[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 31/715
A61L 15/00 A61L 27/00
A61L 31/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99813261.6

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1157191C

[22] 申请日 1999.11.9 [21] 申请号 99813261.6

[30] 优先权

[32] 1998.11.10 [33] JP [31] 318969/1998

[32] 1999. 1.12 [33] JP [31] 5424/1999

[32] 1999. 1.27 [33] JP [31] 18017/1999

[32] 1999. 2.12 [33] JP [31] 33974/1999

[32] 1999. 2.19 [33] JP [31] 42372/1999

[86] 国际申请 PCT/JP1999/006232 1999.11.9

[87] 国际公布 WO2000/027405 日 2000.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2001.5.14

[71] 专利权人 电气化学工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 三好照三 北川広进 金子博
梅田俊彦 新井一彦

审查员 张 伟

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 章鸣玉

权利要求书 2 页 说明书 18 页

[54] 发明名称 透明质酸凝胶、其制造方法及含透明质酸凝胶的医用材料

[57] 摘要

用难溶于中性水，容易从注射器中推出的具有流动性的单纯透明质酸制成的透明质酸凝胶。

ISSN1008-4274

1.透明质酸凝胶，所述透明质酸凝胶的制造方法是：将含有无机盐的透明质酸水溶液调至 pH3.5 以下，将该水溶液冻结，然后解冻它，其中所述透明质酸的分子量为 1×10^5～1×10^7 道尔顿；在酸催化水解条件下进行处理透明质酸凝胶时，被增溶的透明质酸具有分枝结构，在被增溶的透明质酸中含有部分分枝度为 0.5 以上的分子量组分；所述凝胶由单纯透明质酸所形成，所述凝胶难溶于中性水，在注射器中容易推出的具有流动性。

2.如权利要求 1 所述的透明质酸凝胶，其特征为：在 37℃中性水溶液中放置 12 小时其溶解率在 50%以下。

3.如权利要求 1 ～ 2 之一所述的透明质酸凝胶，其特征为具有透明性。

4.如权利要求 1 所述的透明质酸凝胶的制造方法，其特征为：将含有无机盐的透明质酸水溶液调至 pH3.5 以下，将该水溶液冻结，然后解冻。

5.含透明质酸凝胶的医用材料，所述透明质酸凝胶具有流动性，或既有流动性又有透明性，所述透明质酸凝胶由单纯的透明质酸形成，所述透明质酸凝胶的制造方法是：将含有无机盐的透明质酸水溶液调至 pH3.5 以下，将该水溶液冻结，然后解冻它，其中所述透明质酸的分子量为 1×10^5～1×10^7 道尔顿；所述透明质酸凝胶满足以下(a)、(b)条件：

(a) 在 37℃中性水溶液中放置 12 小时其溶解率在 50%以下；

(b) 酸催化水解处理时透明质酸凝胶可溶化出具有分枝结构的透明质酸，在被增溶出的透明质酸中含有部分分枝度为 0.5 以上的分子量组分。

6.含有透明质酸凝胶及未凝胶化透明质酸的医用材料，其中所述透明质酸凝胶的制造方法是：将含有无机盐的透明质酸水溶液调至 pH3.5 以下，将该水溶液冻结，然后解冻它，其中所述透明质酸的分子量为 1×10^5～1×10^7 道尔顿；所述透明质酸凝胶具有如下性质：

(a) 在 37℃中性水溶液中放置 12 小时其溶解率在 50%以下；

(b) 酸催化水解处理时透明质酸凝胶可溶化出具有分枝结构的透明质酸，在被增溶出的透明质酸中含有部分分枝度为 0.5 以上的分子量组分。

7.如权利要求 5 或 6 所述的医用材料，所述医用材料为关节疾病治疗用注射剂。

8.如权利要求 5 或 6 所述的医用材料，所述医用材料为栓塞形成材料。

9.如权利要求 5 或 6 所述的医用材料，所述医用材料为软组织注射剂。

10.如权利要求 5 或 6 所述的医用材料，所述医用材料为玻璃体代用品。

透明质酸凝胶、其制造方法及含透明质酸凝胶的医用材料

技术领域

本发明涉及具有流动性和既有流动性又有透明性的新型透明质酸凝胶和它的制造方法，以及含有透明质酸凝胶的对身体有良好适应性的医用材料。

技术背景

透明质酸(以下简称 HA)是由β-D-N-乙酰氨基葡萄糖和β-D-葡糖醛酸交织成的直链状高分子多糖。透明质酸除了分布在哺乳动物的结缔组织中，还存在于鸡的鸡冠和链球菌的荚膜等之中。除了可用鸡的鸡冠，脐带等作为抽提的原材料外，也可从链球菌的培养物中调制出精制物。

天然 HA 有多种不同的分子量，但没有种和器官的特异性。将其移植入生物体内或注入体内，可表现出非常良好的生物适应性。但是，在实际使用时由于适应机体的 HA 溶液在体内滞留时间比较短，故为了将其用途向医用材料拓展，试用了多种多样的化学修饰剂对 HA 进行交联处理使其延长滞留性。

(I)来看一下关节，在机体关节腔中关节液除了供给关节软骨营养以外，还具有其它液体未有的良好润滑功能和吸收冲击功能。已知，这种良好的粘弹性功能是受关节液中主要成分之一的 HA 所支配的。

一般说，测定变形性关节炎、慢性风湿性关节炎等各种关节病患者的关节液中 HA 的浓度以及分子量，从结果来看与正常关节相比其浓度和分子量均较低。故认为这与关节液润滑功能及关节软骨表面保护作用的低下所引起的运动功能障碍或疼痛症状的发生等有着密切的联系。

在这些关节疾病中，近年广泛采用了在患侧关节腔内注射高分子量 HA 溶液作为治疗变形性关节炎的有效手段(Artz:生化学工业制，平均分子量 90 万；Hyalgan ：Fidia 制，平均分子量<50 万)。这些是从鸡冠中提取的高纯度精制成的 HA。由鸡冠中提取并精制成的 HA 是一种原来机体中就存在的东西，因此非常安全，并可获得有效的治疗效果。通常为了获得此效果，必须给药数次～10 次。

给兔子关节腔内注入分子量100万以下的HA后，HA在关节腔内滞留时间的试验中，可测试到给药后1-3天关节腔中的HA便消失了。所以必须频繁地给药[血液凝固和纤维素分解(Blood Coagulation and Fibrinolysis, Vol.2,173,1991)]。

一方面，体内存在的HA的分子量本来就有数百万～1千万，近似于机体内高分子量HA的HA可望有更好的效果，所以开发了用化学交联剂处理过的交联式HA作为膝关节炎的治疗药物[Hylan : Biomatrix制]。

这种交联式HA在上述兔关节腔内滞留时间的试验中被认为可滞留长达20天～30天时间。因此临床试验结果也已证实了给药3次便可得到十分满意的效果。现在作为关节炎的治疗药已被应用[风湿病学期刊-(Journal of Rheumatology Vol.20,16,1993)]。

(II)其次来看一下栓塞，栓塞形成的治疗法在脉管性疾病、动脉瘤及畸型静脉瘤等各种疾病的治疗中被认为是一种有效的方法。而且 通过阻断供给肿瘤营养的动脉通路，在肿瘤的治疗中也被认为是一种有效的方法。

在栓塞形成法的实施过程中有好几种提案。例如：开发了一种气囊栓塞形成法,此方法使用在一端装入气囊的导管(W. Taki等, Surg.Neurol, Vol.12, 363, 1979)。此外还有，通过导管导入气囊和甲基丙烯酸2-羟基乙酯(HEMA)单体-聚合催化剂的方法(W. Taki等, Surg.Neurol, Vol.13, 140, 1980)。

在癌动脉栓塞疗法中，有报导用含顺铂壳多糖的病例(田原等，癌和化学疗法，21卷，13号，2225页，1994年)；有报导用吸附顺铂的聚(1-谷氨酸苄酯)微球体的病例(Li C 等,Parm.Res.,Vol.11(12),1792,1994),有报导在SMANCS和碘油悬浊液中用明胶海绵作为栓塞材料的病例（中村等，癌与化学疗法，22卷，11号，1390页，1996年）。还有报导用聚(DL-乳酸)微球体作为化学栓塞材料与持续注入化疗药物适当组合在一起进行治疗(Flandroy p等，J Control Release, Vol. 44(2/3),153,1997)。文献中记载了持续数天反复使用本法时有进行生物分解的必要。

在气囊栓塞形成法中，因气囊去湿后闭塞期短，很难得到十分有效的结果。且在HEMA单体聚合方法中，尚存在是否能在导管中产生聚合等诸多问题。而且，在化学栓塞疗法中使用的栓塞材料多为合成材料，很少有生物分解性的，故存在机体是否适应的问题。在用聚(DL-乳酸)微球体时，若反复给予，仅在生物分解方面即不能完全保证安全性。

HA 因有良好的机体适应性，故安全性方面没问题。但，仅仅给于 HA 溶液是不会形成栓塞的，且希望提高 HA 在局部的滞留性和贮留性。

(III)从软组织方面考虑：为修复或膨胀软组织，可在软组织中注入各种材料。自从发明了皮下注射针后，用作治疗的各种材料得到了迅速发展。为了矫正软组织和皮肤，可在人体中注入多种物质。其中，注入液态硅的方法被广泛采用。但是，由于液态硅的长期残留可产生皮肤溃疡样变的副作用，最近已不太使用。另外还采用了胶原的注入法，所用的胶原有用交联剂修饰过的化学交联物和纤维状胶原等各种各样物质。注入交联剂的固体胶原时需要手术切开。且在整形性和柔软性方面还有问题。在美国专利 3949073 号中记载了整形为纤维状的胶原。

但是，此种胶原中的液体成分被吸收后其胶原的体积缩小，有补充的必要。而且注入此类型胶原的话，除去免疫物质之类污染物是较困难的，费用又高，各方面性能也不能说是最理想。

曾试用过作为软组织注射剂的 HA(Ann. Plast. Surg., Vol. 38,308,1997)。HA 溶液因体内吸收快，为提高 HA 在软组织内的滞留性和贮留性，试用过多种 HA 的化学交联法(美国专利第 4582865 号说明书，特公平 6-37575 号公报，特开平 7-97401 公报，特开昭 60-130601 号公报)。

因此，例如在欧洲就有作为 Hylaform 出售的佩兰 B 凝胶(The Chemistry Biology and Medical Application of Hyaluronan and its Derivatives Vol. 72, p278, PORTLAND PRESS)。

(IV)其次来看一下眼球后部，特别是与玻璃体相连的视网膜。视网膜形成眼内空间的后部界面，和晶状体、睫状体共同形成一个完整的眼球。视网膜有二层，与玻璃体液直接接触的感受器层有感光性细胞；与脉络膜相邻的一层由色素上皮细胞组成。感受器层中若有流体进入时便会使视网膜的二层分离，产生视网膜的剥离。

治疗视网膜剥离的方法，如有光凝固、冷冻凝固等方法，使剥离的视网膜与色素上皮及脉络膜附着从而使视网膜闭锁。在附着时，用内向扣环从外侧向巩膜和脉络膜方向施压的方法，及注入使玻璃体液容量增加的物质，通过玻璃体液对视网膜加压的方法。

在后一种情况中会发生因重吸收不完全而引起出血的现象，或者是视网膜剥离时所并发的膜向内侧生长所引起的那种必须用手术来部分或全部取出

玻璃体液的症状。对于这类病人可试用各种类型的玻璃体代用品。

象这类玻璃体代用品，不仅可以维持眼球的形状，而且在某些程度上使玻璃体从腔内侧将视网膜压向色素上皮，从而达到视网膜复位的目的。

玻璃体的代用品有生理盐水、甘油酯、动物玻璃体、空气、各种气体、聚乙烯醇、胶原凝胶、硅油、HA，及全氟化碳等，现在常用的有空气、六氟化硫等气体、硅油及全氟辛烷、全氟萘烷等全氟化碳类液体。

用作玻璃体代用品的各种气体为膨胀性气体。或者直接使用或和空气混合使用，其用途已被确认[American Journal of Ophthalmology, Vol. 98,180,1984]。

但是，因气体的膨胀可产生眼压上升和瞳孔封闭等并发症，与角膜内皮的接触可引起角膜混浊等。而且，手术后患者需要长时间保持俯首的姿势，所以给患者带来了很大的不便。

利用硅油几乎不被吸收这一点，可长期保持眼内空间，是促进视网膜附着的有效物质[Retina Vol. 7,180,1987]。在获得视网膜附着的效果后才去除。但据称有白内障，青光眼及对眼组织毒性作用等重大问题[眼科 Vol. 27,1081,1985]。

全氟化碳液作为玻璃体代用品使用时，有增殖型玻璃体视网膜症，白内障及低眼压等合并症。但是否较硅油或气体更安全有效尚存有疑问[新眼科Vol. 12,1053,1955]。

自从 Balazs[Mod. Probl. Ophthalmol., Vol. 10,3,1972]报道 HA 适用于眼科领域以来已进行过众多探讨。现在在眼科手术中特别是在眼内晶状体植入术中很常用。

HA 通常是存在于机体中的物质，不可能产生毒性和免疫反应。但是，将 HA 注入玻璃体内后若不分解而是溶解于房水，通过前房和巩膜静脉窦排出眼外的话，这样对治疗重症视网膜剥离患者来说，其保持眼内空间持续时间的效果不是十分满意。

在用 HA 的玻璃体注入物中，如特开平 5-184663 号公报中记载的那样，含分子量 90 万以上(最好是 160 ～ 200 万)的 HA 1.5 重量%，最好是 2～2.5 重量%的注入物在眼内贮留性差[日本眼科纪要 Vol. 38,927,1987]，而且超过 1 重量%的这些分子量的 HA 溶液注入玻璃体内时会增加注射器的负荷，故认为不实用。

如上例所述，各种用途中多提示有必要提高 HA 在体内的贮留性，故用多种多样的化学修饰剂对 HA 进行交联处理。(美国专利第 4582865 号说明书，特开昭 60-13060 号公报，特开昭 63-28166 号公报，特公平 6-37575 号公报，特公平 6-69481 号公报，特开平 7-97401 号公报，特开平 9-59303 号公报)。光交联性 HA 凝胶是用紫外线照射光交联性 HA 衍生物而制成(特开平 8-143604 号)。

但是，象这类交联 HA 其本质上已不再是 HA 了，即使进行去除交联剂的操作，要完全否认有交联剂的残留也是很困难的。也不能无条件地保证所希望的对机体具有适应特性的物质多是无毒性，无抗原性的物质。

我们最早发现了不使用交联剂，用单纯的 HA 制成水难溶性 HA 凝胶的简便方法(PCT/JP98/03536 号)。这些 HA 凝胶，有片状，膜状，破碎状，海绵状和块状等，可是均不具备流动性。

在此，认为具有水难溶性和流动性的 HA 材料有多种医疗用途，便提出了将水难溶性粒状 HA 凝胶或破碎的水难溶性 HA 凝胶混悬于水中制成 HA 凝胶浆的方案。这种 HA 凝胶浆不仅具有流动性而且放入针筒后容易推出，具有实用性。

发明的揭示

为了最大限度地发挥 HA 本身所具有的对机体良好适应性的特点，期望有一种不用化学交联剂，也不用化学修饰剂的水难溶性并有流动性的 HA 凝胶。但 因这种物质现在尚未开发出，故只好提出将水难溶性 HA 凝胶破碎物混悬于水溶液中制成 HA 凝胶浆的方案。

为了得到这种 HA 凝胶浆，需要使用超声波或混合器等对水难溶性 HA 凝胶进行粉碎，这样便有增加制造工序的问题。

一般说，有透明性的产品有利于质量的管理。另外，在眼科领域中 HA 凝胶作为玻璃体代用品使用时，从操作方面来考虑需要有流动性，从效果来考虑需要有透明性，最好其折射率近似于玻璃体的折射率(1.3345～1.3348；眼科诊疗实践，Vol. 22, pp234, 1996, 文光堂，东京)。但 要满足这些性能的 HA 凝胶还未开发出来。

发明者认为，不用交联剂的单纯 HA 所形成的水难溶性 HA 凝胶其本身就保持了 HA 溶液的流动性，这使调制具有透明性的水难溶性 HA 凝胶成为可能，

使 HA 凝胶的用途变的更广，对此进行了锐意见研究，直至完成了本发明。

也就是说， 本发明为：

(1) 透明质酸凝胶，所述透明质酸凝胶的制造方法是：将含有无机盐的透明质酸水溶液调至 pH3.5 以下，将该水溶液冻结，然后解冻它，其中所述透明质酸的分子量为 1×10^5～1×10^7 道尔顿；在酸催化水解条件下进行处理透明质酸凝胶时，被增溶的透明质酸具有分枝结构，在被增溶的透明质酸中含有部分分枝度为 0.5 以上的分子量组分；所述凝胶由单纯透明质酸所形成，所述凝胶难溶于中性水，在注射器中容易推出的具有流动性 ；

(2)在(1)中所述的 HA 凝胶，其特征为：在 37℃中性水溶液中 12 小时的溶解率低于 50%；

(3)在(1) ～(2)任何一项中所述的 HA 凝胶，具有透明的特征；

(4)在(1)中所记载的 HA 凝胶的制造法，其特征为：将含有无机盐的 HA 水溶液的 pH 值调到 pH 3.5 以下，将该水溶液冻结、然后解冻；

(5) 含透明质酸凝胶的医用材料，所述透明质酸凝胶具有流动性，或既有流动性又有透明性，所述透明质酸凝胶由单纯的透明质酸形成，所述透明质酸凝胶的制造方法是：将含有无机盐的透明质酸水溶液调至 pH3.5 以下，将该水溶液冻结，然后解冻它，其中所述透明质酸的分子量为 1×10^5～1×10^7 道尔顿；所述透明质酸凝胶满足以下(a)、(b)条件：

(a) 在 37℃中性水溶液中放置 12 小时其溶解率在 50%以下；

(b) 酸催化水解处理时透明质酸凝胶可溶化出具有分枝结构的透明质酸，在被增溶出的透明质酸中含有部分分枝度为 0.5 以上的分子量组分；

(6) 含有透明质酸凝胶及未凝胶化透明质酸的医用材料，其中所述透明质酸凝胶的制造方法是：将含有无机盐的透明质酸水溶液调至 pH3.5 以下，将该水溶液冻结，然后解冻它，其中所述透明质酸的分子量为 1×10^5～1×10^7 道尔顿；所述透明质酸凝胶具有如下性质：

(a) 在 37℃中性水溶液中放置 12 小时其溶解率在 50%以下；

(b) 酸催化水解处理时透明质酸凝胶可溶化出具有分枝结构的透明质酸，在被增溶出的透明质酸中含有部分分枝度为 0.5 以上的分子量组分

(7)在(5)或(6)中所记载的医用材料，其特征是可用作治疗关节疾病的注射剂；

(8)在(5)或(6)中所记载的医用材料，其特征是作为栓塞形成材料；

(9)在(5)或(6)中记载的医用材料，其特征是作为软组织注入剂；

(10)在(5)或(6)中记载的医用材料，其特征是作为玻璃体的代用品。

实施发明的最佳状态

以下详细地说明本发明的内容。

本发明中使用的 HA 其原料无论是从动物组织中抽出的，还是用发酵法制造出的都是可以使用的物质。

在发酵法中所使用的菌株是从自然界分离出的链球菌类，是能生产 HA 的微生物。在特开昭 63-123392 号公报中记载的马链球菌 FM-100(微工研菌种保藏号第 9027 号)和特开平 2-234689 号公报中记载的马链球菌 FM-300(微工研菌种保藏号第 2319 号)是所期望的可以高效率生产安定的 HA 的变异株。我们所使用的系从上述变异株培养液中精制而成。

本发明中所用的 HA，其分子量最好是在约 1×10^5～约 1×10^7 道尔顿范围内。如分子量在上述范围内，或是经水解高分子量物质获得的低分子量物质，同样能被很好地使用。

本发明中所述的 HA 还包括了其碱金属盐，例如，钠盐，钾盐，锂盐。

本发明中所述的由单纯 HA 形成的凝胶中，除 HA 外没有使用化学交联剂和化学修饰剂。所形成的凝胶不是和阳离子高分子形成的复合体，而是自身交联而成。

本发明中所述的 HA 凝胶是一种有三维网状结构的高分子膨润体。此三维网状结构是根据 HA 的交联结构所形成的。

本发明中所说的难溶性，指在 37℃中性水溶液中所测定的 12 小时的溶解率低于 50%。当然如在 30%以下或低于 10%那更好。

本发明中所说的 HA 凝胶，是指在酸催化水解反应下处理 HA 凝胶，能够分解增溶。被增溶的 HA 保持了交联结构，同时具有分枝结构，这些能区别于高分子溶液论的直链状 HA。

本发明中所说的 HA 酸催化水解反应的条件，是指水溶液的 pH 1.5，温度在 60℃为宜。在酸性或碱性的水溶液中，通过 HA 糖苷键水解切断主链的反应，其程度比在中性水溶液中的显著。而且，在酸催化水解的反应中，温度越高越促进了反应。

本发明中采用了 GPC—MALLS 法，用 GPC 连续测定被分离分子量组分和分枝度。本发明采用溶出体积法来测定分枝度。具体地说，将同一溶出体积部分的增溶 HA 的分子量与作为对照的直链状 HA 的分子量进行比较，计算出分枝度。分枝度是指相当于 1 个被增溶 HA 的高分子链中所存在的分枝点数。从而标绘出被增溶 HA 的分子量。在 PCT/JP98/03536 号公报中叙述了这种根据溶出体积法来测定分枝度的 GPC—MALLS 方法。

用 GPC 溶剂来稀释被增溶的 HA，调节其浓度，然后通过 0.2m 的膜过 滤器后送测定。

本发明所指的 HA 凝胶中，其交联结构在酸催化水解的条件下乃能稳定存在。在高分子溶液论中已确认了增溶 HA 的分枝结构。本发明中的 HA 凝胶其分枝度在 0.5 以上。

本发明所述的容易从注射器中推出的意思是指将本发明的 HA 凝胶装入内径约 1cm 的 2.5～3ml 一次性用针筒内(以下称注射器)，装上外径约 0.8mm 的 21G 口径的一次性注射针，在近 25℃的室温中以 0.1ml/秒的速度推出，此时的推出力在 50N 以下。

本发明所述的透明度是指将本发明的 HA 凝胶放入长 10mm 分光光度计用比色杯中，在可见光 340nm～800 nm 的范围内，将水透过率作为 100%来计算其透过率时，透过率可达到 50%以上，较佳为透过率达 70%以上，更佳为达 90%以上。

在调整 HA 水溶液的 pH 时使用的酸，只要能将 pH 值调到 pH 3.5 以下，用什么样的酸都可以。为了降低酸的用量，最好用强酸，如盐酸、硝酸、硫酸等。

本发明的 HA 水溶液中添加的无机盐有钠盐，钾盐等一价金属盐。也可使用镁盐，钙盐，锰盐等二价金属盐。使用的金属盐最好为在 pH 3.5 以下条件下水溶性的盐。

金属盐中可使用各种形式如氯化物、硫酸盐、硝酸盐等。添加无机盐的浓度为 0.1～10 重量%，最好是 0.2～2.0 重量%。

浓度不到 0.1 重量%时容易形成固体，对调制有流动性的 HA 凝胶并不理想。但是，浓度超过了 10 重量%时凝胶形成的时间很长，在实际中此浓度也不理想。

HA 水溶液的 pH 值，是根据 HA 羧基充分质子化所需要的 pH 来调整的。pH 值的调整是根据 HA 盐的对离子种类、HA 的分子量、水溶液浓度、冻结及解冻的条件、及所生成凝胶的强度等多种特性来决定的。本发明是将 pH 值调到 3.5 以下，较佳为调到 pH 2.5 以下。

冻结和解冻是将调整好 pH 的 HA 酸性水溶液放入任意的容器中，根据所设定的温度使之冻结，冻结后在所设定的温度下解冻。至少进行一次这样的操作。

冻结和解冻的温度与时间是根据容器的大小、水溶液的量、HA 的分子量、水溶液的浓度、水溶液的 pH 值、所含金属盐的浓度、种类等诸多特性来决定

的。一般来说，以冰点以下的冻结温度、冰点以上的解冻温度为宜。

要冻结和解冻时间短的话，最好选择-5℃以下的冻结温度，5℃以上的解冻温度。在设定的温度下冻结和解冻时，时间如果超过冻结和解冻结束所需时间，问题不大。

已调整的 HA 酸性水溶液，其冻结和解冻反复操作的次数，是根据 HA 的分子量、水溶液浓度、水溶液的 pH 值、所含金属盐的浓度、冻结和解冻的温度与时间及所生成凝胶的强度等诸多特性来决定的。一般最好反复操作一次以上。

在反复冻结和解冻的操作时，即使改变冻结解冻的温度与时间，问题也不大。

为了避免 HA 的酸催化水解，在已调整的 HA 酸性水溶液经冻结和解冻后所得到的 HA 凝胶中必须去除调整酸性时所用的酸等成分。去除酸和无机盐等成分时通常用水性溶剂进行洗净透析。采用的水性溶剂只要不损坏 HA 凝胶的功能即可，没有特别的限制。如使用水、生理盐水、磷酸缓冲液等。最好采用生理盐水、磷酸缓冲液等。

洗净透析的方法无特别限制，最好采用透析法。在透析法中宜选择采用透析膜、超滤膜的方法等。透析的条件，包括液体量，次数，只要想去除的成分在目标浓度以下的条件就行。透析好的凝胶根据目的，调整 pH 值后使用。

本发明的 HA 凝胶在调制时，注意药剂、水、容器等，可得到无菌和无内毒素的产物。

总之，调制成的 HA 凝胶本身具有流动状态，不是悬浊状而是均一、透明状的。可以放在针筒和注射袋中使用。在形成流动性凝胶时，加入药学或生理学活性物质，也可形成含有这些物质的 HA 凝胶。

例如：为了达到促使栓塞形成的目的，可加入凝血酶，在血液凝固联级反应中促使纤维蛋白原转变成纤维蛋白，使血液凝固。为了达到促使肿瘤动脉闭塞的目的，可在凝胶中加入各种抗肿瘤药物等。这些没有特别的限制。

本发明的 HA 凝胶在体内的滞留性和贮留性与 HA 溶液相比有显著的提高。而且因未使用交联剂，具有较好的安全性和机体适应性，故适合用作关节疾病治疗用注入剂、栓塞形成材料、软组织注入剂，玻璃体代用品等医用材料。

以下用实施例来详细说明本发明，但本发明并不受此限定。

以下所述的注射器是内径约 1cm 的 2.5～3ml 一次性用针筒，注射针是外

径为 0.8mm 的 21G 一次性注射针。本发明中使用テルモ株式会社制造的 2.5ml 注射器(针芯直径约 12mm)，插入テルモ株式会社制造的 21G 一次性注射针。

实施例 1

将 HA 钠(从特性粘度换算的分子量：2×10^6 道尔顿)溶于 1.0 重量%氯化钠溶液中，配制成 1.0 重量%的 HA 水溶液。再用 1N 硝酸将此溶液的 pH 值调到 pH 1.5，得到 HA 酸性水溶液。

在金属容器中装入这种 HA 酸性水溶液 50ml，再放入设定于-20℃的冷冻库中，120 小时后取出，经 25℃解冻便得到了流动性的 HA 凝胶。

接着用蒸馏水进行充分透析，除去过剩的酸和氯化钠。然后用 pH 7 的含 25mM 磷酸的缓冲生理盐水充分地透析中和。装入注射器的此 HA 凝胶在室温 25℃附近时，可容易地从针筒中推出。

实施例 2

将 HA 钠(从特性粘度换算的分子量：2×10^6 道尔顿)溶于 0.5 重量%氯化钠溶液中，配制成 0.5 重量%的 HA 水溶液。再用 1N 硝酸将此溶液的 pH 值调到 pH 1.5，得到 HA 酸性水溶液。

在金属容器中装入的这种 HA 酸性水溶液 50ml，再放入设定于-20℃的冷冻库中，50 小时后取出，经 25℃解冻便得到流动性的 HA 凝胶。

接着用蒸馏水进行充分透析，除去过剩的酸和氯化钠。然后用 pH 7 的含 25mM 磷酸的缓冲生理盐水充分地透析中和。装入注射器的此 HA 凝胶在室温 25℃附近时，能容易地从针筒中推出。

实施例 3

将 HA 钠(从特性粘度换算的分子量：2×10^6 道尔顿)溶于 1.0 重量%氯化镁溶液中，配制成 1.0 重量%的 HA 水溶液。再用 1N 硝酸将此溶液的 pH 值调到 pH 1.5，得到 HA 酸性水溶液。

在金属容器中装入这种 HA 酸性水溶液 50ml，再放入设定于-20℃的冷冻库中，120 小时后取出，经 25℃解冻便得到流动性的 HA 凝胶。

接着用蒸馏水进行充分透析，除去过剩的酸和氯化镁。然后用 pH 7 的含

25mM 磷酸的缓冲生理盐水充分地透析中和。装入注射器的此 HA 凝胶在室温 25℃附近时，能容易地从针筒中推出。

实施例 4 含有凝血酶的流动性 HA 凝胶的调制

在实施例 2 所得到的流动性 HA 凝胶中加入相当于每 100mg0.5NIH 单位的凝血酶溶液，制成含有凝血酶的流动性 HA 凝胶。

比较例 1(冻干的 HA)

除了不调整 pH 外，将实施例 1 的 1.0 重量%的 HA 溶液按实施例 1 同样的条件进行冻结和解冻，结果不产生凝胶化。此溶液冻干后作为溶解性试验的对照物。

参考例 1(HA 凝胶浆)

将 HA 钠(从特性粘度换算的分子量：2×10^6 道尔顿)溶于蒸馏水中，制成 1.0 重量%的 HA 水溶液。再用 1N 硝酸将此溶液的 pH 值调整为 pH 1.5，得到 HA 酸性水溶液。

在金属容器中装入这种 HA 酸性水溶液 50ml，再放入设定于-20℃的冷冻库中，120 小时后取出，经 25℃解冻便得到流动性的 HA 凝胶。

接着用蒸馏水进行充分透析，除去过剩的酸和氯化钠。然后用 pH 7 的含 25mM 磷酸的缓冲生理盐水来进行充分的透析中和。再用蒸馏水进行充分透析，冻干后便得到浆状 HA 凝胶。

将 100mg HA 凝胶放入 10ml 的含 25mM 磷酸的缓冲盐水生理中，在微匀浆器(Polytoron, Kinematica AG 制造)中粉碎，得到 HA 凝胶浆。将这种 HA 凝胶浆用于透明性试验中。装入注射器的此 HA 凝胶浆在室温 25℃附近时，可较容易地从针筒中推出。

实施例 4 注射器中推出试验

将本发明的 HA 凝胶注入テルモ株式会社制造的 2.5ml 注射器(针芯直径约 12mm)内，装上テルモ株式会社制造的 21G 注射针，以 0.1ml/秒的速度推出时，其推出力可用岛津制作所制造的腾西隆 EZ 试验-20N 来测定。 下面的表 1 中记载了这些结果。

用 1 重量%的 HA 磷酸缓冲生理盐水作为对照，1 重量%的 HA 溶液就象生化学工业株式会社制造的关节液，已作为医药品适用于关节中。

表 1. 推出力的比较

实验号 No	试 样	推出力 (N)	备 注
1	实施例 1 的流动性 HA 凝胶	10.5	实施例
2	实施例 2 的流动性 HA 凝胶	8.5	实施例
3	实施例 3 的流动性 HA 凝胶	11.0	实施例
4	1 重量%浓度的 HA 溶液	5.1	比较例

如表 1 所示，所得的流动性 HA 凝胶从注射器中容易推出。

实施例 5 溶解试验

在生理盐水中按 50mM 浓度加入磷酸缓冲成分，调制成 pH 7，50mM 浓度的磷酸缓冲生理盐水。将实施例～3 所得到的流动性 HA 凝胶及比较例 1 中的冻干 HA 换算成所含 HA 干物的量，为 100mg。然后再浸入 37℃ 50ml 的磷酸缓冲生理盐水中轻轻搅拌，按一定时间抽样。用硫酸咔唑法对磷酸缓冲生理盐水中溶解的 HA 量进行定量，算出溶解率。其结果表示在下面的表 2 中。

表 2. 溶解性的比较

实验号 No	试 样	溶解率(%) 12 小时后	7 天后	14 天后	30 天后	备 注
5	实施例 1 的流动性 HA 凝胶	2	7	13	21	实施例
6	实施例 2 的流动性 HA 凝胶	2	10	21	49	实施例
7	实施例 3 的流动性 HA 凝胶	2	8	15	26	实施例
8	比较例 1 中的冻干 HA	100	-	-	-	比较例

表 2 中显示出对照试样较容易溶解，相比之下所得到的流动性 HA 凝胶是难溶性的。

实施例 6 分枝度的测定

将实施例 1～3 所得到的 HA 凝胶浸入 pH 1.5 的盐酸水溶液 15ml 中，在 60℃经 6 小时水解，使凝胶完全被增溶，再用 GPC 溶剂稀释 2 倍，将浓度调到 0.05 重量%，再通过 0.2μm 的膜过滤器后，取 0.1ml 用 GPC-MALLS 法测定其结果，其分枝度均在 0.5 以上。

实施例 7 透明性试验

将实施例 1～ 3 中所得到的流动性 HA 凝胶和参考例 1 中所得到的 HA 凝胶浆放入长 10mm 的分光光度计用比色杯中。在可见光 340nm～800 nm 的范围内，将水透过率作为 100%，用贝克曼制的 DU-64 分光光度计来测定其透光率。其结果见表 3。用 1 重量%的 HA 磷酸缓冲生理盐水作为对照。

表 3 透明性比较

实验号 No	试 样	透光率(%) (最大～最小)	备 注
9	实施例 1 的流动性 HA 凝胶	92～95	实施例
10	实施例 2 的流动性 HA 凝胶	95 ～98	实施例
11	实施例 3 的流动性 HA 凝胶	93～95	实施例
12	参考例 1 的 HA 凝胶浆	6～8	参考例
13	1%浓度的 HA 溶液	99 ～100	对照例

由表 3 可见，实施例 1～3 中所得到的流动性 HA 凝胶是透明的。

实施例 8 在兔关节腔内贮留性的比较

取体重为 2.5 ～ 3.0kg 成熟健康的雄性新西兰兔，用电剪除去两膝关节周围的毛消毒后，将实施例 1 中所得到的流动性 HA 凝胶或 1 重量%HA(从特性粘度换算的分子量：2×10^6道尔顿)生理盐水溶液，以 0.1ml/kg 体重的用量注入兔的左膝关节腔内。在同一只兔的右关节腔内注入 0.1ml/kg 体重的生理盐水作为对照。注入后隔日回收两侧关节腔液，用 GPC 法对关节液中 HA 的浓度

作出定量。

用下式算出残存率。内源性 HA 量表示生理盐水注入关节腔后立刻抽出关节液，其中的 HA 量。

残存率(%)=(回收量-内源性 HA 量)/注入量×100

用表 4 来表示其结果。

表 4. 贮留性的比较

实验号 No	试 样	HA 残存率(%)n=3 的平均值							备 注
		2 天	4 天	6 天	8 天	10 天	12 天	14 天	
14	实施例 1 的流动性 HA 凝胶	90	68	30	11	5	1	0	实施例
15	1%浓度的 HA 溶液	42	5	0	NT	NT	NT	NT	比较例

(注)NT 表示未进行试验。

从表 4 中可看出，流动性 HA 凝胶在体内的贮留比 HA 溶液明显延长。

实施例 9 抑制缓激肽的疼痛作用

将实施例 2 中预先得到的流动性 HA 凝胶(0.3ml/kg 体重)和 HA 溶液(从特性粘度换算的分子量：2×10^6 道尔顿，1%生理盐水溶液，0.3ml/kg 体重)注入体重 10kg 左右的雌性大狗的后腿膝关节腔内。另外，用 0.3ml/kg 体重的生理盐水作为对照。注入后 2 天，4 天，7 天后再分别注入致痛物质缓激肽生理盐水溶液(BK：0.2 g/ml ； 0.05ml/kg 体重)。把对疼痛腿的体重负荷率作为指标，分别测定 1～ 2 分，3～ 4 分钟，5～6 分钟时的疼痛抑制作用。其结果显示在表 5 中。体重负荷率用下式来表示。

表 5. 关节疼痛抑制效果比较

实验号 No	试 剂	体重负荷率(%) n=10 的平均值 2 天后	4 天后	7 天后	备 注
16	实施例 1 的流动性 HA 凝胶	74	72	53	实施例
17	1%浓度的 HA 溶液	61	37	28	比较例
18	对照(生理盐水)	27	25	29	比较例

$$\text{体重负荷率(\%)} = \frac{\text{(BK 注入后各时间点肢体的平均体重负荷量)}}{\text{(BK 注入前 1 分钟时肢体的平均体重负荷量)}} \times 100$$

从表 5 可见，HA 溶液在 7 天后与对照液处于相同的低水平，而相比之下流动性 HA 凝胶在 7 天后乃保持了对疼痛的抑制作用。

实施例 10 血液凝固试验

在实施例 1 所得的流动性 HA 凝胶中加入人全血，37℃加温，5 分钟内便形成了凝块。

另外， 在实施例 4 所得的含有凝血酶的流动性 HA 凝胶中加入人全血，37℃加温，2 分钟内便形成了强凝块。

实施例 11 栓塞形成试验

在注射器中吸入实施例 4 所得的含有凝血酶的流动性 HA 凝胶，在 2.5kg 家兔(新西兰种)的耳动脉中注入约 0.1ml。注入凝胶后很快就形成了凝块，用肉眼便可确认其动脉呈闭塞状态。

1 个月后观察其形态确认无变化，最后解剖，作栓塞的从组织学检查，乃呈完全的闭塞状态。

相比之下，0.5 重量%及 1.0 重量%的 HA 溶液未形成栓塞。

实施例 12 豚鼠注射试验

将 20 只 350 ～400g 雌性哈特利种豚鼠麻醉后，皮内注射实施例 1 ～3 所得的流动性 HA 凝胶及 0.5 重量%HA 钠(从特性粘度换算的分子量：2×10^6道尔顿)生理盐水。皮内注射量为 0.05 ml，分别在动物的 10 个部位进行注射。在 0，1，2，3 及 4 周后，每组 1 只，作各部位组织取样，然后固定包埋作成组织切片，用苏木精嗜伊红染色法和阿尔新蓝染色法进行染色，在显微镜下观察组织反应。

其结果，用实施例 1～ 3 的试样，即使到 4 周后经注射的皮肤保持原来的状态，皮肤组织中存在 HA。而 0.5 重量%HA 生理盐水溶液 4 周时皮肤组织中的 HA 已全部被吸收。无论注射哪一种液体均无细胞渗出和炎症反应。

实施例 13 折射率的测定

用阿贝折射计(株式会社アタゴ制)测定 20℃时实施例 1 及实施例 2 所得流动性 HA 凝胶的折射率。实施例 1 及实施例 2 的流动性 HA 凝胶的折射率分别为 1.335 和 1.334，近似于玻璃体的折射率。

实施例 14 对家兔视网膜剥离的效果

将 15 只(15 眼)体重为 2.5 ～3.0kg 白色家兔(新西兰种)麻醉。用 0.5%消炎痛及 5%的盐酸苯福林滴兔眼使其散瞳，再用 2%的盐酸利多卡因进行球后麻醉。

进行洗眼和眼周消毒后，将家兔固定于手术用的显微镜下，逢上手术线，切开结膜。切开巩膜，插入灌流管并用前面放置的手术线固定。为了穿入玻璃体切除刀及光导，进一步切开巩膜，将玻璃体切除刀及光导穿入眼球。

用玻璃体切除刀将玻璃体一边吸引一边切除后，在玻璃体切除刀拔出的前端插入弯曲的 21G 号针。通过 21G 号针将 0.1 ml 的灭菌空气注入上耳侧视网膜的下方，使视网膜部分剥离。视网膜剥离后，再次插入玻璃体切除刀，切开部分视网膜，造成裂孔。

灌流液和空气交换后，将实施例 1 及 2 所得到的流动性 HA 凝胶注入玻璃体，和空气交换，使视网膜复位。用激光眼内光凝固装置的探针插入玻璃体腔内进行眼内凝固。然后用 8-0 号尼龙线缝合巩膜创口。去除固定线，缝合结膜。

结果是，注入实施例 1 及 2 所得到的流动性 HA 凝胶的，4 周后用检眼镜检查时没有再剥离等异常所见。且光凝固部位的瘢痕化状态亦良好。用裂隙灯检查也没有发现有玻璃体的混浊和炎症反应。

产业上利用的可能性

用本发明可提供用单纯 HA 来形成水难溶性但有流动性或既有流动性又有透明性的 HA 凝胶。并且，本发明的 HA 凝胶中未使用交联剂等，所以维持了机体内本来就有的 HA 结构，具有良好安全性和机体适应性，因具有透明性故有利于质量管理。

所以，可用作关节疾病治疗用注射剂，栓塞形成材料，软组织注射剂，玻璃体代用品等医用材料。