、角膜结膜炎、浅层点状角膜炎 (SPK)、角膜上皮糜烂、角膜上皮缺失和角膜肿瘤时，可通过使用具有紫外线吸收能力的基团作为疏水基团来使该施用于角膜的对上述病症具有药理效果的药剂结合有效吸收有害紫外线的功能。作为具有紫外线吸收能力的基团，优选例如具有共轭双键的芳基链烯基，其由上述 2- 苯基 - 乙烯基和对氨基苯乙烯基示例。当将本发明施用于粘膜的药剂用于角膜病症时，优选将为本发明施用于粘膜的药剂的活性成分的“引入疏水基团的 GAG”配制为 0.1 重量％的水溶液，当通过后面实施例中描 述的方法测量紫外线透过率时，该水溶液阻断 70 至 100% 的波长 200 至 300nm 的紫外线的透射。具有紫外线吸收能力的该疏水基团可优选包括芳基链烯基如 2- 苯基 - 乙烯基和对氨基苯乙烯基。

[0057] 3) 结合链

[0058] 在包含于本发明施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的 GAG 中，上述 GAG 借助结合链结合至上述疏水基团。GAG 具有其为羧基、羟基或磺酸基 ($-SO_3H$) 的官能团作为侧链。因此，疏水基团可借助通过与这些官能团一起形成醚键、羧酸酯键、硫酸酯键、羧酸酰胺键或硫酸酰胺键而获得的结合链结合到 GAG。该结合链可具体包括 -CONH-、-COO-、-O-、$-SO_3-$ 和 $-SO_2NH-$。其中，可优选使用羧酸酰胺键 -CONH- 和羧酸酯键 -COO-，尤其优选使用羧酸酰胺键 -CONH-。

[0059] 4) 间隔链

[0060] 在包含于本发明施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的 GAG 中，疏水基团借助上述结合链结合到 GAG，间隔链可进一步存在于结合链和疏水基团之间。作为该间隔链，可使用任何链，只要该间隔链不完全失去 GAG 具有的药理效果即可。具体可包括 $-(CH_2)_m-$ 和 $-(CH_2)-(OCH_2)_n-$（其中 m 和 n 分别为 1 至 18 的整数）。

[0061] 这些间隔链可进一步在疏水基团侧具有与上述相同的结合链如 -CONH-、-COO-、-O-、$-SO_3-$ 和 $-SO_2NH-$。该在疏水基团侧具有结合链的间隔链可具体包括 $-COO-(CH_2)_m-$、$-COO-(CH_2)-(OCH_2)_n-$、$-CONH-(CH_2)_m-$ 和 $-CONH-(CH_2)-(OCH_2)_n-$。

[0062] 5) 具有疏水基团的比率

[0063] 在包含于本发明施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的 GAG 中，不必所有的 GAG 组成单元分别具有疏水基 团。以摩尔当量计的结合的疏水基团与以摩尔当量计的 GAG 的二糖重复单元的比率（下文称为”引入率”）可依据疏水基团的类型、所需疏水性的程度、施用施用于粘膜的药剂的粘膜病症的类型和给药部位等任选决定。例如，当使用可被取代的苯乙烯基作为疏水基团时，相对于以摩尔当量计的 GAG 的二糖重复单元引入优

选 5 至 30%，更优选 10 至 20% 的以摩尔当量计的疏水基团（在不形成后面所述的交联键的情况下）。

[0064] 6）交联形成基团

[0065] 在包含于本发明施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的 GAG 中，疏水基团可在 GAG 分子之间通过包含在该基团中的官能团形成交联键。作为能形成交联键的疏水基团，可使用任何基团，只要该疏水基团通过紫外线照射产生光二聚反应或光聚合反应，且与上面定义的相同即可。能形成交联键的疏水基团包括，例如苯乙烯基、对氨基苯乙烯基、乙烯基、2- 羧基乙烯基和戊烷 -1,3- 二烯基。希望这些基团借助包含羰基的结合链结合到 GAG。在这些疏水基团中，可尤其优选使用借助含羰基的结合链结合到 GAG 的苯乙烯基或对氨基苯乙烯基。

[0066] 在该引入能够形成交联键的疏水基团的 GAG 中，GAG 分子可通过标准方法进行光二聚反应或光聚合反应而彼此交联。例如，根据描述于日本公开未审专利公报 2002-249501 中的方法，可进行光二聚反应或光聚合反应。

[0067] 7）优选的 GAG 组成单元

[0068] 包含于本发明施用于粘膜的药剂中的借助结合链引入疏水基团的 GAG 的代表，可具体包括施用于粘膜的包含向其中引入以下官能团的 GAG 作为活性成分的药剂：

[0069] Ph-CH=CH-COO-$(CH_2)_m$-NHCO-；

[0070] Ph-CH=CH-COO-CH_2-$(OCH_2)_n$-NHCO-；

[0071] Ph-CH=CH-CONH-$(CH_2)_m$-NHCO-；

[0072] Ph-CH=CH-CONH-CH_2-$(OCH_2)_n$-NHCO-；

[0073] Ph-CH=CH-COO-$(CH_2)_m$-O-CO-；

[0074] Ph-CH=CH-COO-CH_2-$(OCH_2)_n$-O-CO-；

[0075] Ph-CH=CH-CONH-$(CH_2)_m$-O-CO-；

[0076] Ph-CH=CH-CONH-CH_2-$(OCH_2)_n$-O-CO-；

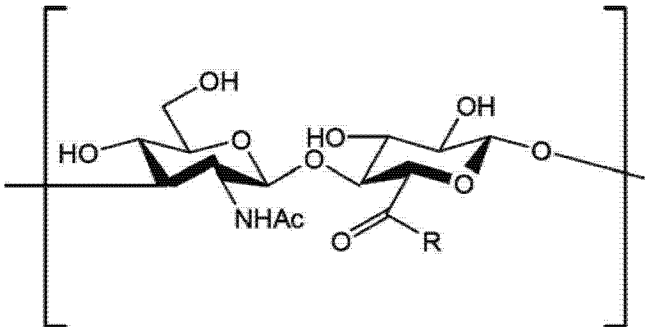
[0077] CH_3-$(CH_2)_1$-COO-Ph-CONH-$(CH_2)_m$-NHCO- 或 CH_3-$(CH_2)_1$-COO-Ph-CONH-CH_2-$(OCH_2)_n$-NHCO-（其中 Ph 表示苯基，m 和 n 分别表示 1 至 18 的整数，1 表示 0 或 1 至 18 的整数）。

[0078] 作为代表可包括以下 GAG。

[0079] 具有以化学式 1 表示的结构单元的重复单元作为基本骨架的 GAG：

[0080] [化学式 1]

[0081]



[0082] 其中，作为基本骨架，R 表示 R_1 或 R_2；

[0083] Ac 表示乙酰基；

[0084] R_1 表示 ONa 或 OH;

[0085] R_2 表示 (1)Ph-CH=CH-COO-$(CH_2)_m$-NH-;

[0086] (2)Ph-CH=CH-COO-CH_2-$(OCH_2)_n$-NH- ;

[0087] (3)Ph-CH=CH-CONH-$(CH_2)_m$-NH- ;

[0088] (4)Ph-CH=CH-CONH-CH_2-$(OCH_2)_n$-NH- ;

[0089] (5)Ph-CH=CH-COO-$(CH_2)_m$-O- ;

[0090] (6)Ph-CH=CH-COO-CH_2-$(OCH_2)_n$-O- ;

[0091] (7)Ph-CH=CH-CONH-$(CH_2)_m$-O- ;

[0092] (8)Ph-CH=CH-CONH-CH_2-$(OCH_2)_n$-O- ;

[0093] (9)CH_3-$(CH_2)_1$-COO-Ph-CONH-$(CH_2)_m$-NH- ;或

[0094] (10)CH_3-$(CH_2)_1$-COO-Ph-CONH-CH_2-$(OCH_2)_n$-NH-;

[0095] 其中,Ph 表示苯基,m 和 n 分别表示 1 至 18 的整数,1 表示 0 或 1 至 18 的整数,其中,以摩尔当量计的 R 代表 R_2 的上述结构单元与以摩尔当量计的 GAG 的二糖重复单元的比率为 5 至 30%。

[0096] 8) 制备借助结合链引入疏水基团的 GAG 的方法

[0097] 为了获得借助结合链引入疏水基团的 GAG,使 GAG 与其中上述疏水基团已结合到官能团如羟基、羧基、氨基或磺酸基的疏水化合物反应,这些官能团可与 GAG 中的羧基、羟基或磺酸基 (-SO_3H) 一同形成醚键、羧酸酯键、硫酸酯键、羧酸酰胺键或硫酸酰胺键。具体地,当该键为羧酸酰胺键时,使具有羧基的 GAG 与具有氨基的疏水化合物反应而将 GAG 中的羧基结合到疏水化合物中的氨基。在羧酸酯键的情况下,使 GAG 与具有羟基或羧基的疏水化合物反应而将 GAG 中的羧基结合到疏水化合物中的羟基,或使 GAG 中的羟基结合到疏水化合物中的羧基。在醚键的情况下,使具有羟基的 GAG 与具有羟基的疏水化合物反应而使 GAG 中的羟基与疏水化合物中的羟基反应。在磺酸酯键的情况下,使 GAG 与具有羟基或磺酸基的疏水化合物反应而将 GAG 中的羟基结合到疏水化合物中的磺酸基,或将 GAG 中的磺酸基结合到疏水化合物中的羟基。这些反应可通过通常的标准方法进行,反应条件可由本领域熟练技术人员任意选择。

[0098] 当间隔链存在于结合链和疏水基团之间时,将间隔链和疏水基团引入 GAG 的顺序不特别限定。例如,可采用下列任一方法 :使在上述间隔链一端具有可与 GAG 中的官能团一同形成醚 键、羧酸酯键、硫酸酯键、羧酸酰胺键或磺酸酰胺键的官能团如羟基、羧基、氨基或磺酸基的间隔化合物与 GAG 反应,再使间隔化合物的另一端与结合到官能团如羟基、羧基、氨基或磺酸基的疏水化合物反应的方法,或者使在上述间隔链一端具有可与疏水化合物中的官能团一同形成醚键、羧酸酯键、硫酸酯键、羧酸酰胺键或硫酸酰胺键的官能团如羟基、羧基、氨基或磺酸基的间隔化合物与疏水基团已结合到官能团如羟基、羧基、氨基或磺酸基的疏水化合物反应,再使间隔化合物的另一端与 GAG 反应的方法。尤其是可优选使用其中间隔化合物与疏水化合物反应,再与 GAG 反应的方法。

[0099] 上述方法可通过公知方法适当地进行,且优选在缩合剂存在下进行。该缩合剂可优选包括水溶性碳二亚胺如 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸化物 (EDCI.HCl)、缩合剂如二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (HOSu)。例如,当将透明质酸用作 GAG,且肉桂酸衍生物如 Ph-CH=CH-COO-$(CH_2)_m$-NH_2 或 Ph-CH=CH-COO-CH_2-(OCH_2)

$_n$-NH_2（其中 m 和 n 分别为 1 至 18 的整数）用作结合到间隔化合物的疏水化合物时，可优选使用利用水溶性碳二亚胺如 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸化物 (EDCI.HCl) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺的缩合方法。该反应可使用水和水溶性有机溶剂如二噁烷、二甲基甲酰胺或乙醇的混合溶剂完成。该高度溶解于水性介质的透明质酸衍生物可通过在完成所述反应后用碱如碳酸氢钠处理而获得。

[0100] 当使由此制备的借助结合链引入疏水基团的 GAG 进行光二聚反应或光聚合反应而使 GAG 分子彼此交联时，可使用例如描述于日本公开未审专利公报 2002-249501 中的方法。具体地，在其中苯乙烯基作为疏水基团的化合物借助 -COO-$(CH_2)_m$-NHCO- 结合到 GAG 的情况下，可通过使用紫外灯 对含有它们的溶液照射光而形成交联。

[0101] 9) 本发明施用于粘膜的药剂

[0102] 本发明施用于粘膜的药剂包含一种或多种借助结合链引入疏水基团的 GAG 作为活性成分，且除借助结合链引入疏水基团的 GAG 之外还可进一步包括其它医学、药学或生物学上可接受的物质。该物质包括但不限于盐如氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和磷酸二氢钾，以及防腐剂如对羟基苯甲酸酯、苯扎氯铵、氯丁醇和葡萄糖酸氯己定，及其他药学活性成分。

[0103] 本发明施用于粘膜的药剂可制成任何公知的剂型（例如，固体制剂如颗粒和粉末，液体制剂如水溶液、悬浮液和乳剂，以及凝胶制剂）作为施用于粘膜的药物。在本发明施用于粘膜的药剂中，其配制和配送的形式与其施用于粘膜的形式可相同或不同。例如，本发明施用于粘膜的药剂可以溶液的形式配制，且可原样直接施用于粘膜。此外，本发明施用于粘膜的药剂可以以固体的形式配制和配送，当施用于粘膜时可制成溶液或凝胶。因此，本发明施用于粘膜的药剂可制成当使用时配制的剂型。

[0104] 当通过溶解于水制成液体药剂时，借助结合链引入疏水基团的 GAG 的量优选 0.02 至 5 重量 %，更优选 0.1 至 3 重量 %，极其优选 0.1 至 1 重量 %，最优选 0.1 至 0.6 重量 %。

[0105] < 施用对象 >

[0106] 本发明施用于粘膜的药剂目的在于施用于粘膜。本发明施用于粘膜的药剂施用的动物不特别限定，只要它们具有粘膜即可，优选哺乳动物。所述哺乳动物包括但不限于人类、马、牛、狗、猫、兔、仓鼠、豚鼠和小鼠。本发明施用于粘膜的药剂当然可制成用于人类的药物，也可制成用于动物的药物。其中，优选制成用于人类的药物。

[0107] 本发明施用于粘膜的药剂所施用的粘膜不特别限定，只要 该粘膜为存在于动物中的粘膜即可。该粘膜包括存在于器官和组织中的粘膜组织，该器官和组织例如胃肠道系统如胃和肠，心血管系统，呼吸系统，排泄系统如膀胱、直肠和肛门，生殖系统如阴道，以及与外界接触的器官如眼、鼻和口腔。其中，本发明施用于粘膜的药剂可优选施用于角膜、结膜、口腔粘膜和膀胱粘膜。

[0108] < 施用的疾病 >

[0109] 本发明施用于粘膜的药剂可广泛施用于此粘膜。该施用的目的不限于此，例如，可列举诸如保护粘膜组织（例如，防止由紫外线造成的雪盲、翼状胬肉和白内障）、防止粘膜干燥和治疗粘膜病症的目的。因此，本发明施用于粘膜的药剂不仅可施用于异常状态的粘膜（例如，已出现病症的粘膜），也可施用于正常状态的粘膜。然而，由于本发明施用于粘膜的药剂在已经出现病症的粘膜中发挥优良的药理效果，因此其可优选用于治疗粘膜病症，

例如在角膜、结膜、口腔粘膜和膀胱粘膜中的病症。

[0110] 由于本发明施用于粘膜的药剂尤其在粘膜病症中的粘膜上皮病症中发挥优良的药理效果，因此其可优选用于治疗粘膜上皮中的病症。

[0111] 该粘膜上皮中的此类病症的实例包括角膜上皮层病症如角膜干燥（干眼症）；角膜结膜炎、浅层点状角膜炎 (SPK)、角膜上皮糜烂、角膜上皮缺失和角膜肿瘤；口腔粘膜病症如口腔干燥（口干）、口腔溃疡 (aphthous ulcer)、口炎和舌炎；鼻粘膜干燥和瘙痒；膀胱粘膜病症如间质性膀胱炎；溃疡性结肠炎，以及直肠或阴道干燥。还可列举外科手术时器官粘膜的干燥和损伤。其中，其可优选用于治疗角膜上皮层病症、口腔粘膜上皮病症和膀胱粘膜上皮层病症。

[0112] ＜施用方法和量＞

[0113] 本发明施用于粘膜的药剂可施用于以上列举的粘膜组织，其施用方法和施用剂型可由本领域熟练技术人员依据将施用的粘膜的位置、形态、性质和功能，以及施用的目的而适当确定。然而，本发明施用于粘膜的药剂优选在使用中以液体形式如溶液施用于粘膜。在该情况下，在制备（配制）或施用本发明施用于粘膜的药剂时，可通过将借助结合链引入疏水基团的 GAG 溶解于溶剂中而获得该液体。该溶剂不特别限定，只要该溶剂能溶解借助结合链引入疏水基团的 GAG 并为药学上可接受的溶剂即可。例如，可使用缓冲液如磷酸盐缓冲液或盐水，但溶剂不限于此。在该情况下，液体药剂中借助结合链引入疏水基团的 GAG 的浓度不特别限定，可根据要施用的粘膜的类型和粘膜病症的程度适当确定。例如，当本发明施用于粘膜的药剂为滴眼液时，当将本发明施用于粘膜的药剂施用于口腔粘膜或膀胱粘膜时，浓度优选 0.02 至 5 重量 %，更优选 0.1 至 3 重量 %，进一步更优选 0.1 至 1 重量 %，仍然更优选 0.1 至 0.6 重量 %，极其优选 0.1 至 0.5 重量 %，最优选 0.1 至 0.3 重量 %。

[0114] 当本发明施用于粘膜的药剂作为上述液体施用于胃中的粘膜时，可选择口服给药或使用导管给药。例如，当施用于例如眼、鼻或口腔的粘膜时，可选择给药方法如滴注、鼻滴药法或口含。例如，当将本发明施用于粘膜的药剂施用于膀胱、直肠或阴道中的粘膜，或者外科手术时涉及到干燥的器官的粘膜时，可选择将本发明施用于粘膜的药剂通过注射、喷洒或施涂于这些器官或组织的内腔或表面的给药方法，但方法不限于此。

[0115] 本发明施用于粘膜的药剂的施用（给药）量、次数和频率不特别限定，而应当根据施用的粘膜、施用的目的、要施用的动物的类型、年龄、体重、性别和粘膜病症的程度来确定。

[0116] 具体地，当将本发明施用于粘膜的药剂用于治疗人角膜上 皮层病症的目的时，上述浓度的本发明施用于粘膜的药剂作为包含借助结合链引入疏水基团的 GAG 的用于滴注（滴眼液）的液体剂型可以以每天 1 至 5 次，每次给药滴注 1 至 3 滴来给药，和可以以每天 1 至 3 次，每次给药滴注 1 至 3 滴来给药。

[0117] 当将本发明施用于粘膜的药剂用于治疗人口腔粘膜病症的目的时，作为包含借助结合链引入疏水基团的 GAG 的液体的上述浓度的本发明施用于粘膜的药剂可以通过将本发明施用于粘膜的药剂放在口腔中每天 1 至 5 次，漱口约几十秒（优选约 20 至 30 秒）然后吐出来给药。

[0118] 当将本发明施用于粘膜的药剂施用于膀胱粘膜病症时，其优选用于治疗以非细菌性顽固膀胱炎 (non-bacterial refractorycystitis) 如间质性膀胱炎、嗜酸性膀胱炎和出

血性膀胱炎为例的膀胱粘膜病症，这些非细菌性顽固膀胱炎虽然表现出类似于急性细菌性膀胱炎的症状，但对抗菌剂不响应。在此情况下，作为包含借助结合链引入疏水基团的GAG的液体的上述浓度的本发明施用于粘膜的药剂可通过将本发明施用于粘膜的药剂以每周1至7次，每次给药50mL的量直接施用于膀胱，或者用膀胱中的导尿管给药。

[0119] 本发明施用于粘膜的药剂可长时间停留在发病部位，这是因为，与包含没有结合疏水基团的透明质酸作为活性成分的常规药物相比，包含在该药剂中的活性成分在粘膜中表现高停留性。因此，本发明施用于粘膜的药剂即使在低给药频率下也对粘膜中的病症如炎症和损伤持续地发挥治疗效果。然而，本发明施用于粘膜的药剂不受其给药频率限制。

[0120] 以下通过实施例描述本发明。

[0121] <实施例1>

[0122] (1-1)制备引入肉桂酸衍生物的透明质酸钠

[0123] 将172mg/5mL的N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu:WatanabeChemical Industries,Ltd.)的水溶液、143mg/5mL的1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸化物(EDCI.HCl)(WatanabeChemical Industries,Ltd.)的水溶液和181mg/5mL的3-氨基丙基肉桂酸盐酸化物(Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.)的水溶液加入在水(115mL)/二噁烷(144mL)中的透明质酸钠(1.06g,2.7mmol/二糖单位，重均分子量900,000;源自鸡冠花，SeikagakuCorporation)的溶液中。将该混合物搅拌3小时，再加入750mg/10mL的碳酸氢钠(Japanese Pharmacopoeia)的水溶液中。再搅拌2小时30分钟后，将该反应用乙酸(214mg)和氯化钠(1.0g)淬灭。加入乙醇(300mL)，将所得沉淀过滤，并用80%乙醇、95%乙醇连续洗两次。将固体在真空中在40° C干燥过夜而得到白色固体(1.06g)(在下文的实施例中，将“引入肉桂酸衍生物的透明质酸钠”简称为“引入肉桂酸衍生物的HA”)。肉桂酸衍生物的引入率为16%。通过吸光度测量法(波长:269nm)基于肉桂酸的量计算肉桂酸衍生物的引入率，透明质酸的量根据硫酸咔唑法计算。

[0124] (1-2)制备引入肉桂酸衍生物的HA的溶液

[0125] 将盐水加入在以上(1-1)中获得的86mg引入肉桂酸衍生物的HA中以达到总量15.45ml，然后将该溶液用振荡器振荡过夜直至均匀溶解。获得0.5重量%的引入肉桂酸衍生物的HA的溶液(干燥损失10%)。同样地，获得0.3重量%和0.1重量%的引入肉桂酸衍生物的HA的溶液。

[0126] <实施例2>

[0127] (1-1)制备引入肉桂酸衍生物的HA

[0128] 将75mg/5mL的HOSu水溶液、62mg/5mL的EDCI.HCl注射用水溶液和92mg/5mL的6-氨基己基肉桂酸盐酸化物(Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.)的注射用水溶液加入在注射用水(下文称作WFI)(150mL)/二噁烷(75mL)中的透明质酸钠(1.0g,2.5mmol/二糖单位，重均分子量1,500,000;源自鸡冠花，Seikagaku Corporation)的溶液中。将该混合物搅拌4小时，再加入氯化钠(1.0g)。加入乙醇(500mL)，将所得沉淀过滤，并用80%乙醇、乙醇连续洗两次。将固体在真空中在40° C干燥而得到白色固体(1.1g)。肉桂酸衍生物的引入率为2.7%。

[0129] (2-2)制备交联的引入肉桂酸衍生物的HA

[0130] 将上述引入肉桂酸衍生物的HA(12.5g)溶解于磷酸盐缓冲的盐水(磷酸盐浓度：

1.5mM,下文简称为”PBS”）中以制备 2.5% 的引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液 (500mL)。将 2.5% 的引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液用 800W 高压汞灯照射,并通过在 121° C 的高压锅中热处理 7.5min 以产生交联的引入肉桂酸衍生物的 HA。

[0131] 进一步,将 1g 上述交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 溶解于 11.5ml WFI 中以制备 0.2 重量 % 的交联的引入肉桂酸衍生物的 HA。

[0132] <实施例 3>

[0133] (3-1) 制备引入肉桂酸衍生物的 HA

[0134] 将 172mg/5mL 的 HOSu 水溶液、143mg/5mL 的 EDCI.HCl 的水溶液和 181mg/5mL 的 3- 氨基丙基肉桂酸盐酸化物 (TokyoChemical Industry Co.,Ltd.) 的水溶液加入在水 (150mL)/ 二噁烷 (75mL) 中的透明质酸钠 (1.0g,2.5mmol/ 二糖单位,重均分子量 900,000 ;源自鸡冠花,Seikagaku Corporation) 的溶液中。将该混合物搅拌 3 小时,再加入 750mg/10mL 的碳酸氢钠 (JapanesePharmacopoeia) 的水溶液。再搅拌 2 小时 30 分钟后,将该反应用乙酸 (214mg) 和氯化钠 (1.0g) 淬灭。加入乙醇 (300mL),将所得沉 淀过滤,并用 80% 乙醇、95% 乙醇连续洗两次。将固体在真空中在 40° C 干燥过夜而得到作为引入肉桂酸衍生物的 HA 的白色固体 (1.0g)。肉桂酸衍生物的引入率为 10.1%。

[0135] (3-2) 制备荧光染料标记的引入肉桂酸衍生物的 HA

[0136] 将 3.0mmol/mL 的 HOSu 的水溶液、1.5mmol/mL 的 EDCI.HCl 的水溶液和 1.5mmol/mL 的 4- 氨基荧光素 (Tokyo ChemicalIndustry Co.,Ltd.) 水溶液加入在水 (150mL)/ 二噁烷 (75mL) 中的在上面 (3-1) 中获得的引入肉桂酸衍生物的 HA(1.00g,2.5mmol/ 二糖单位) 的溶液中。将该混合物搅拌一天,加入 500mg/10mL 的碳酸氢钠 (Japanese Pharmacopoeia) 的水溶液。再搅拌 4 小时 30 分钟后,将反应用乙酸 (2mL) 和氯化钠 (6.0g) 淬灭。加入乙醇 (500mL),将所得沉淀过滤并用 80% 乙醇洗四次,乙醇洗两次。将该固体在真空中干燥过夜而得到荧光染料标记的固体 (782mg)。荧光的引入率为 0.60%。

[0137] <比较例 1>

[0138] 制备荧光染料标记的 HA

[0139] 将 3.0mmol/mL 的 HO Su 的水溶液、1.5mmol/mL 的 EDCI.HCl 的水溶液和 1.5mmol/mL 的 4- 氨基荧光素 (Tokyo ChemicalIndustry Co.,Ltd.) 水溶液加入在水 (150mL)/ 二噁烷 (75mL) 中的透明质酸钠 (1.00g,2.5mmol/ 二糖单位,重均分子量 900,000 ;源自鸡冠花,Seikagaku Corporation) 的溶液中。将该混合物搅拌一天,加入 500mg/10mL 的碳酸氢钠 (Japanese Pharmacopoeia) 的水溶液。再搅拌 4 小时 30 分钟后,将反应用乙酸 (2mL) 和氯化钠 (6.0g) 淬灭。加入乙醇 (500mL),将所得沉淀过滤并用 80% 乙醇洗四次,乙醇洗两次。将该固体在真空中干燥过夜而得到荧光染料标记的固体 (830mg)。荧光的引入率为 0.32%。

[0140] <实施例 4>

[0141] 测量引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液的紫外线透过率

[0142] 制备在上面 (1-1) 中获得引入肉桂酸衍生物的 HA 的 0.1 重量 % 的水溶液,通过分光光度计 (UV-1600,Shimadzu Corporation) 测量紫外线透过率。

[0143] 表示透过率的光谱示于图 1 中,在各种波长下的透过率 (%) 示于表 1 中。结果,在波长 340nm 以上显示 100% 的透过率,但在波长约 320nm 以下的透过率为极低的 20% 以下,这表明该溶液有效地阻断了紫外线的透射。

[0144] 在图 1 中，刻度在横坐标轴上以 65nm 的间隔，在纵坐标轴以 20% 的间隔标出。

[0145] 表 1

[0146]

λ	T(%)
234	19.9
340	106.2
380	101.8
450	98.5

[0147] 在该表中，λ 和 T 分别表示波长和透过率 (%)。

[0148] <实施例 5>

[0149] 引入肉桂酸衍生物的 HA 对兔角膜上皮迁移的作用。

[0150] 实施例 1 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 对用外科手术去除的兔角膜上皮（外科手术模型）迁移的作用。

[0151] (5-1) 方法

[0152] 1) 外科手术去除角膜上皮（外科手术模型）

[0153] 在静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪 (xylazine)，并局部施用 0.4% 盐酸丁氧普鲁卡因 (oxybuprocaine hydrochloride) 麻醉后，通过使用环锯 (trephine)(8mm I.D)、23G 针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0154] 2) 局部给药

[0155] 在剥除角膜上皮 1 小时和 4 小时后，将 150μl 盐水作为对照物质施用于左眼，将 150μl 0.5 重量 % 的在上述实施例 (1-2) 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液作为目标物质施用于右眼。在剥除一天和 2 天后，以 3 小时为间隔，总共 4 次，以及在剥除 3 天后，以 3 小时为间隔，与上述同样地给药。在给药时，使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中的六只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0156] 3) 对角膜上皮缺损区域拍照

[0157] 通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对兔进行全麻，接着，用溶解于 PBS 的 0.2% 荧光素钠对角膜上皮缺损部位染色，然后在紫外灯下拍照。在剥除角膜 1 小时后即将施用目标物质之前和剥除 3 天后最终给药 3 小时之后进行拍照。拍照时，使焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。

[0158] 4) 测量角膜上皮缺损区域

[0159] 使用图像分析仪在打印的照片上测量用荧光素钠染色的角膜上皮缺损区域的面积。将从进行角膜上皮剥除 1 小时后即将施用目标物质之前的剥除部位的面积（剥除面积）减去剥除 3 天后最终给药 3 小时之后的剥除部位的面积而获得的值称为“治愈面积”。

[0160] (5-2) 研究结果

[0161] 每一个体中治愈面积百分比的结果示于图 2 中，每一个体治愈面积百分比和治愈面积百分比的比率的结果示于表 2 中。如下计算治愈面积百分比和治愈面积百分比的比率。

[0162] 治愈面积百分比 (%)=(治愈面积 / 剥除面积)×100

[0163] 治愈面积百分比的比率 =(右眼的治愈面积百分比 / 左眼的

[0164] 治愈面积百分比)×100

[0165] 表 2

[0166]

样本编号	治愈面积百分比(%)		治愈面积百分比的比率
	右眼(施用引入肉桂酸衍生物的HA)	左眼(施用盐水)	
1	76.90	66.59	115.47
2	69.44	85.90	80.85
3	75.23	61.71	121.91
4	75.54	56.79	133.01
5	68.41	64.53	106.01
6	83.76	66.92	125.16
平均值	74.88	67.07	113.73
标准偏差	5.57	9.95	-

[0167] 对于个体编号为 1 至 6 的每个个体，左边的列示出了右眼的治愈面积百分比（施用引入肉桂酸衍生物的 HA），右边的列给出了左眼的治愈面积百分比（施用盐水）。在图 2 和表 2 中，在给药的 6 个个体的 5 个中观察到明显的促进角膜上皮层病症治愈的效果。

[0168] <实施例 6>

[0169] 0.5% 引入肉桂酸衍生物的 HA 对兔角膜上皮迁移的作用。

[0170] 实施例 1 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 对用外科手术去除的兔角膜上皮迁移（外科手术模型）的作用。

[0171] (6-1) 方法

[0172] 1) 外科手术去除角膜上皮（外科手术模型）

[0173] 在静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪，并局部施用 0.4% 盐酸丁氧普鲁卡因麻醉后，通过使用环锯 (8mm I.D)、23G 针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0174] 2) 局部给药

[0175] 在剥除角膜上皮 1 小时和 4 小时后，将 150μl 盐水作为对照物质施用于左眼，将 150μl 在上述实施例 (1-2) 中制备的 0.5 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液作为目标物质施用于右眼。在剥除 1 天和 2 天后，以 3 小时为间隔，总共 4 次，以及在剥除 3 天后，以 3 小时为间隔，与上述同样地给药。在给药时，使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中的十四只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0176] 3) 对角膜上皮缺损区域拍照

[0177] 通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对兔进行全麻，接着，用溶解于

PBS 的 0.2% 荧光素钠对角膜上皮缺损部位染色，然后在紫外灯下拍照。在剥除角膜 1 小时后即将施用目标物质之前和剥除 1 至 3 天后第二次给药 3 小时之后进行拍照。拍照时，使焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。

[0178] 4) 测量角膜上皮缺损区域

[0179] 使用图像分析仪在打印的照片上测量用荧光素钠染色的角膜上皮缺损区域的面积。将从角膜上皮剥除 1 小时后即将施用目标物质之前的剥除部位的面积（剥除面积）减去剥除 3 天后最终给药之后 3 小时的剥除部位的面积而获得的值称为“治愈面积”。(6-2) 研究结果

[0180] 每一个体中治愈面积的结果示于图 3 中，每一个体治愈率的结果示于图 4 中。如下计算治愈面积和治愈率。

[0181] 治愈面积 = 剥除后的面积 * —每一时间点的面积 (1 至 3 天后)

[0182] * 下文中，计算治愈面积中的“剥除后的面积”指‘角膜剥除 1 小时后即将施用目标物质之前剥除部位的面积’。

[0183] 治愈率 = 各个时间点的治愈面积的平均值 (1 至 3 天后)

[0184] 在图 3 和 4 中，观察到与在对照眼中的角膜上皮的治愈面积相比，在施用 0.5 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液的眼中角膜上皮的治愈面积明显增加。还观察到，在施用 0.5 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液的眼中治愈率明显提高。

[0185] < 实施例 7>

[0186] 0.3% 引入肉桂酸衍生物的 HA 对兔角膜上皮迁移的作用。

[0187] 实施例 1 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 对用外科手术去除的兔角膜上皮（外科手术模型）迁移的作用。

[0188] (7-1) 方法

[0189] 1) 外科手术去除角膜上皮（外科手术模型）

[0190] 在静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪，并局部施用 0.4% 盐酸丁氧普鲁卡因麻醉后，通过使用环锯 (8mm I.D)、23G 针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0191] 2) 局部给药

[0192] 在剥除角膜上皮 1 小时和 4 小时后，将 150μl 盐水作为对照物质施用于左眼，将 150μl 在上述实施例 (1-2) 中制备的 0.3 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液作为目标物质施用于右眼。在剥除 1 天和 2 天后，以 3 小时为间隔，总共 4 次，以及在剥除 3 天后，以 3 小时为间隔，进行与上述同样地给药。在给药时，使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中的十四只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0193] 3) 对角膜上皮缺损区域拍照

[0194] 通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对兔进行全麻，接着，用溶解于 PBS 的 0.2% 荧光素钠对角膜上皮缺损部位染色，然后在紫外灯下拍照。在剥除角膜 1 小时后即将施用目标物质之前和剥除 1 至 3 天后第二次给药 3 小时之后进行拍照。拍照时，使焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。

[0195] 4) 测量角膜上皮缺损区域

[0196] 使用图像分析仪在打印的照片上测量用荧光素钠染色的角膜上皮缺损区域的面积。将从角膜上皮剥除 1 小时后即将施用目标物质之前的剥除部位的面积（剥除面积）减

去剥除 3 天后最终给药 3 小时之后的剥除部位的面积而获得的值称为“治愈面积”。(7-2) 研究结果

[0197] 每一个体中治愈面积的结果示于图 5 中，每一个体治愈率的结果示于图 6 中。如下计算治愈面积和治愈率。

[0198] 治愈面积 = 剥除后的面积－每一时间点的面积 (1 至 3 天后)

[0199] 治愈率 = 各个时间点的治愈面积的平均值 (1 至 3 天后)

[0200] 在图 5 和 6 中，观察到与在对照眼中的角膜上皮的治愈面积相比，在施用 0.3 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液的眼中角膜上皮的治愈面积明显增加。还观察到，在施用 0.3 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液的眼中治愈率明显提高。

[0201] < 实施例 8>

[0202] 0.1% 引入肉桂酸衍生物的 HA 对兔角膜上皮迁移的作用 (0.1 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 水溶液和 0.1 重量 %HA 水溶液，每天 4 次滴眼)

[0203] 实施例 1 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 对用外科手术去除的兔角膜上皮 (外科手术模型) 迁移的作用。

[0204] (8-1) 方法

[0205] 1) 外科手术去除角膜上皮 (外科手术模型)

[0206] 在静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪，并局部施用 0.4% 盐酸丁氧普鲁卡因麻醉后，通过使用环锯 (8mm I.D)、23G 针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0207] 2) 局部给药

[0208] 在剥除角膜上皮 1 小时和 4 小时后，将 150μl 0.1 重量 % 的重 均分子量 600,000 至 1,200,000 的 HA 水溶液作为对照物质施用于左眼，将 150μl 在上述实施例 (1-2) 中制备的 0.1 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液作为目标物质施用于右眼。在剥除一天和 2 天后，以 3 小时为间隔，总共 4 次，以及在剥除 3 天后，以 3 小时为间隔，与上述同样地给药。在给药时，使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中的八只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0209] 3) 对角膜上皮缺损区域拍照

[0210] 通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对兔进行全麻，接着，用溶解于 PBS 的 0.2% 荧光素钠对角膜上皮缺损部位染色，然后在紫外灯下拍照。在剥除角膜 1 小时后即将施用目标物质之前和剥除 1 至 3 天后第二次给药 3 小时之后进行拍照。拍照时，使焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。

[0211] 4) 测量角膜上皮缺损区域

[0212] 使用图像分析仪在打印的照片上测量用荧光素钠染色的角膜上皮缺损区域的面积。将从角膜上皮剥除 1 小时后即将施用目标物质之前的剥除部位的面积 (剥除面积) 减去剥除 3 天后最终给药 3 小时之后的剥除部位的面积而获得的值称为“治愈面积”。(8-2) 研究结果

[0213] 每一个体中治愈面积的结果示于图 7 中，每一个体治愈率的结果示于图 8 中。如下计算治愈面积和治愈率。

[0214] 治愈面积 = 剥除后的面积－每一时间点的面积 (1 至 3 天后)

[0215] 治愈率 = 各个时间点的治愈面积的平均值 (1 至 3 天后)

[0216] 在图7和8中，观察到与施用0.1重量%HA水溶液的对照眼中的角膜上皮的治愈面积相比，在施用0.1重量％引入肉桂酸衍生物的HA的眼中角膜上皮的治愈面积明显增加。还观察到，在给予0.1重量％引入肉桂酸衍生物的HA的溶液的眼中治愈率明显 提高。

[0217] <实施例9>

[0218] 0.1%引入肉桂酸衍生物的HA对兔角膜上皮迁移的作用(0.1重量％引入肉桂酸衍生物的HA水溶液和0.1重量%HA水溶液，每天1次滴眼)

[0219] 实施例1中制备的引入肉桂酸衍生物的HA对用外科手术去除的兔角膜上皮（外科手术模型）迁移的作用。

[0220] (9-1)方法

[0221] 1)外科手术去除角膜上皮（外科手术模型）

[0222] 在静脉注射5mg/kg氯胺酮和2mg/kg甲苯噻嗪，并局部施用0.4%盐酸丁氧普鲁卡因麻醉后，通过使用环锯(8mm I.D)、23G针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0223] 2)局部给药

[0224] 在剥除角膜上皮1小时后，将150μ10.1重量％的重均分子量600,000至1,200,000的HA水溶液作为对照物质施用于左眼，将150μ1 0.1重量％的在上述实施例(1-2)中制备的引入肉桂酸衍生物的HA溶液作为目标物质施用于右眼。此外，剥除1至3天后，每天1次，进行与上述相同的给药。在给药时，使用1ml的注射器。将上述1)中的八只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0225] 3)对角膜上皮缺损区域拍照

[0226] 通过静脉注射5mg/kg氯胺酮和2mg/kg甲苯噻嗪对兔进行全麻，接着，用溶解于PBS的0.2%荧光素钠对角膜上皮缺损部位染色，然后在紫外灯下拍照。在剥除角膜1小时后即将施用目标物质之前和剥除后1至3天给药6小时之后进行拍照。拍照时，使焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。

[0227] 4)测量角膜上皮缺损区域

[0228] 使用图像分析仪在打印的照片上测量用荧光素钠染色的角膜上皮缺损区域的面积。将从角膜上皮剥除1小时后即将施用目标物质之前的剥除部位的面积（剥除面积）减去剥除3天后最终给药3小时之后的剥除部位的面积而获得的值称为“治愈面积”。(9-2)结果

[0229] 每一个体中治愈面积的结果示于图9中，每一个体中治愈率的结果示于图10中。如下计算治愈面积和治愈率。

[0230] 治愈面积=剥除后的面积－每一时间点的面积(1至3天后)

[0231] 治愈率=各个时间点的治愈面积的平均值(1至3天后)

[0232] 在图9和10中，观察到与施用0.1重量%HA水溶液的对照眼中的角膜上皮的治愈面积相比，在1至3天的所有时间点在施用0.1重量％引入肉桂酸衍生物的HA的溶液的眼中角膜上皮的治愈面积明显增加。还观察到，在给予0.1重量％引入肉桂酸衍生物的HA的溶液的眼中治愈率明显提高。

[0233] <实施例10>

[0234] 使用荧光标记的引入肉桂酸衍生物的HA在兔角膜上皮剥除部位的停留性

[0235] 在实施例3中制备的荧光标记的引入肉桂酸衍生物的HA和比较例1中制备的荧

光标记的 HA 对用外科手术去除的兔角膜上皮（外科手术模型）残留性的作用。

[0236] (10-1) 方法

[0237] 1) 外科手术去除角膜上皮（外科手术模型）

[0238] 在静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪，并局部施用 0.4% 盐酸丁氧普鲁卡因麻醉后，通过使用环锯 (8mm I.D)、23G 针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0239] 2) 局部给药

[0240] 在剥除角膜上皮 1 小时后，将 150μl 0.3 重量 % 的以上比较例 1 中制备的荧光标记的 HA 水溶液作为对照物质施用于左眼，将 150μl 0.3 重量 % 的以上实施例 3 中制备的荧光标记的引入肉桂酸衍生物的 HA 的水溶液作为目标物质施用于右眼。在给药时，使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中的八只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0241] 3) 去除角膜上皮及制备冷冻块 (frozen block)

[0242] 通过每个兔静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对两只兔进行全麻，在施用目标物质和对照物质 30 分钟、1 小时、1.5 小时和 2.5 小时后去除眼球。使用外科手术刀在去除的眼球的角膜和巩膜之间开孔，使用微型手术剪仅去除角膜。将去除的角膜放置在生物样品切割板 (Nisshin EM Corporation 提供，Cat No.428) 上，使用单刃不锈钢刀片 (GEM(R)STAINLESSSTEEL UNCOATED, Nisshin EM Corporation, Cat No.429) 切出待观察的部分。将切出的部分浸入 O.C.T. 化合物 (Tissue-Tek(R)4583, Lot.1178) 中，然后嵌入装有 O.C.T. 化合物的低温恒温器盘 (cryostat tray) (Murazumi Co., Ltd. 提供，Cat.No.31)，以使待观察的部分在底部，并使用泡沫聚苯乙烯中的液氮迅速冷冻以得到不固定的冷冻块。

[0243] 4) 制备冷冻切片

[0244] 接下来，将冷冻块从低温恒温器盘取出，并使用 O.C.T. 化合物粘附在样品台上。将样品台和一次性切片机刀片 (LeicaMicrosystems Japan 提供，型号 818，Lot.No.913212) 放在高效冷冻切片机中用于研究，将冷冻块在 -20° C 的冷冻室温度 (CT) 和 -16° C 的样品侧温度 (OT) 的条件下切片，使用硅烷涂布的玻片 (Muto Pure Chemicals Co., Ltd. 提供，Star Frost Slide Glass, Cat.No.5116) 制备厚度 5μm 的切片。

[0245] 5) 观察和拍照的方法

[0246] 将冷冻切片放置在入射光荧光显微镜 (OlympusCorporation, BH2-RFC) 中，在 IB cube (BH2-DMIB，激发波长 :495nm，吸收波长 :460nm) 和 U cube (BH2-DMU，宽波段 U 激发，吸收波长 :435nm) 中分别观察 FA 图像和自动荧光图像。使用冷却的高灵敏度 CCD 相机 (Keyence Corporation，VB-6010)，在曝光时间一秒和 ISO 灵敏度 200 的条件下拍摄 FA 图像和自动荧光图像。

[0247] (10-2) 研究结果

[0248] 取样的角膜的照片示于图 11 和 12。从图 11 和 12，通过荧光标记的颜色变化可确定，作为对照物质的 0.3 重量 % 荧光标记的 HA 的水溶液在给药后直到 30 分钟停留，但到 1 小时后没有停留。同时，尽管为目标物质的 0.3 重量 % 的荧光标记的引入肉桂酸衍生物的 HA 的水溶液的荧光颜色变化随时间变弱，但在给药后 30 分钟至 2 小时 30 分钟的所有时间点均观察到颜色变化，从而确认了高停留性能。

[0249] < 实施例 11>

[0250] 0.3% 引入肉桂酸衍生物的 HA 对暴露于紫外线后的兔眼的作用

[0251] 实施例 1 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 对患有角膜浅层点状角膜病变 (corneal superficial punctuate keratopathy) 的兔的保护作用。

[0252] (11-1) 研究步骤

[0253] 1) 对兔麻醉和打开眼睑

[0254] 对兔通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪施行麻醉，并通过吸入异氟烷 (isoflurane) 保持麻醉。接下来，使用儿童用眼睑拉钩 (eyelid retractor) 保持眼睑一直睁开。

[0255] 2) 施用目标物质和对照物质

[0256] 在眼睛睁开的状态下，将 150μl 10.3 重量％的重均分子量 600,000 至 1,200,000 的 HA 的水溶液作为对照物质施用于右眼，150μl 10.3 重量％的上述实施例 (1-2) 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 作为目标物质施用于左眼。在给药时，使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中所述的一只兔作为给药对象。

[0257] 3) 对兔的角膜照射紫外线

[0258] 使用 15kW 的杀菌灯，从距兔眼球约 10cm 的距离对双眼照射紫外线。照射进行 3 小时。

[0259] 4) 对紫外线照射部位进行拍照

[0260] 在兔持续麻醉的状态下用 0.2％荧光素钠对眼球染色，并在紫外光下拍照。拍照时保持焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。(11-2) 研究结果

[0261] 用紫外线照射后的照片示于图 13 中。从图 13，在施用对照物质后用紫外线照射的眼球中，用 0.2％荧光素钠染色的病症部位明显。同时，在施用目标物质后用紫外线照射的眼球中，用 0.2％荧光素钠染色的病症部位明显小于给予对照物质的病症部位，从而防止了由紫外线引起的角膜病症。

[0262] <实施例 12>

[0263] 使用去除的角膜的润湿效果

[0264] 使用兔去除的角膜，验证实施例 1 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 的润湿性能。

[0265] (12-1) 方法

[0266] 1) 去除角膜

[0267] 通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对兔进行全麻，去除眼球。使用外科手术刀在去除的眼球的角膜和巩膜之间开孔，使用微型手术剪仅去除角膜。

[0268] 2) 对角膜干燥处理

[0269] 通过将去除的角膜用义齿稳定材料放置在石蜡块上，并从 距角膜约 1m 的距离使用干燥机吹冷风 5 分钟来进行干燥处理。3) 施用实验物质后 (目标物质、对照物质和阴性对照物质)

[0270] 完成干燥处理后，将 100μl 盐水作为阴性对照物质、重均分子量 600,000 至 1,200,000 的 HA 的 0.3 重量％的水溶液作为对照物质或上述实施例 (1-2) 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 的 0.5 重量％水溶液作为目标物质施用于两角膜。在给药中，使用 1ml 注射器。将以上 1) 中所述的三只兔 (6 只角膜) 用作给药对象。

[0271] 4) 测量水蒸发量

[0272] 在施用实验物质后之前、干燥处理之后、施用实验物质后之后以及施用实验物质

后后以 10 分钟为间隔直至 40 分钟，使用水蒸发量测量设备 (AS-TW2，ASAHIBIOMED) 测量水蒸发量。(12-2) 研究结果

[0273] 水蒸发量的测量结果示于图 14。从图 14，在为对照物质的 HA 水溶液中的水蒸发量略高于作为阴性对照的盐水中的蒸发量，而在盐水中的值在 40 分钟后接近于 0。另一方面，在施用目标物质后的水蒸发量即使在 40 分钟后仍保持高的值，从而证实了目标物质明显的润湿性能。

[0274] < 实施例 13>

[0275] (13-1) 方法

[0276] 1) 去除角膜上皮

[0277] 使兔无痛死，在去除眼球后，通过沿巩膜切割去除整个角膜层。将去除的角膜保存在盐水中，在测量前通过将角膜上皮用义齿稳定材料放置在石蜡块上来固定角膜上皮 (下文称为“待测量的角膜”)。

[0278] 2) 角膜上皮中的水蒸发

[0279] 将待测量的角膜以干燥机从 30cm 的距离吹冷风 5 分钟，并放置在室温中 1 小时。

[0280] 3) 施用目标物质

[0281] 在水蒸发后，将两滴 (约 100μl) 盐水作为阴性对照物质、重均分子量 600,000 至 1,200,000 的 HA 的 0.3 重量 % 的水溶液作为对照物质或上述实施例 (1-2) 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 的 0.5 重量 % 的水溶液作为目标物质用 1ml 注射器给药。

[0282] 4) 测量水蒸发量

[0283] 使用水蒸发量测量设备 (AS-TW2)，直接测量作为未被感知的蒸发量而感知的量 (每 m^2 每小时释放的水量) 作为从待测量的角膜蒸发的水量。

[0284] (13-2) 研究结果

[0285] 测量水蒸发量的结果示于图 15 中。从图 15，在作为对照物质的 HA 水溶液中的水蒸发量略高于作为阴性对照的盐水中的蒸发量，而盐水在 40 分钟后表现接近于 0 的值。另一方面，施用目标物质的水蒸发量即使在 40 分钟后仍保持高的值，从而证实了目标物质与盐水和 HA 水溶液相比，在角膜上具有更持久的水停留性。

[0286] < 实施例 14>

[0287] 验证交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 的治疗效果

[0288] 使用口腔干燥的模型仓鼠，验证实施例 2 中制备的交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 对口腔干燥的治疗效果。

[0289] (14-1) 试验方法

[0290] 1) 制备口腔干燥的模型仓鼠

[0291] 在用 Nembutal 麻醉下，通过将直径约 10mm 的试管接近颊侧插入口腔并将其颠倒而使雄性 Syrian 仓鼠的口腔内部暴露。通过使用干燥机对暴露的口腔内部吹热风约 20 秒，再吹冷风 2 分 40 秒而获得口腔干燥的模型仓鼠。口腔内部持续暴露直至完成测量。

[0292] 2) 施用目标物质和对照物质

[0293] 在制备口腔干燥模型后，立即使用微量注射器，通过施用至口腔内部，施用 100μl(A)PBS、(B)0.2 重量 %HA 溶液 (Seikagaku Corporation 提供，重均分子量：1,500,000) 或 (C)0.2 重量 % 交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液。

[0294] 下文中，分别将施用 (A) 的组、施用 (B) 的组和施用 (C) 的组称为 PBS 组、HA 组和交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 的组。对于给药分组（给药组组成），将七只仓鼠用于每一 PBS 组、HA 组和交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 的组。

[0295] 3) 计算水蒸发量比率

[0296] 使用水蒸发系统 (Asahibiomed) 测量口腔干燥模型仓鼠中口腔内侧的水蒸发量，以制备口腔干燥模型仓鼠后立即测量的值为 1，计算水蒸发量比率。水蒸发量比率越高，越能保持湿润的条件（口腔干燥程度低）。在制备口腔干燥模型仓鼠后即刻、给药后即刻、给药 10 分钟和 20 分钟后进行测量。

[0297] (14-2) 研究结果

[0298] 水蒸发量比率的测量结果示于图 16。在图中，横轴上圆圈中的数字 1、2、3 和 4 分别表示制备口腔干燥模型仓鼠后即刻、给药后即刻、给药后 10 分钟和 20 分钟的数据。P 表示显著性水平。给药后即刻，所有的给药组显示 3.3 至 4.5 的水蒸发量比率。给药 10 分钟后在 PBS 组中水蒸发量比率平均为 0.9，在 HA 组中平均为 2.3。另一方面，在交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 的组中平均为 3.2，因此，表现出比 PBS 组和 HA 组高的水蒸发量比率。另外，在给药 20 分钟后蒸发量比率在 PBS 组中平均为 0.9，在 HA 组中平均为 1.3。另一方面，在交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 的组中平均为 3.2，因此，表现出比 PBS 组和 HA 组高得多的水蒸发量比率。另外，从图 16 显而易见，在交联的引入肉桂酸衍生 物的 HA 的组中水蒸发量比率随时间变化很稳定。这表明，交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 长时间停留在给药部位，发挥高度的持续效果。

[0299] 以上结果表明，包括引入肉桂酸衍生物的 HA 和交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 的借助结合链引入疏水基团的 GAG 适于施用于粘膜，并能够通过施用于粘膜而有效地治疗粘膜上皮层的病症。还表明，治疗效果高度持久。

[0300] 由于在上述任何动物研究中都未观察到由于施用引入肉桂酸衍生物的 HA 和交联的引入肉桂酸衍生物的 HA 而引起的副作用，从而可以充分地预计本发明施用于粘膜的药剂的安全性。

[0301] <实施例 15>

[0302] (15-1) 制备引入辛胺的透明质酸钠

[0303] 将 25.8mg/2mL 辛胺溶液（乙醇 :0.1MHCl=1:1）、2mL0.1MDMT-MM(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.) 溶液（乙醇 1: 水 =1:1）加入透明质酸钠 (502mg,1.25mmol/ 二糖单位，重均分子量 900,000) 的水 (50mL)/ 乙醇 (50mL) 溶液中。将该混合物搅拌过夜，加入 376mg/5mL 碳酸氢钠 (Japanese Pharmacopoeia) 的水溶液。再搅拌 5 小时后，用乙酸 (107mg) 和氯化钠 (522mg) 淬灭反应。加入乙醇 (250mL)，将所得沉淀过滤，用 80% 乙醇、乙醇连续洗两次。将固体在真空中干燥以得到白色固体 (475mg)。根据 HPLC，辛胺的引入率为 12.6%。

[0304] (15-2) 制备引入十六烷胺的透明质酸钠

[0305] 将 30mg/3mL 十六烷胺溶液（乙醇 :0.1MHCl=1:1）、1.25mL0.1M DMT-MM(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.) 溶液（乙醇 1:water=1:1）加入透明质酸钠 (501mg,1.25mmol/ 二糖单位，重均分子量 900,000) 的水 (50mL)/ 乙醇 (50mL) 溶液中。将该混合物搅拌过夜，加入 381mg/5mL 碳酸氢钠 (Japanese Pharmacopoeia) 的水溶液。再搅拌 5 小时后，用乙酸

(107mg) 和氯化钠 (497mg) 淬灭反应。加入乙醇 (250mL),将所得沉淀滤出,用 80% 乙醇、乙醇连续洗两次。将固体在真空中干燥以得到白色固体 (497mg)。根据 HPLC,十六烷胺的引入率为 12%。

[0306] (15-3) 制备样品溶液

[0307] 将 64mg 以上 (15-1) 中获得的化合物加入 5mM 磷酸盐缓冲的盐水中以达到总量 59ml,然后将该溶液用振荡器器振荡过夜。获得以上 (15-1) 中制备的化合物的 0.1 重量 % 的溶液。

[0308] 同样地,获得以上 (15-2) 中制备的化合物的 0.1 重量 % 的溶液。

[0309] < 实施例 16>

[0310] 0.1% 引入肉桂酸衍生物的 HA 对兔角膜上皮迁移的作用。

[0311] 实施例 1 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 对用外科手术去除的兔角膜上皮 (外科手术模型) 迁移的作用。

[0312] (16-1) 方法

[0313] 1) 外科手术去除角膜上皮 (外科手术模型)

[0314] 在静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪,并局部施用 0.4% 盐酸丁氧普鲁卡因麻醉后,通过使用环锯 (8mm I.D)、23G 针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0315] 2) 局部给药

[0316] 在剥除角膜上皮 1 小时和 4 小时后,将 150μl 盐水作为对照物质施用于左眼,将 150μl 0.1 重量 % 的在上述实施例 (1-2) 中制备的引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液作为目标物质施用于右眼。在剥除 1 天和 2 天后,以 3 小时为间隔,总共 4 次,以及在剥除 3 天后,以 3 小时为间隔,进行与上述同样地给药。在给药时,使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中的十四只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0317] 3) 对角膜上皮缺损区域拍照

[0318] 通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对兔进行全麻,接着,用溶解于 PBS 的 0.2% 荧光素钠对角膜上皮缺损部位染色,然后在紫外灯下拍照。在剥除角膜 1 小时后即将施用目标物质之前和剥除 1 至 3 天后第二次给药 3 小时之后进行拍照。拍照时,使焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。

[0319] 4) 测量角膜上皮缺损区域

[0320] 使用图像分析仪在打印的照片上测量用荧光素钠染色的角膜上皮缺损区域的面积。将从角膜上皮剥除 1 小时后即将施用目标物质之前的剥除部位的面积 (剥除面积) 减去剥除 3 天后最终给药 3 小时之后的剥除部位的面积而获得的值称为“治愈面积”。(16-2) 研究结果

[0321] 每一个体中治愈面积的结果示于图 17 中,每一个体治愈率的结果示于图 18 中。如下计算治愈面积和治愈率。

[0322] 治愈面积 = 剥除后的面积 — 每一时间点的面积 (1 至 3 天后)

[0323] 治愈率 = 各个时间点的治愈面积的平均值 (1 至 3 天后)

[0324] 在图 17 和 18 中,观察到与在对照眼中的角膜上皮的治愈面积相比,在 1 至 3 天的所有时间点,在施用 0.1 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液的眼中角膜上皮的治愈面积明显增加。还观察到,在施用 0.1 重量 % 引入肉桂酸衍生物的 HA 的溶液的眼中治愈率明显

提高。

[0325] <实施例 17>

[0326] 0.1% 引入辛胺的 HA 和引入十六烷胺的 HA 对兔角膜上皮迁移的作用。

[0327] 实施例 15 中制备的引入辛胺的 HA 和引入十六烷胺的 HA 对用外科手术去除的兔角膜上皮（外科手术模型）迁移的作用。

[0328] (17-1) 方法

[0329] 1) 外科手术去除角膜上皮（外科手术模型）

[0330] 在静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪，并局部施用 0.4% 盐酸丁氧普鲁卡因麻醉后，通过使用环锯 (8mm I.D)、23G 针和微型手术剪去除中央区域的角膜上皮。

[0331] 2) 局部给药

[0332] 在剥除角膜上皮 1 小时和 4 小时后，将 150μl 盐水作为对照物质施用于左眼，将 150μl 0.1 重量 % 的在上述实施例 (15-2) 中制备的引入辛胺的 HA 和引入十六烷胺的 HA 溶液作为目标物质施用于右眼。在剥除 1 天和 2 天后，以 3 小时为间隔，总共 4 次，以及在剥除 3 天后，以 3 小时为间隔，进行与上述同样地给药。在给药时，使用 1ml 的注射器。将上述 1) 中的八只用于角膜上皮层病症的模型兔用作给药对象。

[0333] 3) 对角膜上皮缺损区域拍照

[0334] 通过静脉注射 5mg/kg 氯胺酮和 2mg/kg 甲苯噻嗪对兔进行全麻，接着，用溶解于 PBS 的 0.2% 荧光素钠对角膜上皮缺损部位染色，然后在紫外灯下拍照。在剥除角膜 1 小时后即将施用目标物质之前和剥除 1 至 3 天后第二次给药 3 小时之后进行拍照。拍照时，使焦距恒定以使照片的放大倍数恒定。

[0335] 4) 测量角膜上皮缺损区域

[0336] 使用图像分析仪在打印的照片上测量用荧光素钠染色的角膜上皮缺损区域的面积。将从角膜上皮剥除 1 小时后即将施用目标物质之前的剥除部位的面积（剥除面积）减去剥除 3 天后最终给药 3 小时之后的剥除部位的面积而获得的值称为“治愈面积”。(17-2) 研究结果

[0337] 每一个体中治愈面积的结果示于图 19 中，每一个体治愈率的结果示于图 20 中。在图 19 中，C8-L(a：对照）、C8-R(b)、C16-L(c：对照）、C16-R(d) 分别表示施用盐水的左眼作为 C8-R 的对照、施 用引入辛胺的 HA 溶液的右眼、施用盐水的左眼作为 C16-R 的对照、施用 0.1% 引入十六烷胺的 HA 溶液的右眼。在图 20 中，C8 表示使用辛胺的上述研究的结果，C16 表示使用十六烷胺的上述研究的结果。如下计算治愈面积和治愈率。

[0338] 治愈面积 = 剥除后的面积－每一时间点的面积 (1 至 3 天后）

[0339] 治愈率 = 各个时间点的治愈面积的平均值 (1 至 3 天后）

[0340] 在图 19 和 20 中，观察到与在对照眼中的角膜上皮的治愈面积相比，在 1 至 3 天的所有时间点在施用 0.1% 引入辛胺的 HA 和引入十六烷胺的 HA 的溶液的眼中角膜上皮的治愈面积明显增加。还观察到，在施用 0.1% 引入辛胺的 HA 或引入十六烷胺的 HA 的溶液的眼中治愈率明显提高。

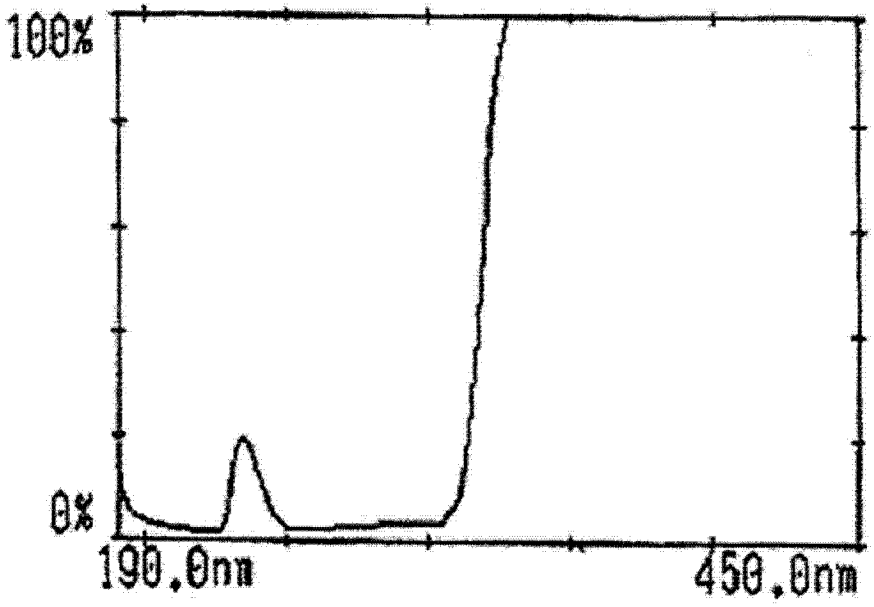

100%
0%
190.0nm
450.0nm

图 1

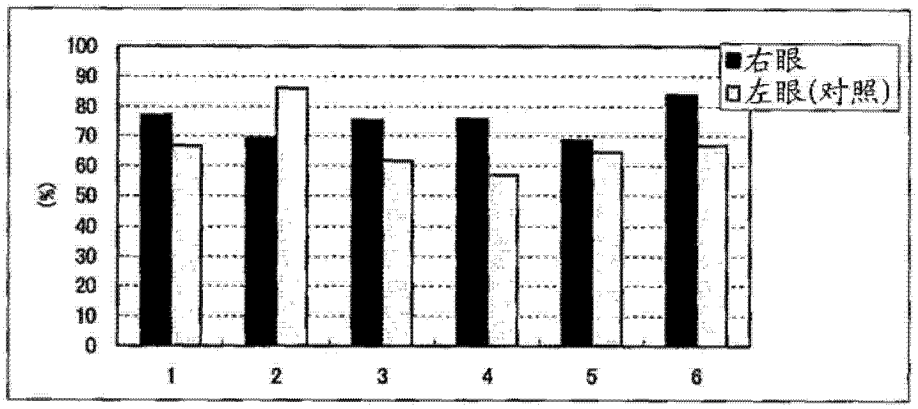
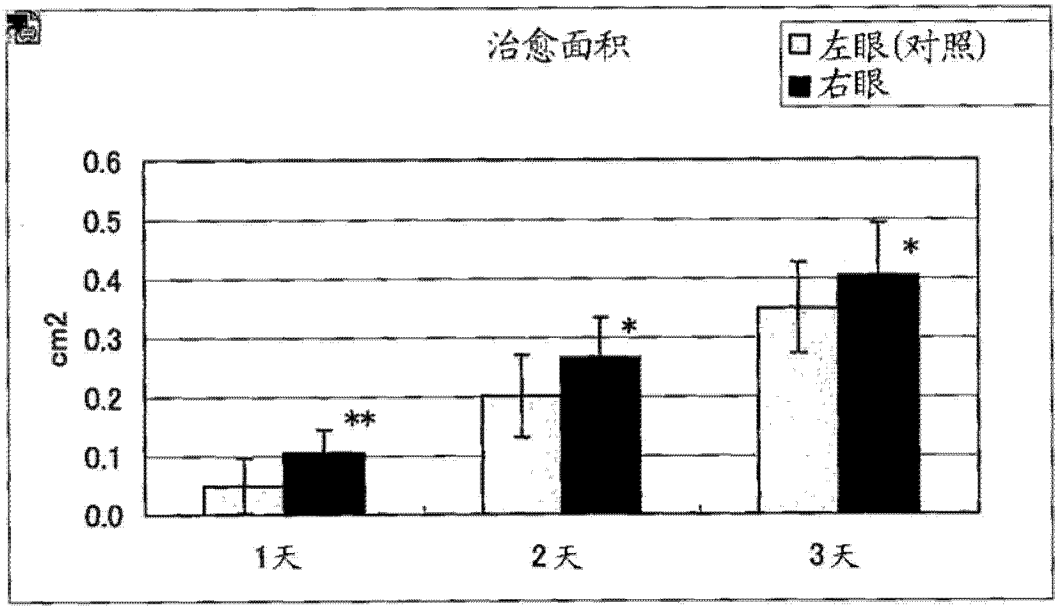
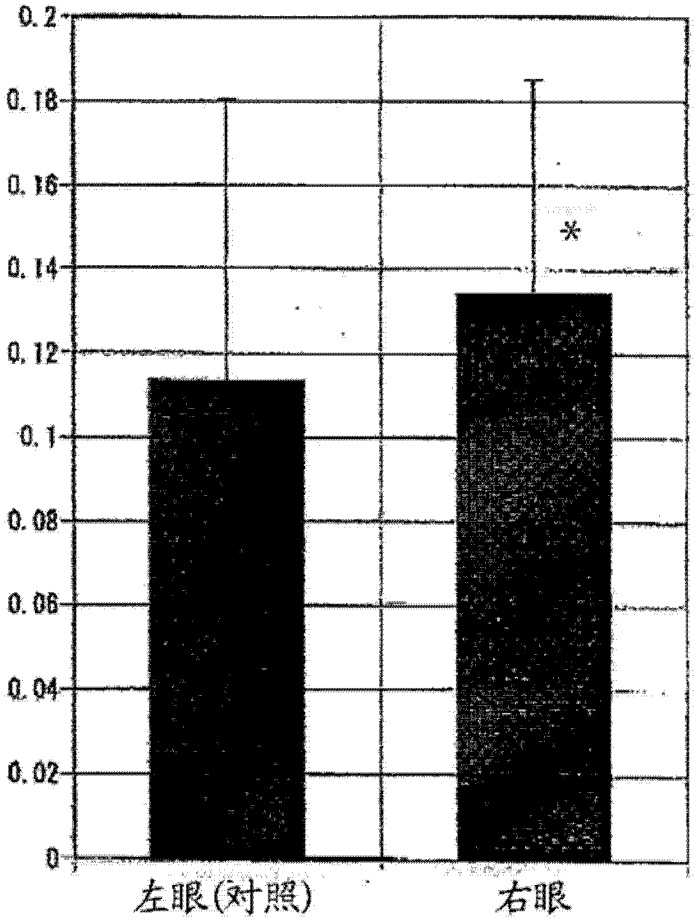

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(%)
1
2
3
4
5
6
右眼
左眼(对照)

图 2



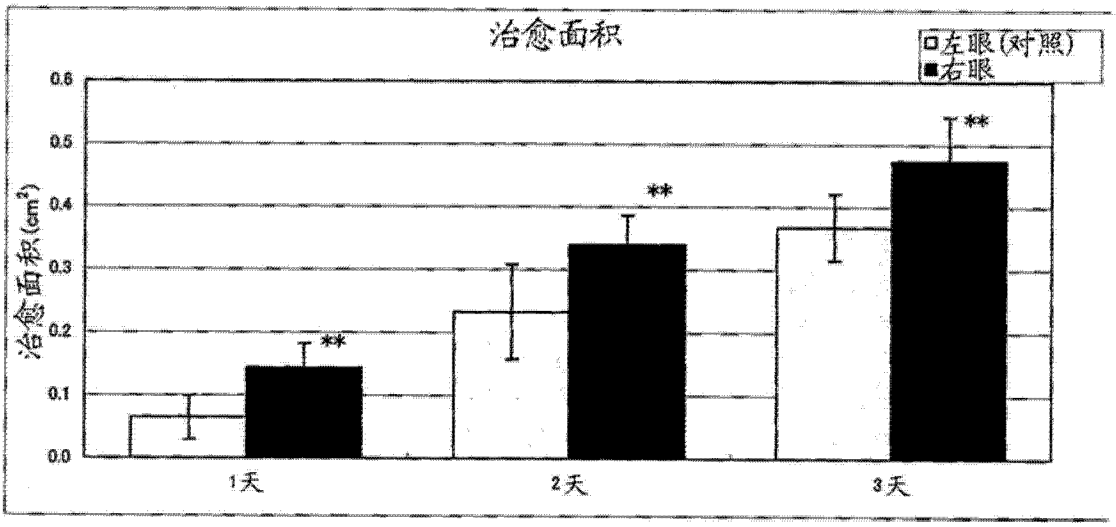
治愈面积(n=14,平均值±SD,* : P<0.05, ** : P<0.01)

图 3



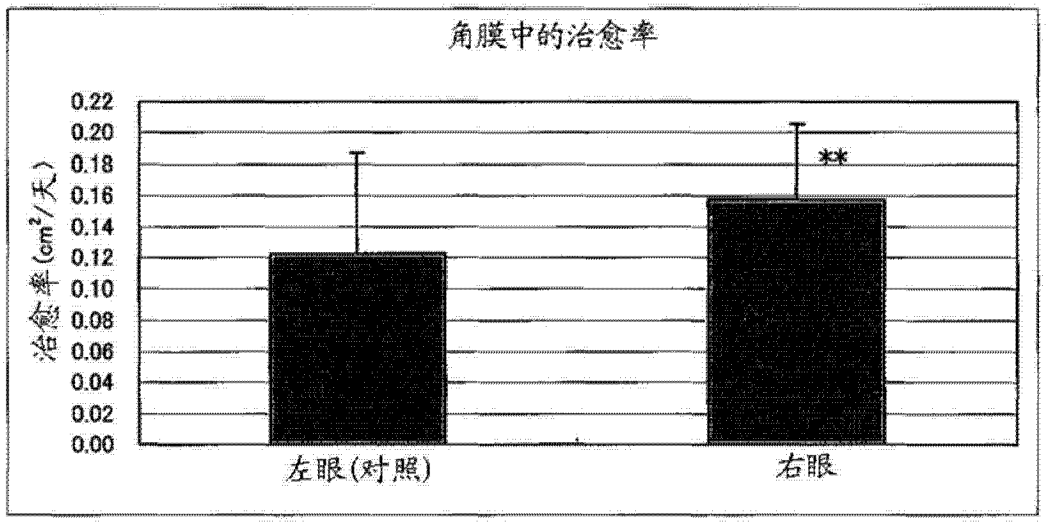
治愈率(cm²/天, n=42(n=14×3次), 平均值±SD, *: P<0.05)

图 4



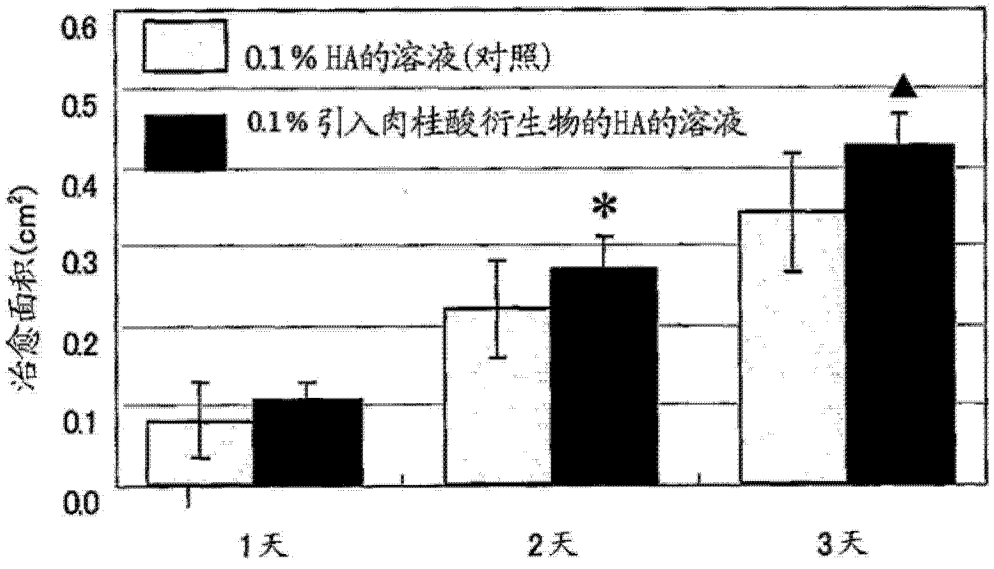
治愈面积(n=14,平均值±SD、**：P<0.01)

图 5



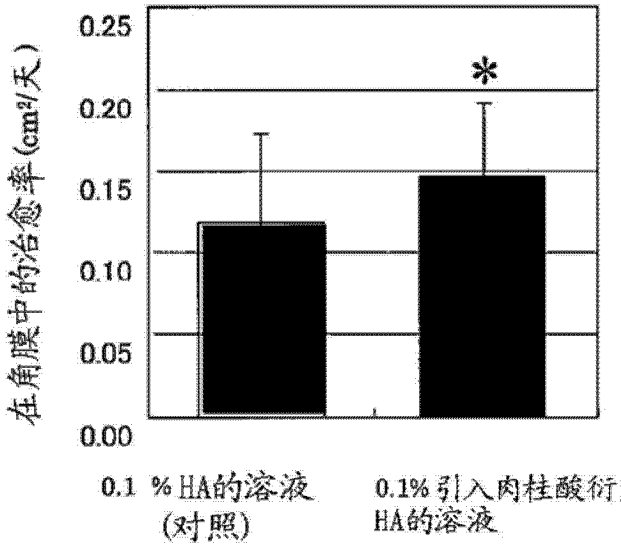
治愈率(n=42(n=14×3次)，平均值 ±SD、**：P<0.01)

图 6



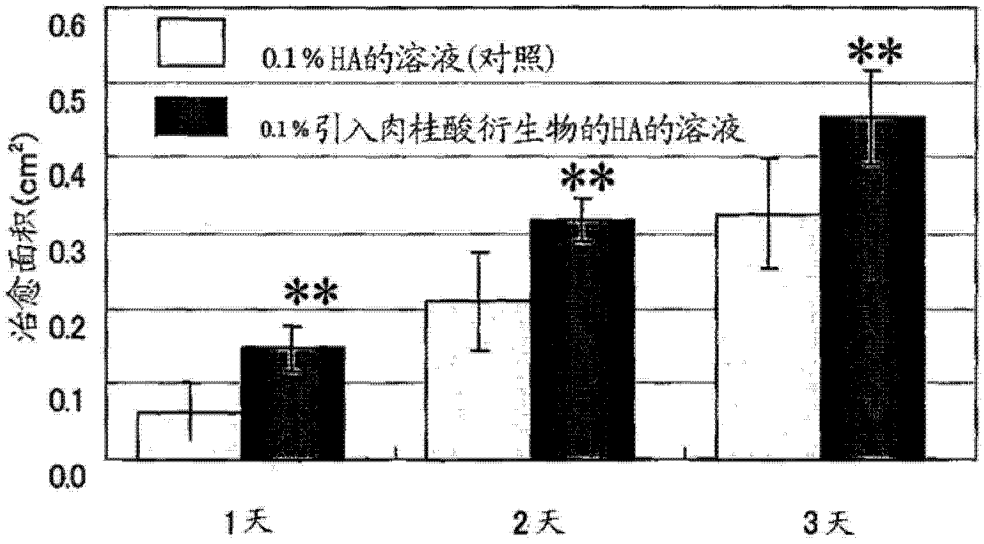
治愈面积(N=8, * : P<0.05, ▲ : P<0.0556)

图 7



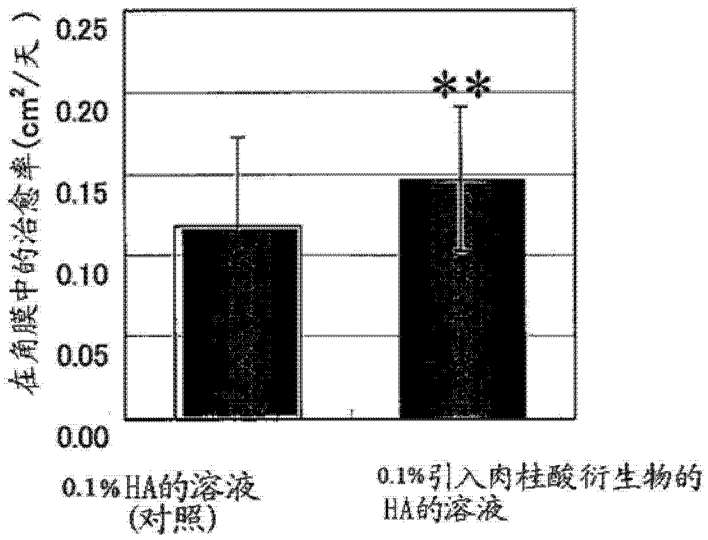
治愈率(n=24 (n=8×3次), 平均值±SD、＊ : P<0.05)

图 8



治愈面积(N=8, ＊：P＜0.01)

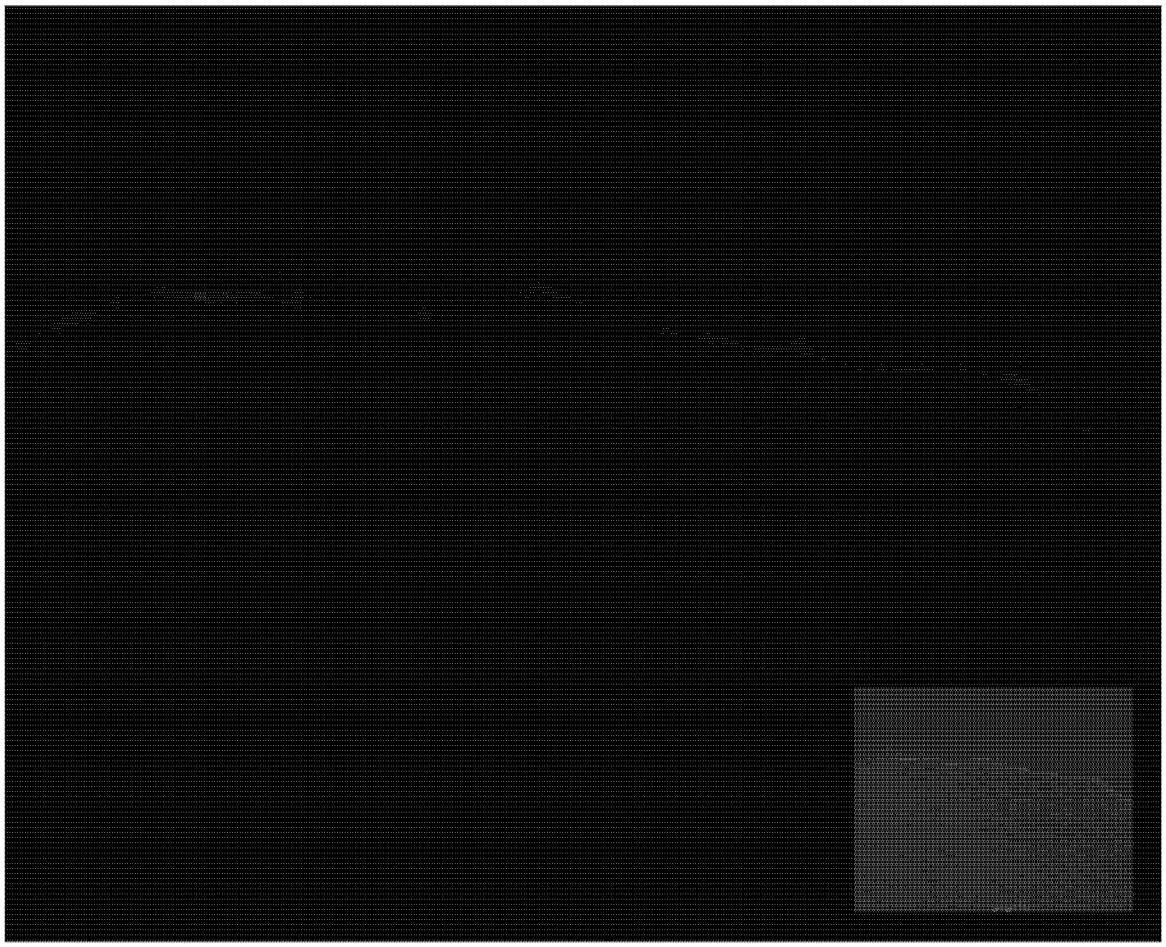
图 9



治愈率(n=24（n=8×3次），平均值±SD、＊＊：P＜0.01)

图 10

a.

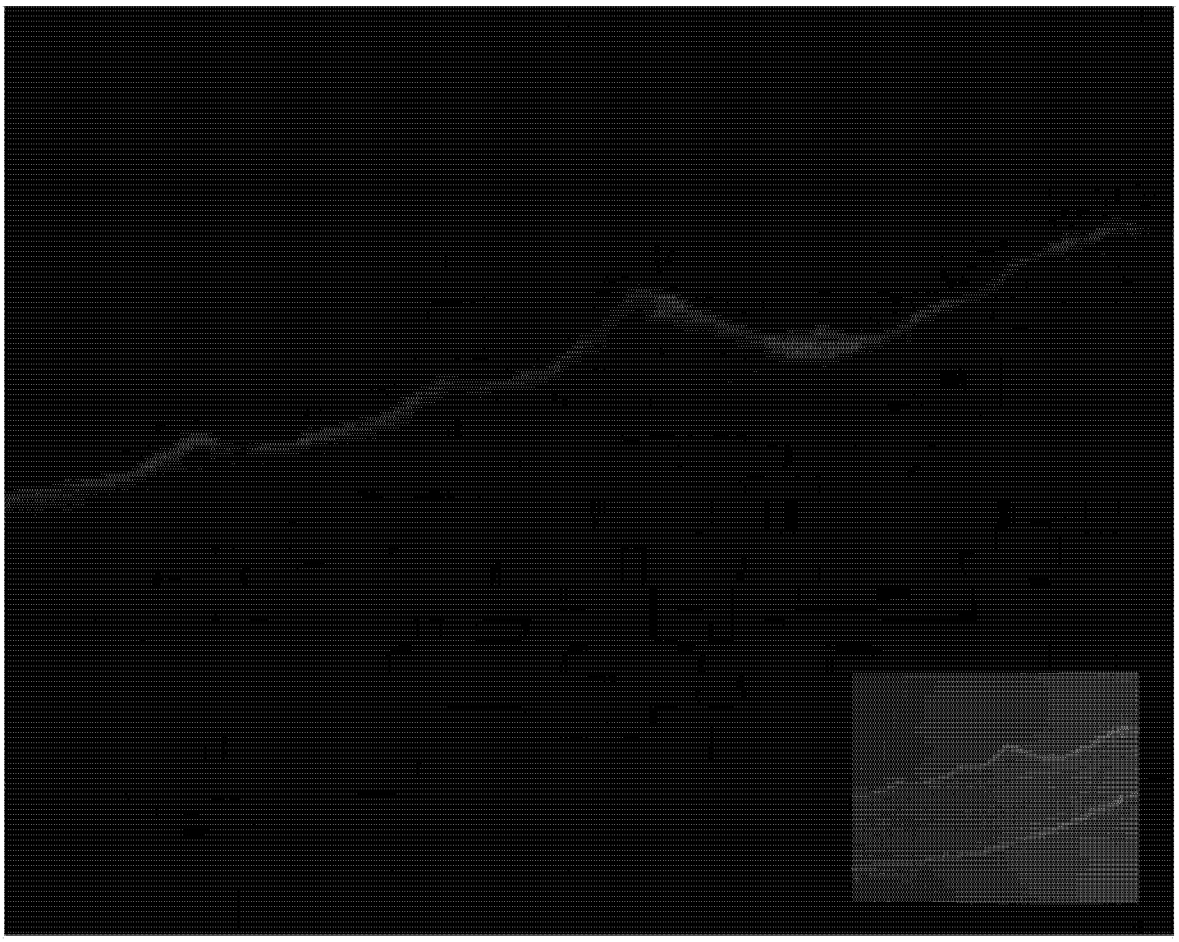


a. 0.3%荧光素标记的HA的溶液
给药后30分钟

FA图像:激发波长:495 nm,吸收波长:460 nm

图 11

b.



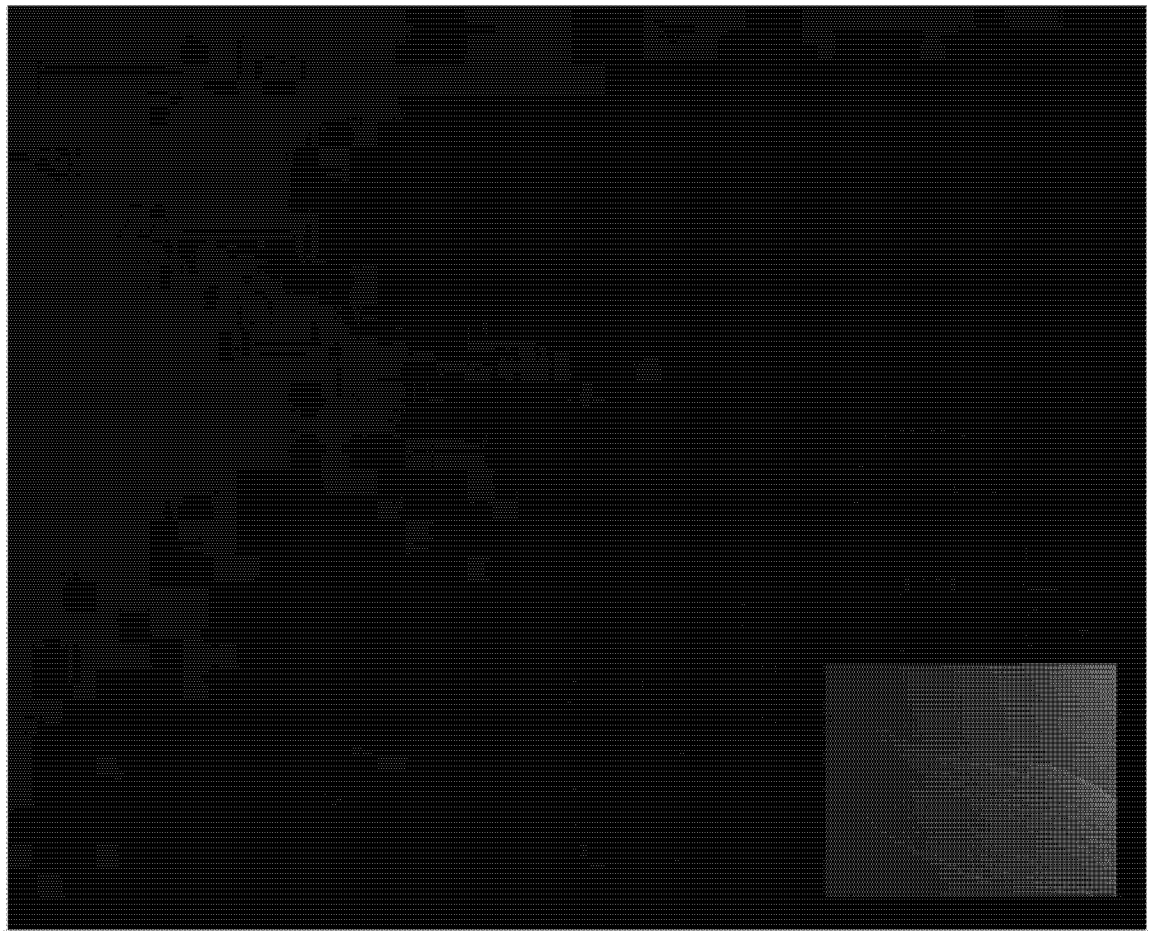
b. 0.3% 荧光素标记的引入
肉桂酸衍生物的HA的溶液

给药后30分钟

FA图像:激发波长; 495 nm,吸收波长; 460 nm

图 11

c.



c. 0.3% 荧光素标记的HA的溶液

给药后1小时

FA图像：激发波长：495 nm，吸收波长：460 nm

图 11

d.



d. 0.3%荧光素标记的引入肉桂酸衍生物的HA的溶液
给药后1小时

FA图像：激发波长：495 nm，吸收波长：460 nm

图 11

a.

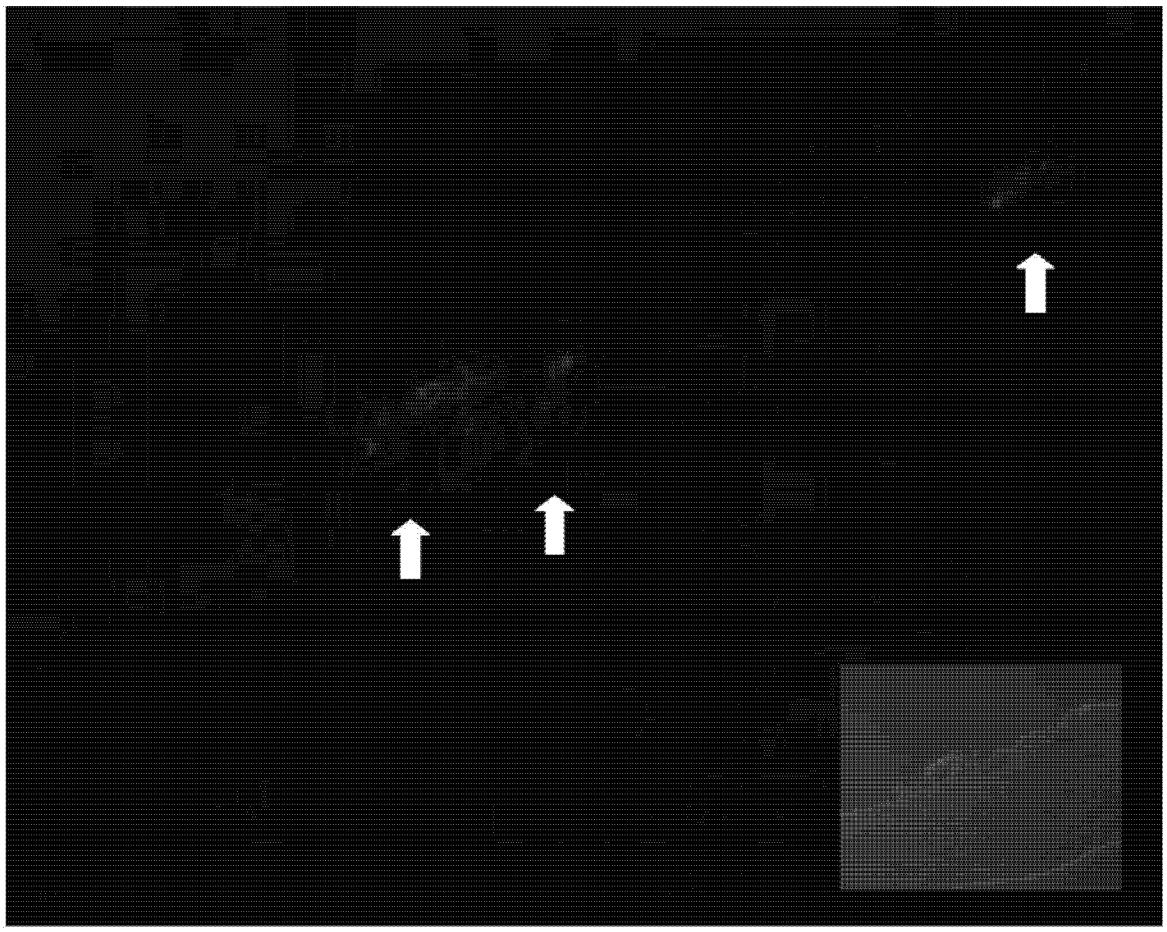


a. 0.3%荧光素标记的HA的溶液
给药后1.5小时

FA图像:激发波长:495 nm,吸收波长:460 nm

图 12

b.



b. 0.3%荧光素标记的引入
肉桂酸衍生物的HA的溶液

给药后1.5小时

FA 图像:激发波长;495 nm,吸收波长;460 nm

图 12

c.



c. 0.3%荧光素标记的HA的溶液
给药后2.5小时

FA 图像：激发波长：495 nm，吸收波长：460 nm

图 12

d.



d. 0.3%荧光素标记的引入
肉桂酸衍生物的HA的溶液

给药后2.5小时

FA图像:激发波长;495 nm,吸收波长;460 nm

图 12

0.3 % HA的溶液



0.3 % 引入肉桂酸衍生物的HA的溶液

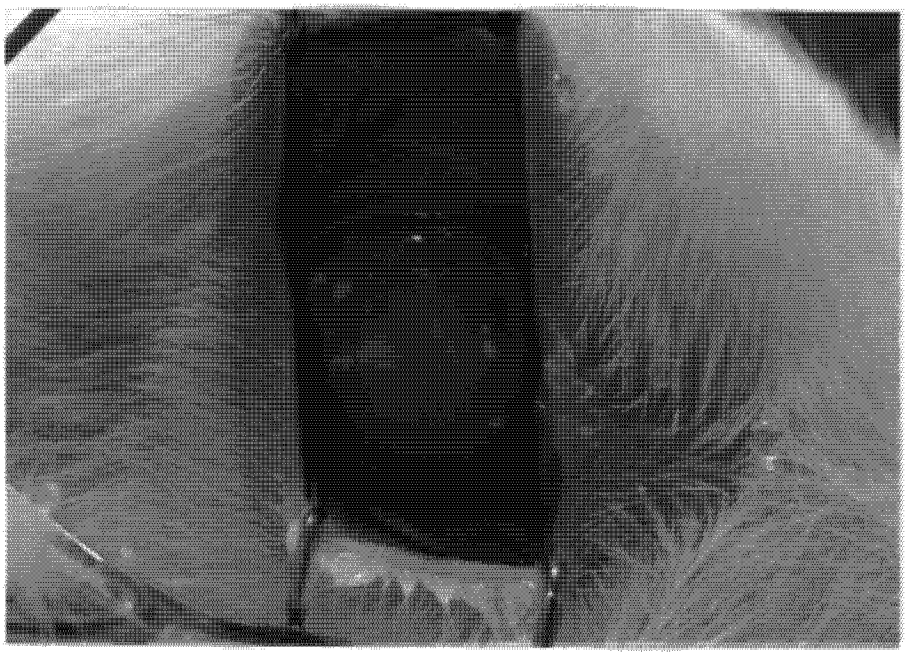


图 13

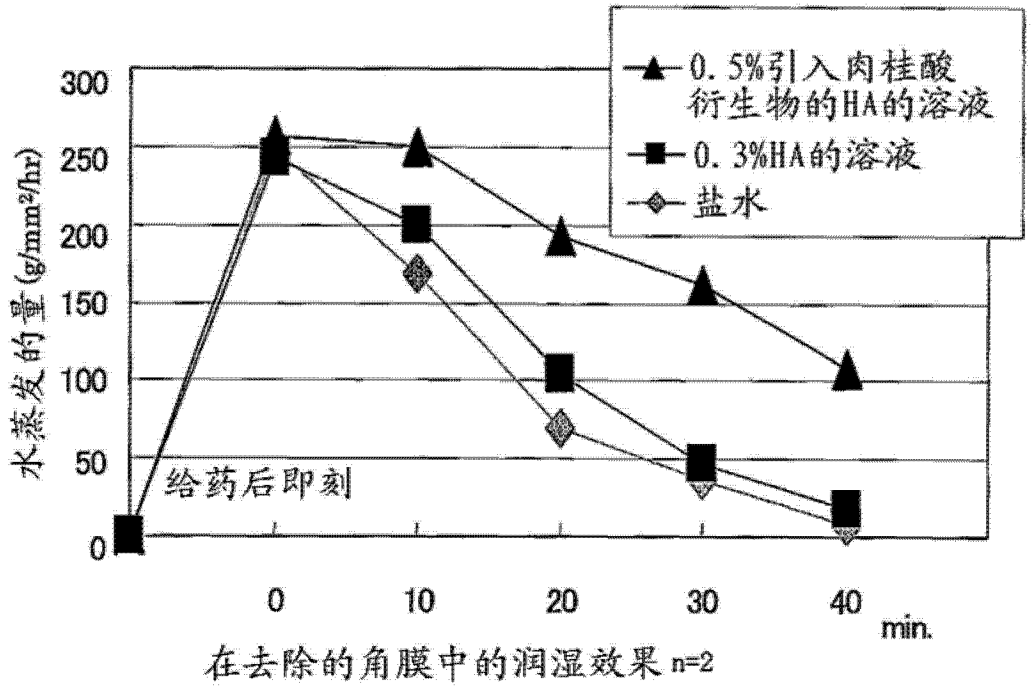

0.5%引入肉桂酸衍生物的HA的溶液
0.3%HA的溶液
盐水
水蒸发的量(g/mm²/hr)
300
250
200
150
100
50
0
给药后即刻
0
10
20
30
40
min.
在去除的角膜中的润湿效果 n=2

图 14

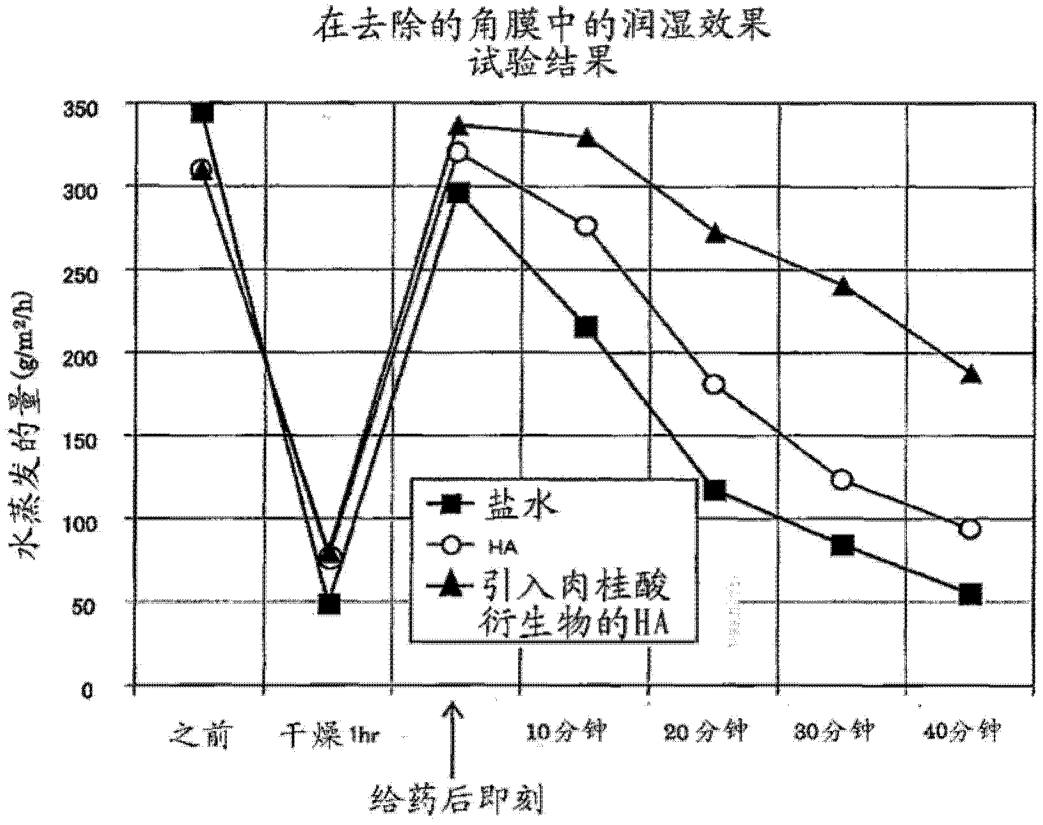
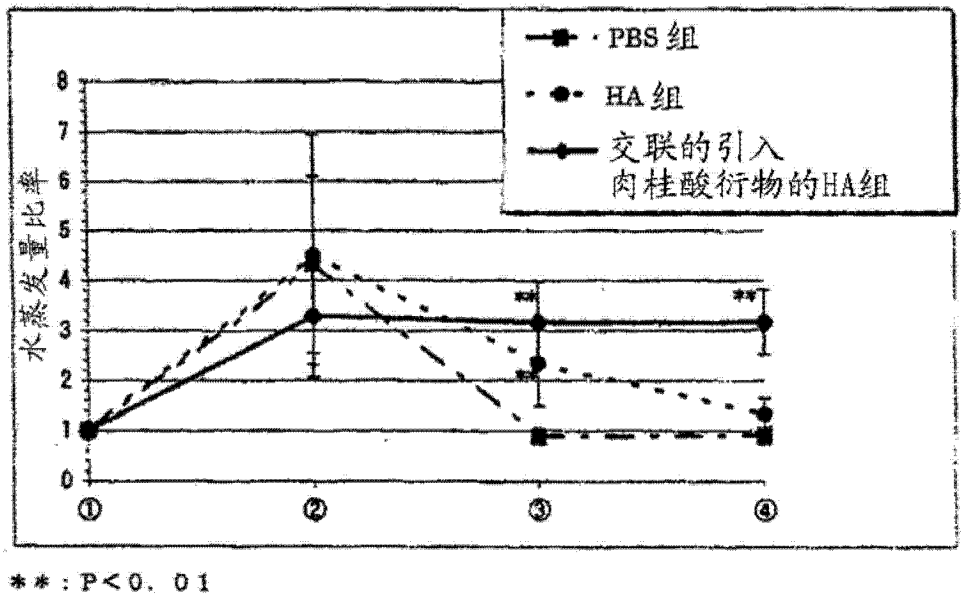
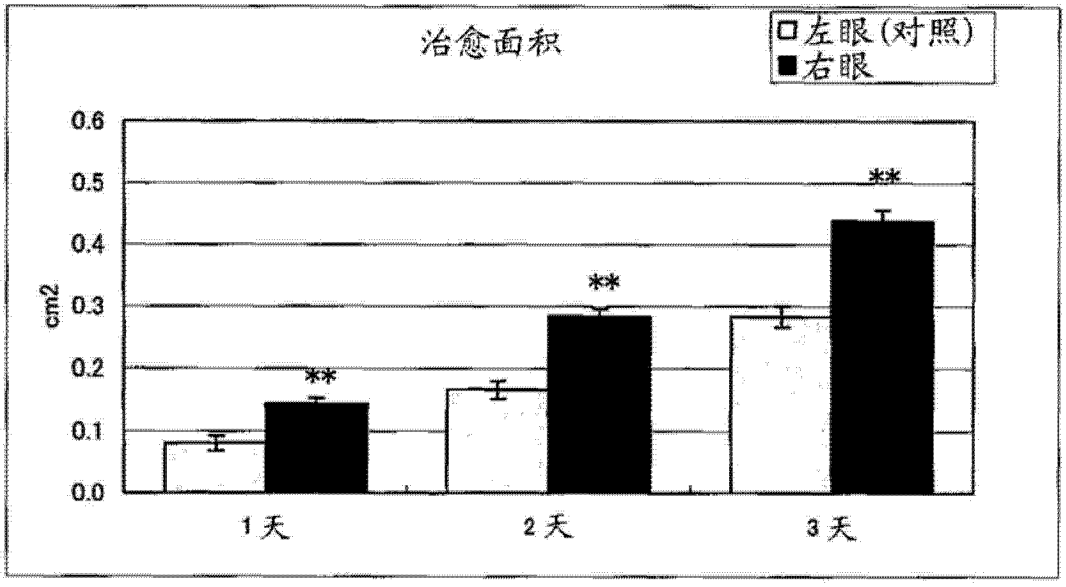

在去除的角膜中的润湿效果
试验结果
水蒸发的量(g/m²/h)
350
300
250
200
150
100
50
0
盐水
HA
引入肉桂酸衍生物的HA
之前
干燥1hr
给药后即刻
10分钟
20分钟
30分钟
40分钟

图 15



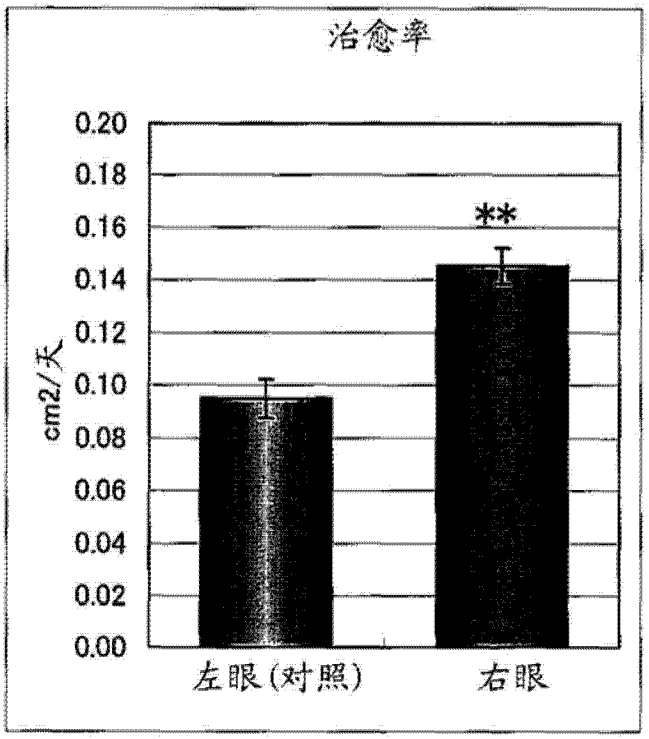
**：P＜0．01

图 16



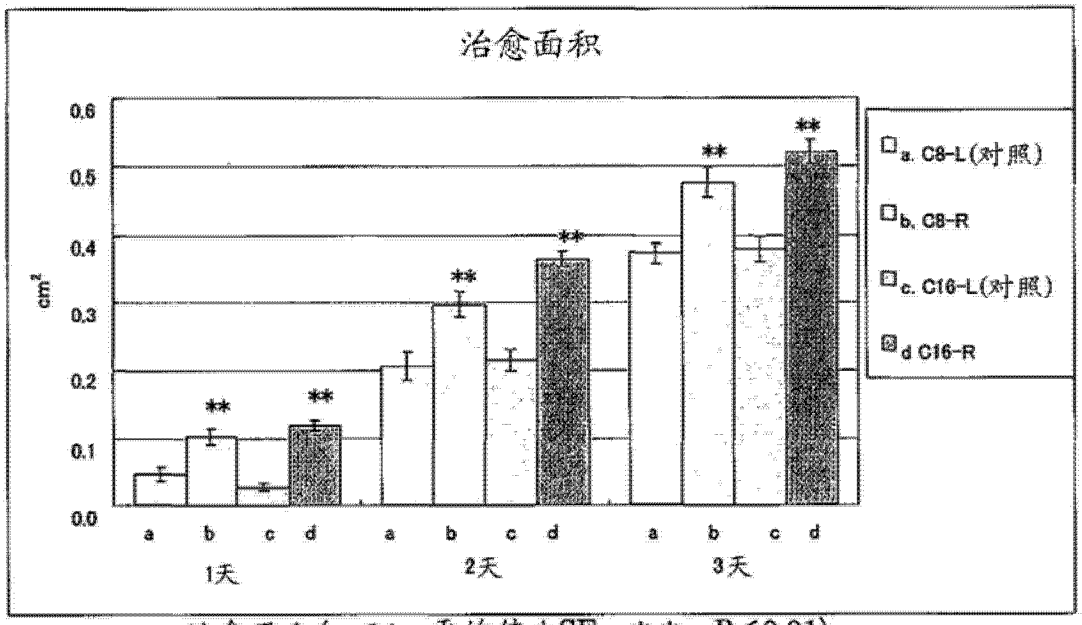
治愈面积(n=14、平均值±SE、**:P<0.01)

图 17



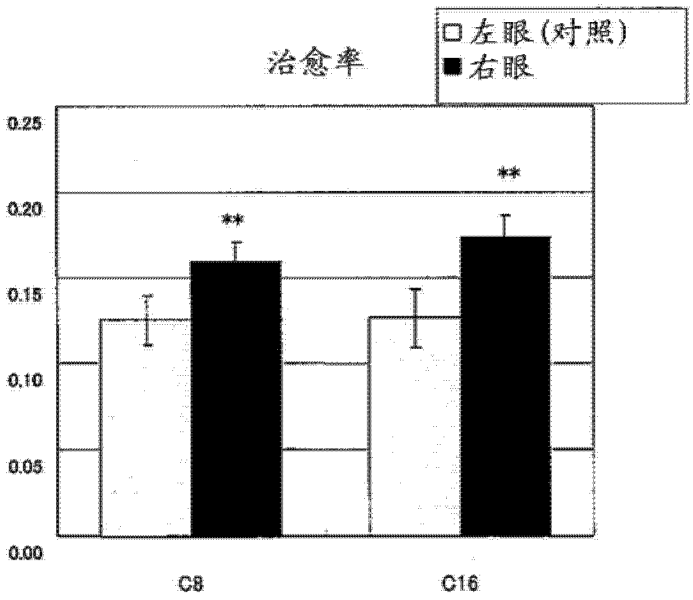
治愈率(n=42(n=14×3次), 平均值±SE、＊＊：P<0.01)

图 18



治愈面积(n=14, 平均值±SE、＊＊：P<0.01)

图 19



治愈率(cm²/天, n=24(n=8×3次), 平均值 ±SE、**:P<0.01)

图 20