

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7366448号

(P7366448)

(45)発行日 令和5年10月23日(2023.10.23)

(24)登録日 令和5年10月13日(2023.10.13)

(51)国際特許分類

F I

C 0 8 B 37/08 (2006.01)

C 0 8 B

37/08

Z

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P

31/04

A 6 1 P 31/10 (2006.01)

A 6 1 P

31/10

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P

31/12

A 6 1 K 31/728(2006.01)

A 6 1 K

31/728

請求項の数 11 (全20頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-509833(P2021-509833)

(86)(22)出願日 令和1年8月17日(2019.8.17)

(65)公表番号 特表2021-535245(P2021-535245

A)

(43)公表日 令和3年12月16日(2021.12.16)

(86)国際出願番号 PCT/CZ2019/050034

(87)国際公開番号 WO2020/038500

(87)国際公開日 令和2年2月27日(2020.2.27)

審査請求日 令和4年8月10日(2022.8.10)

(31)優先権主張番号 PV2018-426

(32)優先日 平成30年8月23日(2018.8.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

チェコ(CZ)

(73)特許権者 507211897

コンティプロ アクチオヴァ スポレチノ
ストチェコ,シーゼット - 5 6 1 0 2 ドル
ニ ドプロチ,ドルニ ドプロチ 4 0 1

(74)代理人 110002398

弁理士法人小倉特許事務所

(72)発明者 ブッファ,ラドヴァン

スロバキア,フメンネー,クコレリホ
1 4 9 5 / 2

(72)発明者 パサラボヴァ,イヴァナ

スロバキア,0 6 8 0 1 メジラボルツ
ェ,マホヴァ 7 3 1 / 6

(72)発明者 ヘルマンノヴァ,マルティナ

チェコ,5 6 4 0 1 ジャンベルク,ヴ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒアルロン酸の塩素化誘導体,その調製法,該誘導体を含む組成物及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミド基: -NH-CO-の水素原子が構造式: -NCl-CO-に従って塩素原子で置換され,その置換度が50~100%であるヒアルロン酸又は修飾されたヒアルロン酸の塩素化誘導体,いわゆるクロラミドであって,

前記修飾されたヒアルロン酸が,いくつかの-OH基及び/又はいくつかの-CH₂-OH基及び/又はいくつかの-CO-OH基が,ベンジルエステル,ホルミル,ラウロイル(C12),パルミトイル(C16),カプロイル(C6)からなる群より選択される一つに置換されたヒアルロン酸である塩素化誘導体。

【請求項2】

その分子量が5~500 kg.mol⁻¹である請求項1記載の塩素化誘導体。

【請求項3】

請求項1又は2記載のヒアルロン酸又は修飾されたヒアルロン酸のクロラミドの調製方法であって,

分子量が40~2200 kg.mol⁻¹である最初のヒアルロン酸又はその修飾された誘導体の水溶液を調製し,その濃度は0.5~5重量%であり,pHを2.5~7.5の範囲に合わせ,そしてその後ヒアルロナンの二糖に対して0.3~1.5当量の量の塩素化剤を添加し,その混合物を5~40の温度で5~72時間反応させ,その後,生じたクロラミドを析出により単離することを特徴とする方法。

【請求項4】

前記 pH を 4 ~ 6 の範囲に合わせることを特徴とする請求項 3 記載の調製方法。

【請求項 5】

前記ヒアルロナンの二糖に対して 0.2 ~ 7 当量の量の酢酸を添加することにより前記 pH を合わせることを特徴とする請求項 3 記載の調製方法。

【請求項 6】

前記塩素化剤がトリクロロイソシアヌル酸，又はジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩であることを特徴とする請求項 3 ~ 5 いずれか 1 項記載の調製方法。

【請求項 7】

10 ~ 99 重量 % の濃度の請求項 1 又は 2 記載の誘導体，並びに水，塩化ナトリウム，塩化カルシウム，グリセロール，ヒアルロン酸，コンドロイチン硫酸，アルギン酸ナトリウム，オキシセルロース，カルボキシメチルセルロース，ヒドロキシエチルセルロース，又はいくつかの - OH 基及び / 又はいくつかの - CH₂ - OH 基及び / 又はいくつかの - CO - OH 基がホルミル又はラウロイルに置換されたヒアルロン酸である修飾されたヒアルロン酸からなる群から選択された添加剤を含有することを特徴とする，抗菌性，抗真菌性及び抗ウイルス性組成物。

10

【請求項 8】

水溶液中の溶液又はゲルの形態であり，最終組成物中の前記クロラミドの含有量が，乾燥物質に換算して計算して 10 ~ 100 % の範囲内であることを特徴とする請求項 7 記載の組成物。

【請求項 9】

20

自己支持性フィルム，凍結乾燥物，ステープルファイバーの層(不織布)，エンドレスファイバー，織物，ニット布，組物，又はナノファイバー層からなる群から選択された固体基材の形態をとることができると共に，最終組成物中の前記クロラミドの含有量が，乾燥物質に換算して計算して 10 ~ 100 % の範囲内であることを特徴とする請求項 7 記載の組成物。

【請求項 10】

創傷被覆材の製造のための又は移植可能な医療機器の製造のための請求項 1 又は 2 記載の塩素化誘導体の使用。

【請求項 11】

創傷被覆材の製造のための又は移植可能な医療機器の製造のための請求項 7 ~ 9 いずれか 1 項記載の組成物の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は，アミド基 - NH - CO - の水素原子の大部分が塩素原子で置換された - NC1 - CO - ヒアルロン酸の誘導体に関する。本発明の方法で修飾されると，ポリマー - ヒアルロナクロラミド(chloramide)は酸化反応及び還元反応の両方において増加した反応性を示す。

【0002】

さらに，本発明は，化学修飾がトリクロロイソシアヌル酸により又はトリクロロイソシアヌル酸の塩により水性環境の中で行われるヒアルロナクロラミドの調製方法に関する。最終組成物の調製は，ヒアルロナクロラミドを含有する形態の提供をも含む。ここで，用語「形態」は，薄いフィルム，凍結乾燥物，ステープルファイバーの層，エンドレスファイバー，織物，ニット布，組物又はナノファイバー層のような様々なタイプの材料を表す。

40

【0003】

さらに，本発明は，ヒアルロナクロラミドを含む最終組成物，及び下記の特性又は下記の特性の任意の組み合わせが要求される分野における該組成物の使用に関する：

- 酸化又は還元又は抗菌 (antimicrobial) 又は抗真菌又は抗ウイルス活性
- 生物学的適合性及び生物学的分解性

50

- 好適な安定度を有する様々な形態を製造する可能性
- 制御された生分解速度の可能性
- 酸化還元反応の制御された速度の可能性
- 治癒プロセスへの著しい寄与

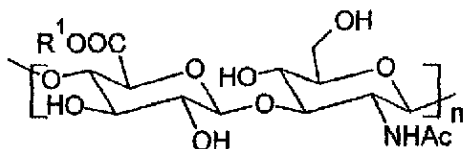
【背景技術】

【0004】

ヒアルロン酸

ヒアルロン酸又はそのナトリウム塩は、D - グルクロン酸とN - アセチル - D - グルコサミンとの二つの繰り返し単位によって構成された、硫酸化されていないグリコサミノグリカンである。

10



(式中、R¹は水素又はナトリウムを表す)

【0005】

天然のヒアルロン酸の分子量は $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ の範囲内にある。この親水性の多糖類は、プロテオグリカン類の構成、水和又は細胞の分化のような多数の生物学的プロセスに重要な役割を果たし、皮膚、滑液、そして結合組織の本質的な要素であることが知られている。上記ポリマーは生物系において自然に発生し、従って、それは生分解性で生体適合性であるとして特徴づけられ得る。従って、それは、広範囲の生物医学的な用途のための生物活性物質のキャリアーの分野に適する基材を構成する。

20

【0006】

ヒアルロン酸の化学的修飾及び形態

その物理的及び生物学的特性を調節する目的のためのヒアルロン酸の化学的修飾の多数の既知の方法が存在する(Burdick J. A. and Prestwich G. D., Adv. Mater. 23, 41-56, 2011)。特定用途に関して溶解度の本質的な変化が要求される場合、最も頻繁に行なわれる方法は、生分解性のエステル結合により疎水性鎖を高分子構造に共有結合することからなる(Kettou S. et al., PV 2009-399, Buffa R. et al., WO2010105582)。上記の方法で修飾した場合、該材料は、ファイバー(Scudlova J. et. al., EP2925916 A1)、ニット布又は組物(Pitucha T. et al., CZ 306354)、自己支持性フィルム(Foglarova M. et al. PV2015-166; Foglarova M. et al., Carbohydrate Polymers, 144, 68-75, 2016)又はナノファイバー層(Ruzickova J. et al. PV2013-913)のような様々な形態の製造に使用できる。別の可能性は接着したステーブルマイクロファイバーによって形成した不織布であり、該ファイバーは非静止凝固浴(a non-stationary coagulation bath)中で湿式紡糸法によって製造される(Zapotocky V. et al., International Journal of Biological Macromolecules, 95, 903-909, 2017)。

30

40

【0007】

トリクロロイソシアヌル酸、又はトリクロロイソシアヌル酸ナトリウムによる酸化

トリクロロイソシアヌル酸(TCC)は、ほとんどの場合非水溶媒中で、構造的に単純なアミドをN - 塩素化してN - クロラミドにするためにしばしば使用される(Hiegel G. et al., Synthetic Communications, 35, 2099-2105, 2005)。さらに、TCCは、水の存在下で一級水酸基を選択的に酸化するために、ピペリジニルオキシ-タイプ(TEMPO)のような安定なラジカルとの組み合わせでしばしば言及される。ヒアルロン酸に関しては、水中でTEMPOと共にTCCを使用することが、例えば特許(Buffa R. et al., WO2011069475A3)に記載された。そこでは一級水酸基をアルデヒドとカルボン酸に酸化することのみが述べられクロラミドの形成は述べられていなかった。従って、大量の第二

50

及び第一アルコールの両方を含む基質(多糖類)の場合、TCC及びその類似化合物が使用される場合は水酸基上の反応が予測され得る。ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム(DCC-Na)としても知られているTCCのモノナトリウム塩は、反応性はより低い、より良好な水溶性のTCC類似化合物である。しかしながら、水酸基を含まないアミン及びアミドを酸化させるためのDCC-Naの使用が開示された(Sun X. et al., Ind. Eng. Chem. Res., 49, 22, 2010)。生じるクロラミンは重合され、最終基質は、ラテックス乳濁液の形態の抗菌性、抗真菌性及び抗ウイルス性物質として試験され成功した(Cao Z. et al., App. Mat. Inter. 1, 2, 494-504, 2009)。

【0008】

上記の資料に基づくと、選択的なやり方で水中のN-塩素化ヒアルロナンアミド(N-chlorinated hyaluronan amide)を調製するためのTCC又はその類似化合物の使用は、ヒアルロナンの水酸基との反応が想定されるため、予測可能でないことが結論付けられ得る。

【0009】

多糖類の次亜塩素酸又は次亜塩素酸塩による酸化

次亜塩素酸及びその塩は、主としてピペリジニルオキシラジカル(TEMPO)と組み合わせて、多糖類の水酸基の酸化にしばしば使用される(Bragd P. et al., WO2002/48197, Buffa R. et al., WO2011/069475A3)。アミド基を含む多糖類に関しては、大多数の場合、クロラミドの形成が観察されなかったと一般的には言えるであろう。初期の資料はヒアルロナンクロラミドの存在に言及しなかった(Green S. P. et al., J. Rheumatology, 17, 1670-5, 1990, Lindvall S. et al., Chem.-Biol. Interac. 90, 1-12, 1994, Baker M. S. et al., 461-7 Arthritis and Rheumatism, 32, 4, 1989)。前述の刊行物は、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)と過酸化水素及び塩化物との反応において生じる次亜塩素酸又はその塩によって引き起こされたヒアルロナンの分解過程の検討を記載した。炎症過程をシミュレートする目的で主として細胞間マトリックスに含まれるグリコサミノグリカンの分解について記述しているいくつかの刊行物がさらに存在する。主な資料は、プロセス自体及び予測される特定の化学構造の生体内での存在の両方に関する情報であった。より最近又は現在の情報は、既にヒアルロナンのクロラミドに言及している。例えば、アミド基を含む、低分子のものを含む、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸及び他の基質の分解のメカニズムに関する研究を扱った刊行物(Hawkins C. L. et al., Free Radical Biology & Medicine, 24, 9, 1396-1410, 1998)。使用された酸化剤はHOC1/C1O⁻であった。著者らは、不安定な中間体以外のヒアルロナンクロラミドの形態の存在を仮定していない。しかしながら、この不安定な中間体は直接的な方法では検出されていなかった。その理由は、その急速な均等な又は還元的な開裂にあり、いずれの場合もポリマーの分解につながるように反応するラジカルの形成に帰着する。別の論文(Parsons B. J. et al., Biochem. J., 381, 175-184, 2004)には、MPO(ミエロペルオキシダーゼ酵素)、過酸化水素及び塩化物による、ヒアルロナン、コンドロイチン硫酸及び他の基質のクロラミドの形成について記載されている。著者はそれぞれのクロラミドは一定のライフタイムを有すると推定し、そのようなクロラミドの添加剤による分解の詳細な記載を提供している。別の非常に興味深い論文(Rees M. D. et al., 125, 13719-13733 J. Am. Chem. Soc., 2003)には、アミド基を含む単糖、オリゴ糖及び多糖のNaC1Oとの反応について記載されている。前述の論文は、Cu²⁺及び酸素のような他の試薬及び物質の存在下及び不存在下の両方における、各々35%及び16%の修飾度を有するヒアルロナン並びにコンドロイチン硫酸のクロラミドの安定性の完全な分析を含んでいる。この分解がある種の金属の存在によってかなり加速されることが見出された。ヒアルロナン、及びコンドロイチン硫酸のポリマーのクロラミドの50の温度における急速な分解は、金属がない状態でさえ観察された。この分解は、より低い温度では著しく遅かった。直接観察の結果は、さらに過酸化水素の存在下及び生理学的な量の塩化物の存在下で生じるMPOとグリコサミノグリカンとの反応が少量のグリコサミノグリカンクロラミドを生成することを示す。従って、著者は該クロラミドも生体内で生成されるという結論に達した。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

上記の資料に基づいて、低い修飾度を有するヒアルロナンクロラミドは、既知ではあっても、それらを生物医学的な用途のための組成物を調製するのに適切なものとする十分な安定性を有することを期待できないという結論になった。

【 0 0 1 1 】

N - ハロゲン化ポリマーの利用

このセクションは、クロラミン又はクロラミドの選択された、より特殊な利用についてさらに記述する資料を記載する。

【 0 0 1 2 】

要約している論文(Hui F. et al., Biomacromolecules, 14, 585-601, 2013)は、N - ハロゲン結合を有する様々な材料の調製、分析及び利用について記述している。それにも拘わらず、前述の要約はヒアルロン酸に言及しておらず、その記載は構造の点で最も近い関連物質であると考えられるキトサンに関するものである。可能な塩素化剤の中で、トリクロロイソシアヌル酸及びより反応性の低いその類似化合物、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムが言及された。上記の材料の利用の一般的な利点は、広範囲の微生物に対する有効性、長期安定性、再生可能性、ヒト及び自然に対する安全性、並びにその低いコストにある。記述した用途の大多数では、主にN-hal基に隣接する水素(アルファ水素)を有する炭素がない場合に、通常比較的良好な安定性が観察されたN - 塩素化誘導体を使用した。他方では、 α ハロゲンが存在する場合、ハロゲン化水素の脱離及びそれに続くイミン多重結合の形成 - $\text{NHal} - \text{CH} \rightarrow - \text{N} = \text{C} -$ が起こり得る。ヒアルロン酸又はキトサンはアルファ水素を含んでおり、そのことはこのタイプの基質(アミノ糖類)が安定性の観点からすると問題かもしれない構造断片を含むことを意味する。

【 0 0 1 3 】

塩素化キトサンの調製、分析及び試験も、論文(Cao Z. et al., Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 85, 99-107, 2008)に記載された。フィルムの形態を有する材料が、微生物、Staphylococcus aureus及びEscherichia coli.に対して試験され成功した。前述の材料によるバイオフィルムの形成の顕著な制御も同様に観察された。25 における安定性も観察され、そこでは1か月の貯蔵期間後に活性塩素の量の著しい減少が検出され、最終値は初期値の15%の低さであった。

【 0 0 1 4 】

Cl_2 の溶液との反応で調製されたフィルムの形態のN - 塩素化ポリウレタン(Luo J. et al., J Bioact Compat Polym, 30, 157-166, 2015)が、微生物、Staphylococcus aureus (グラム陽性菌)、Escherichia coli (グラム陰性菌)及びCandida albicans(真菌類)に対して試験され成功した。この材料は、細菌の増殖を顕著に抑えた上、バイオフィルムの形成を著しく制御した。

【 0 0 1 5 】

広範囲の基質のN - クロラミンの調製及び使用に特許が請求された(Heller A. et al., WO 2008/094664)。該基質はさらに下記の生体高分子を含んでいた:N - 塩素化キトサン、N - 塩素化ポリリシン、及び塩素がヒアルロナンアミドには存在しないが脱アセチル化アミンには存在するN - 塩素化脱アセチル化ヒアルロン酸。ここで使用された形態はそれぞれのクロラミンを含む溶液又は包帯を含んでいた。局所適用した場合、該材料は顕著な痛み及び痒みの軽減を与えた。このクロラミンの調製においては、多数の試薬、例えば HOCl 、 NaClO 、 HClO_2 、N - クロロスクシンイミド、N - クロロスルホンアミドの塩、分子状塩素、塩化チオニル、ホスゲン、 PCl_3 及び PCl_5 が言及されている。

【 0 0 1 6 】

一般に、より高い修飾度(50%以上)を有するヒアルロン酸のクロラミドは、まだ記述されていないと言える。既知のクロラミドは、より低い修飾度(せいぜい35%)を有するものしか含まず、不十分な安定性に関する理由により実用化についてもこれまで記述されていない。しかし、実際、ここで論じられる材料は、次の必要条件を同時に満たすであろうという点で独特であろう。

10

20

30

40

50

- ・生物学的適合性及び生物学的分解性(例えば，人体内の特定の炎症過程に関連して生じる)
- ・広範囲の微生物，真菌類及びウイルスの増殖抑制(クロラミド及びクロラミンと同様の)
- ・治癒プロセスに対する好ましい効果(ヒアルロン酸の存在に起因して)
- ・広範囲の形態を製造する可能性(有効成分がそれを保持するポリマーに共有結合によって結合されるという事実に起因して)

【 0 0 1 7 】

一般に，前述の組み合わせは，抗ウイルス性を必要とする外用・内服用の両方，そして同時に生体適合性の創傷ドレッシング，充填材，抗接着性のバリア (barriers)，膜 (membranes)，ポケット (pockets) 又はラップ (wraps) との関連で望ましい。

【 0 0 1 8 】

本発明は，ヒアルロナンクロラミドを含有し，抗菌及び抗ウイルス作用並びに治癒効果を示す，安定な，生体適合性及び生分解性の組成物の調製及び使用を解決する。さらに，大きく調節可能な表面積，機械的又は流動学的性質及び分解時間を有する，広範囲の形態が記載されている。

【 0 0 1 9 】

発明の要約

本発明の主題は，アミド基： $-NH-CO-$ の水素原子が構造式： $-NCl-CO-$ に従って塩素で置換され，その置換度が50～100%であるヒアルロン酸又は修飾されたヒアルロン酸の塩素化誘導体である。したがって，前記修飾されたヒアルロン酸がいくつかの $-OH$ 基が $-OCOR^2$ 基で置換され及び/又はいくつかの $-CH_2-OH$ 基が $-CH=O$ で置換され及び/又はいくつかの $-CO-OH$ 基が $-CO-OR^2$ 基で置換されたヒアルロン酸(式中， R^2 は1～17個の炭素原子を含む直鎖又は芳香族鎖である)である。好ましくは前記ヒアルロン酸誘導体がエチルエステル，ベンジルエステル，ホルミル，ラウロイル(C12)，パルミトイル(C16)，カプロイル(C6)からなる群より選択される。前記誘導体の分子量が好ましくは5～500 kg.mol⁻¹であり，修飾の程度が1～100%である。

【 0 0 2 0 】

さらに，本発明は化学修飾が，窒素原子に結合した塩素原子を含む試薬により，好ましくはトリクロロイソシアヌル酸により又はジクロロイソシアヌル酸の塩により実現される，ヒアルロナンクロラミドの調製方法に関する。本発明の方法は特に，分子量が40～2200 kg.mol⁻¹である最初のヒアルロン酸又はその修飾された誘導体の水溶液を調製し，その濃度は0.5～5重量%であり，ヒアルロン酸二糖に対して0.2～7当量の酢酸を用いてpHを2.5～7.5，好ましくは4～6の範囲に合わせ，そしてその後ヒアルロナンの二糖に対して0.3～1.5当量，好ましくは2～4当量の量の塩素化剤を添加し，その混合物を5～40℃の温度で5～72時間反応させ，その後，生じたクロラミドを沈殿により単離する。最初の基質は，ヒアルロン酸又はその化学的に修飾された誘導体であり得，そのような基質の分子量は，40～2200 kg.mol⁻¹の範囲である。

【 0 0 2 1 】

さらに，本発明の主題は，アミド基の水素原子の大多数が塩素原子により置換され，その結果，酸化反応及び還元反応の両方において増加した反応性を示す，ヒアルロナンクロラミドを含有する組成物である。最終組成物は，化学的修飾がカルボキシル及び/又は水酸基に対して存在する修飾されたヒアルロン酸をさらに含んでもよい。本発明による組成物は抗菌，抗真菌及び抗ウイルス活性を示す。前記組成物に含まれるクロラミドの濃度は，10～99重量%の範囲であり，水，塩化ナトリウム，塩化カルシウム，グリセロール，ヒアルロン酸，コンドロイチン硫酸，アルギン酸ナトリウム，オキシセルロース，カルボキシメチルセルロース，ヒドロキシエチルセルロース，又はいくつかの $-OH$ 基が $-OCOR^2$ 基で置換され及び/又はいくつかの $-CH_2-OH$ 基が $-CH=O$ で置換され及び/又は $-CO-OH$ 基が $-CO-OR^2$ 基で置換された修飾されたヒアルロン酸(式中， R^2 は1～17個の炭素原子を含む直鎖又は芳香族鎖である)からなる群から選択された添加剤を含有する。前記組成物は，例えば，水溶液中の溶液又はゲルの形態であってよく

10

20

30

40

50

、最終組成物中のヒアルロナンクロラミドの含有量は、乾燥物質に換算して計算して10～100%の範囲内である。該組成物はまた、自己支持性フィルム、凍結乾燥物、ステープルファイバーの層(不織布)、エンドレスファイバー、織物、ニット布、組物、又はナノファイバー層のような固体形態の形態をとることができ、前記組成物は、最終組成物中のヒアルロナンクロラミドの含有量は、乾燥物質に換算して計算して10～100%の範囲内である。

【0022】

本発明の塩素化誘導体並びに本発明の組成物は、創傷被覆材の製造又は移植可能な医療機器の製造に使用可能である。該適用の非制限的例として、吻合を行なった後の癒着の予防のための生成物、又は離開の予防のための生成物、又は他の物質との組み合わせで、腹壁欠陥の外科的修復のための又は医療機器のための移植可能なラッパー(wrapper)の組成物の一部としての製品が含まれる。

10

【0023】

最終組成物の調製はさらに、ヒアルロナンクロラミドを含む下記の形態の提供を含む：
・自己支持性フィルム、凍結乾燥物、ステープルファイバーの層(不織布)、エンドレスファイバー、織物、ニット布、組物、又はナノファイバー層のような固体形態、それらの全ては所望によりさらに添加剤を含む
・液体形態、特に所望によりさらに添加剤を含むクロラミド水溶液。

【0024】

該添加剤の非制限的な例は以下のとおりである：ポリエチレンオキシド、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、エステル形態の修飾したヒアルロン酸、アルデヒドの形態の修飾したヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、オキシセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、脂肪酸のエステル、塩化ナトリウム、塩化カリウム又は塩化カルシウム。

20

【0025】

さらに、本発明は、特に次の特性又は次の特性の任意の組み合わせが必要とされる分野における、該組成物の使用に関する：

- ・酸化性又は還元性又は抗菌性又は抗真菌剤又は抗ウイルス活性
- ・生物学的適合性及び生分解性
- ・好適な安定度を有する様々な形態を調製する可能性
- ・制御した生分解速度の可能性
- ・酸化及び還元反応の制御した速度の可能性
- ・治癒プロセスに対する著しい寄与

30

【0026】

ヒアルロナンクロラミドをベースとする安定な液体組成物は、ヒアルロナンクロラミドと反応する添加剤を含むべきではない。これは、特に酸化に対して感受性の高い化合物(その場合には、ヒアルロナンクロラミドは還元の対象で、酸化剤として作用する)及び/又は酸素ラジカルを含むもののような強い酸化剤(その場合には、ヒアルロナンクロラミドは酸化の対象となり、還元剤として作用する)にあてはまる。安定な固体の組成物については、ヒアルロナンクロラミドはそれと反応する添加剤と組み合わせることができる。しかしながらそれは、ヒアルロナンクロラミドの溶液と添加剤の溶液を本発明の調製方法の間に接触させ得ない場合のみ、適用可能である。

40

【0027】

最終組成物の制御された生分解速度は、ヒアルロナンクロラミドを、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース又は化学的に修飾されたヒアルロン酸のようなより遅い分解性を示す添加剤と組み合わせること、及び/又は、ヒアルロナンクロラミドそれ自体を例えば多価の Ca^{2+} 陽イオンで架橋することによって達成できる。

【0028】

酸化成分の制御された放出速度は最終組成物の膨潤(swelling)のような物性を変えることにより、特により低い極性の添加剤の添加により達成できる。より低い極性の添加剤

50

の非制限的な例は、ヒアルロン酸の化学的に修飾された誘導体、いくつかの -OH 基が -OCOR² 基によって置換された及び/又はCOOH基が-COOR²基によって置換された該誘導体（式中、R²は1～17個の炭素原子を含む直鎖又は芳香族鎖である）に代表される。

【0029】

最終組成物は、生物医学的な用途、特に創傷ドレッシング、瘡瘍に対する製剤、抗菌性の充填材、抗接着性のバリア、膜、ポケット又はラップの製造ために使用可能である。

【0030】

本発明は、治癒効果を伴う抗菌・抗ウイルス性を示す、ヒアルロナンクロラミドを含む安定な、生体適合性及び生分解性の組成物の調製及び使用に関する。該材料の安定性は実施例16に記載されている。さらに、大きく調節可能な表面積、機械的又は流動学的性質及び分解時間を有する広範囲の形態が記載されている。

10

【0031】

本発明による技術的解決法の実際の実行は、技術的な観点から複雑ではなく、また、入手しにくい化学薬品、溶剤又は単離手段を使用することを要しない。

【図面の簡単な説明】

【0032】

無し

【0033】

図面の詳細な説明

20

図1A、1B - 実施例25により調製したヒアルロナンクロラミドをベースとする凍結乾燥物の形態を有する組成物の抗菌活性。

この図は、実施例25により調製されたヒアルロナンクロラミドをベースとする可溶性の凍結乾燥物（図1A）の存在下での、対照材料、即ち凍結乾燥した天然のヒアルロン酸（図1B）と比較した、微生物、*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermi*sの増殖抑制を示す。抗菌活性の測定方法は実施例43に記載されている。

図2 - 実施例32によって調製されたヒアルロナンクロラミドをベースとするフィルムの形態を有する組成物の抗菌活性。

この図は、ラウリン酸によってエステル化されたヒアルロナンによって構成された添加剤を含むヒアルロナンクロラミドをベースとする実施例32によって調製された不溶性フィルムの存在下での、実施例31によって調製された対照材料と比較した、微生物、*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*の増殖抑制を示す。抗菌活性の測定方法は実施例43に記載されている。

30

【発明を実施するための形態】

【0034】

DS = 置換度 = $100\% \times (\text{修飾されたポリマー単位のリモル量}) / (\text{全てのポリマー単位のリモル量})$

別段の定めがない限り、ここに使用される表現「当量」(eq)は、ヒアルロナンの二糖のようなそれぞれの多糖類の繰り返し単位についてのものである。別段の定めがない限り、パーセントは重量パーセントである。

40

ここに使用される限り、ポリマーの分子量はSEC-MALLS方法によって決定した重量平均値を表す。

【0035】

実施例1

ヒアルロナンのエチルエステルの調製

ヒアルロナン水溶液(1g, 300 kg.mol⁻¹, 40 mlの水中)にNaOHをpH値が9に達するまで添加した。続いて、20 mlのジメチルスルホキシド及び0.08 mlのヨウ化エチルを添加し、生じた混合物を、3日間45の温度で撹拌した。その後、生じた混合物を、100%のイソプロパノール140 mlによって沈殿させ、濾過によって分離した固形

50

物をイソプロパノールで洗浄し、真空乾燥した。この生成物(897 mg)をNMRによって分析した。

このエステルのDS値は6% (NMRにより測定した。文献：Kettou S. et al., CZ PV 2009-399)であった。

【0036】

実施例 2

ヒアルロナンのベンジルエステルの調製

ヒアルロナン水溶液(1 g, 300 kg.mol⁻¹, 40 mlの水中)にNaOHをpH値が9に達するまで添加した。続いて、20 mlのジメチルスルホキシド及び0.08 mlの臭化ベンジルを添加し、生じた混合物を、4日間20の温度で撹拌した。その後、生じた混合物を、100%のイソプロパノール140 mlによって沈殿させ、濾過によって分離した固形物をイソプロパノールで洗浄し、真空乾燥した。最終生成物(920 mgの量で得られた)をNMRによって分析した。

10

このエステルのDS値は3% (NMRにより測定した。文献：Kettou S. et al., CZ PV 2009-399)であった。

【0037】

実施例 3

ヒアルロナンのラウロイルの調製

70 mlのテトラヒドロフラン、4当量のトリエチルアミン及び0.1当量の4-ジメチルアミノピリジンを、蒸留水100 ml中のヒアルロナン(5 g, 250 kg.mol⁻¹)の溶液に添加した。同時に、ラウリン酸(4当量)を、30 mlのテトラヒドロフラン及び7 mlのトリエチルアミンの混合物に溶解し、得られた溶液に、0~5で15分間で4.8 mlのエチルクロロホルメートを添加した。続いて、生じた懸濁液を、前記ヒアルロナンの溶液に濾過して入れ、その反応混合物を20で5時間撹拌した。生じた溶液を、100%のイソプロパノール400 mlを加えることにより沈殿させ、80%のイソプロパノールで、そして次に100%のイソプロパノールで洗浄した。その後、その沈殿を40で2日間乾燥した。置換度はNMRによって測定され37%であった。

20

【0038】

実施例 4

ヒアルロナンのホルミルの調製

NaCl 1%, KBr 1%, N-アセチルアミノ-TEMPO(0.01当量)及びNaHCO₃(20当量)を含有するHA(1 g, 200 kg.mol⁻¹)の1%水溶液に、窒素雰囲気下でNaClO(0.5当量)の水溶液を徐々に添加した。この混合物を10で12時間撹拌し、そこに0.1 gのエタノールを添加した。続いて、最終混合物をもう1時間撹拌した。生じた溶液を蒸留水で希釈して0.2%の濃度にし、混合物(0.1% NaCl, 0.1% NaHCO₃)に対して5リットル3回(1×1日)、その後蒸留水に対して5リットル7回(2×1日)透析した。最終溶液を蒸発させ分析した。DS 9% (NMRで決定した)。

30

【0039】

実施例 5

ヒアルロナンのクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン(Mw 2200 kg.mol⁻¹)を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて、2 mlの酢酸を添加し、その溶液を20で15分間撹拌した。その後、3.2 g(1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、該混合物を20の温度で24時間撹拌した。続いて、該混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 82% (NMRによって決定した)。

40

【0040】

実施例 6

ヒアルロナンのクロラミドの調製

50

5 gのヒアルロナン ($M_w 40 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を, 100 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, 該溶液を20 の温度で15分間攪拌した。その後, 3.2 g (1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を20 の温度で24時間攪拌した。続いて, 該混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20時間真空乾燥した。DS 83% (NMRから決定した)。

【0041】

実施例 7

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を1000 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, その溶液を20 の温度で15分間攪拌した。その後, 3.2 g (1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を20 の温度で24時間攪拌した。続いて, その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20時間真空乾燥した。DS 72% (NMRから決定した)。

10

【0042】

実施例 8

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 0.14 mlの酢酸 (0.2当量)を添加し, その溶液を20 で15分間攪拌した。その後, 3.2 g (1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, 該混合物を20 の温度で24時間攪拌した。続いて, その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20時間真空乾燥した。DS 53% (NMRから決定した)。

20

【0043】

実施例 9

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 180 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 3 mlの酢酸を添加し, その溶液を20 の温度で15分間攪拌した。その後, 3.2 g (1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を20 の温度で24時間攪拌した。続いて, その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20時間真空乾燥した。DS 83% (NMRから決定した)。

30

【0044】

実施例 10

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 5 mlの酢酸 (7当量)を添加し, その溶液を20 の温度で15分間攪拌した。その後, 3.2 g (1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を20 の温度で24時間攪拌した。続いて, その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20時間真空乾燥した。DS 95% (NMRから決定した)。

40

【0045】

実施例 11

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, その溶液を20 の温度で15分間攪拌した。その後, 1.07 g (0.33当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を20 の温度で24時間攪拌した。続いて, その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノール

50

で洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 51% (NMRから決定した)。

【0046】

実施例 12

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間撹拌した。その後、4.8g (1.5当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間撹拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 96% (NMRから決定した)。

10

【0047】

実施例 13

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間撹拌した。その後、2.91g (1当量)の量のトリクロロイソシアヌル酸を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間撹拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 97% (NMRから決定した)。

【0048】

20

実施例 14

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間撹拌した。その後、0.87g (0.3当量)の量のトリクロロイソシアヌル酸を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間撹拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 71% (NMRから決定した)。

【0049】

実施例 15

30

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間撹拌した。その後、3.2g (1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で5時間撹拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 52% (NMRから決定した)。

【0050】

実施例 16

ヒアルロナンクロラミドの調製

40

5gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間撹拌した。その後、3.2g (1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で48時間撹拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 85% (NMRから決定した)。NMR溶液 (D_2O 0.7ml中の7mgの生成物)を、20℃でさらに5日間放置した後に測定した。DS値は84%と決定された。粉末の形態の固体部分は20℃で100日間放置し、その後、その試料を D_2O に溶解した。DS値は84%と決定された。

【0051】

50

実施例 17

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, その溶液を 20 の温度で 15 分間攪拌した。その後, 3.2 g (1 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を 5 の温度で 72 時間攪拌した。続いて, その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 2 リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20 時間真空乾燥した。DS 64% (NMR から決定した)。

【0052】

実施例 18

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, その溶液を 20 の温度で 15 分間攪拌した。その後, 3.2 g (1 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を 40 の温度で 5 時間攪拌した。続いて, その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を, 2 リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20 時間真空乾燥した。DS 75% (NMR から決定した)。

【0053】

実施例 19

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 300 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, その溶液を 20 の温度で 15 分間攪拌した。その後, 2.56 g (0.8 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を 20 の温度で 24 時間攪拌した。続いて, その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 2 リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20 時間真空乾燥した。DS 79% (NMR から決定した)。

【0054】

実施例 20

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 300 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 350 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, その溶液を 20 の温度で 5 分間攪拌した。その後, 2.56 g (0.8 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を 17 の温度で 22 時間攪拌した。続いて, その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 2 リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20 時間真空乾燥した。DS 66% (NMR から決定した)。

【0055】

実施例 21

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 300 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 250 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 2 mlの酢酸を添加し, その溶液を 5 の温度で 15 分間攪拌した。その後, 2.56 g (0.8 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後, その混合物を 5 の温度で 24 時間攪拌した。続いて, その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 2 リットルのイソプロパノールで洗浄し, 20 時間真空乾燥した。DS 50% (NMR から決定した)。

【0056】

実施例 22

ヒアルロナンのエチルエステルクロラミドの調製

実施例 1 によって調製したヒアルロナンエチルエステル 0.5 gを 25 mlの蒸留水に溶解した。続いて, 0.2 mlの酢酸を添加し, その溶液を 20 の温度で 15 分間攪拌した。その後, 0.32 g (1 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した

10

20

30

40

50

。その後、その混合物を 20 の温度で 24 時間撹拌した。続いて、その混合物を 250 ml のイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 0.2 リットルのイソプロパノールで洗浄し、20 時間真空乾燥した。DS 80% (NMR から決定した)。

【0057】

実施例 23

ヒアルロナンのベンジルエステルのクロラミドの調製

実施例 2 によって調製したヒアルロナンのベンジルエステル 0.5 g を、25 ml の蒸留水に溶解した。続いて、0.2 ml の酢酸を添加し、その溶液を 20 の温度で 15 分間撹拌した。その後、0.32 g (1 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を 20 の温度で 24 時間撹拌した。続いて、その混合物を 0.25 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 0.2 リットルのイソプロパノールで洗浄し、20 時間真空乾燥した。DS 78% (NMR から決定した)。

10

【0058】

実施例 24

ヒアルロナンのホルミルの調製

実施例 4 によって調製したヒアルロナンホルミル 0.5 g を 25 ml の蒸留水に溶解した。続いて、0.2 ml の酢酸を添加し、その溶液を 20 の温度で 15 分間撹拌した。その後、0.32 g (1 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を 20 の温度で 24 時間撹拌した。続いて、その混合物を 0.25 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 0.2 リットルのイソプロパノールで洗浄し、20 時間真空乾燥した。DS 75% (NMR から決定した)。

20

【0059】

実施例 25

凍結乾燥したヒアルロナンのクロラミドの調製

蒸留水 10 ml 中の実施例 5 により調製された 0.2 g のヒアルロナンのクロラミドの溶液を直ちに均質化に続いて、-50 の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。DS 値は NMR によって 70% として決定した。

【0060】

実施例 26

ヒアルロナンのエチルエステルの凍結乾燥したクロラミドの調製

蒸留水中 10 ml 中の実施例 22 により調製されたヒアルロナンのエチルエステルのクロラミド 0.2 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50 の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。DS 値は NMR によって 68% と決定された。

30

【0061】

実施例 27

凍結乾燥したヒアルロナンのベンジルエステルのクロラミドの調製

蒸留水中 10 ml 中の実施例 23 により調製されたヒアルロナンのベンジルエステルのクロラミド 0.2 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50 の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。DS 値は NMR によって 67% と決定された。

40

【0062】

実施例 28

ヒアルロナンのクロラミドで作られたステープルファイバーからの不織布の製造

2% 溶液の調製のために、NMR による置換度が 71% のヒアルロナンのクロラミド (実施例 14) を使用した。上記の成分を秤量し、必要な量の蒸留水を添加した。全混合物を、室温で、撹拌機中、該撹拌機の規定速度を 500 rpm として、撹拌時間 24 時間で撹拌した。最終溶液は透明で、わずかに粘性であった。ステープルファイバーの製造法は、100% のイソプロパノールを含む可動の凝固浴の液流中の高分子溶液の析出をベースとする。続いて、上記溶液を、糸道ダクト (1 管 / 直径 8 mm) を通して供給される凝固浴流中へ押出ノズルにより室温でドーズした。この浴の制御した流速は 1.15 m/s である。

50

ステーブルファイバーの形成は析出によって得られた。形成されたファイバーを浴流中に漂わせ、分離コーム (separation combs) に捕獲し、100%イソプロパノールを含む熟成浴に移した。熟成浴に入れた直後に、この粗ファイバー (raw fiber) を、ファイバーの量と浴の量の比率 0.5 g / 350 ml で、攪拌機の回転ブレードによって粉碎した。最終的な繊維の分散液をフィルターフレームを通し多孔基材を通して濾過した。与えられた実験については、表面積 64 cm² のフィルターフレームを使用した。濾過した後に、不織布の固着と共に、PAD ニットファブリックを用いてファイバーを乾燥装置上に移した。乾燥装置上に置かれる前に、析出残渣をローラーでファイバーから取り除いた。この不織布を 40 °C の温度で 30 分間乾燥した。生じた層を、自己支持性層として基材から分離し、化学天秤によって秤量した。織物の面積重量は 50.2 g/m² であった。形成した不織布の置換度は NMR によって 64% と決定された。

10

【0063】

実施例 29

ヒアルロナンクロラミドからのナノファイバー層の製造

ヒアルロン酸を含むナノファイバー層の製造のために、下記の組成の水溶液を調製した。実施例 5 により調製されたヒアルロナンクロラミドの濃度は乾燥分で 37.5% であり、80 kg.mol⁻¹ の分子量の天然のヒアルロナンの濃度は 37.5% であり、600 kg.mol⁻¹ の分子量のポリエチレンオキシドの量は 2.5% であった。全乾燥分の濃度は 5% であった。この溶液をシリンジに供給し、針なし線状ノズル (a needleless linear nozzle) を用いて、コレクタエミッタ間の電圧 50 kV 及び間隔 16 cm で、プレート型コレクター上の静電場で紡糸した。ファイバーの寸法は 110 ± 27 nm であった。DS 値は NMR によって 30% と決定された。

20

【0064】

実施例 30

ヒアルロナンクロラミドからの自己支持性フィルムの製造

該フィルムの調製を、密閉チャンバーでフィルムを乾燥する特別な乾燥装置中に行った。該装置は温度が制御可能な底板及び天板を装備していた。装置の詳細な説明は刊行物 (Foglarova et al., PV2015-166; Foglarova M. Et al., Carbohydrate Polymers 2016, 144, 68-75) に提供されている。実施例 5 に記載した秤量 200 mg のヒアルロナンクロラミドを、20 ml の脱塩水に溶解し、生じた溶液を 2 時間攪拌した。その後、最終溶液を乾燥装置内のパッド (疎水化ガラス) 上にドーズし、18 時間密閉チャンバーで乾燥した。乾燥機の底板及び天板の温度は各々 50 °C 及び 20 °C であった。乾燥した後に、フィルムをパッドから外し、将来の使用のために保管した。DS 値は NMR によって 60% と決定された。

30

【0065】

実施例 31

ラウロイルヒアルロナン及び天然のヒアルロナン (4 / 1) からの自己支持性フィルムの調製

フィルムの調製は実施例 30 に記載した装置中で行なった。秤量 160 mg のヒアルロン酸ナトリウムのラウロイル誘導体 (実施例 3 に記載) を、2-プロパノールの水溶液 (50 重量%) 16 ml に溶解し、生じた溶液を 18 時間攪拌した。秤量 40 mg の分子量 330 kg.mol⁻¹ の天然のヒアルロナンを 4 ml の脱塩水に溶解し、生じた溶液を 18 時間攪拌した。続いて、両方の溶液を混合し 30 分間攪拌した。その後、生じた混合溶液を、乾燥装置のパッド (疎水化ガラス) 上にドーズし、7 時間密閉チャンバーで乾燥した。乾燥機の底板及び天板の温度は各々 50 °C 及び 20 °C であった。乾燥した後に、フィルムをパッドから外し、将来の使用のために保管した。

40

【0066】

実施例 32

ラウロイルヒアルロナン及びヒアルロナンクロラミド (3 / 1) からの自己支持性フィルムの調製

50

フィルムの調製は実施例 30 に記載した装置の中で行なった。秤量 150 mg のヒアルロン酸ナトリウムのラウロイル誘導体（実施例 3 に記載）を 2 - プロパノールの水溶液（50 重量％）15 ml に溶解し、生じた溶液を 18 時間撹拌した。秤量 50 mg の実施例 5 に記載のヒアルロナンクロラミドを 5 ml の脱塩水に溶解し、生じた溶液を 2 時間撹拌した。続いて、両方の溶液を混合し 30 分間撹拌した。その後、生じた混合溶液を、乾燥装置のパッド（疎水化ガラス）上にドーズし、7 時間密閉チャンバーで乾燥した。乾燥機の底板及び天板の温度は各々 50 及び 20 であった。乾燥した後に、フィルムをパッドから外し、将来の使用のために保管した。最終材料中のヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR によって 25 % と決定された。

【0067】

10

実施例 33

ラウロイルヒアルロナン及びヒアルロナンクロラミド（4 / 1）からの自己支持性フィルムの製造

フィルムの調製は実施例 30 に記載した装置の中で行なった。秤量 160 mg のヒアルロン酸ナトリウムのラウロイル誘導体（実施例 3 に記載）を、16 ml の 2 - プロパノールの水溶液（50 重量％）に溶解し、生じた溶液を 18 時間撹拌した。秤量 40 mg の実施例 5 に記載のヒアルロナンクロラミドを 4 ml の脱塩水に溶解し、生じた溶液を 2 時間撹拌した。続いて、両方の溶液を混合し 30 分間撹拌した。その後、生じた混合溶液を、乾燥装置のパッド（疎水化ガラス）上にドーズし、7 時間密閉チャンバーで乾燥した。乾燥機の底板及び天板の温度は各々 50 及び 20 であった。乾燥した後に、フィルムをパッドから外し、将来の使用のために保管した。最終材料中のヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR によって 20 % と決定された。

20

【0068】

実施例 34

ヒアルロナンクロラミドで製造されたファイバーからのニット布の製造

ファイバーの形成に使用した最初の原料は、実施例 14 によって調製したヒアルロナンクロラミドであった。脱塩水中に前述のポリマーを溶解させることによって濃度 4.7 % の溶液を調製した。溶解の後、溶液をシリンジに移し、遠心機によって脱気した。その溶液を、乳酸及びイソプロパノール 1 : 4 の混合物からなる凝固浴の中に 200 μ l/min の速度でドーズした。ファイバーを 1.45 m/min の速度で巻き取った。続いて、このファイバーをイソプロピルアルコールで洗浄し、乾燥した。このファイバーには下記の特性があった：9 テックスの細さ、1.0 N の引張強さ及び 11 % の伸び。このクロラミドの DS 値は NMR によって 34 % と決定された。ニット布を得る目的で、3 本のファイバーを、リング型撚系機中、10 m/分の供給速度及び 3000 min^{-1} のスピンドル速度で束ねて縫った；最終的な縫り数は 300 m^{-1} であった。二床たて編機（a double-bed warp knitting machine）を使用して、閉ループ結合（a closed-loop binding）を有する両面ウェフトニットをスレッドから製造した。最終的なニットストリップは、10 mm の幅、99 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ の基本重量及び 36 cm^{-2} のループ密度を有していた。

30

【0069】

実施例 35

40

ラウロイルヒアルロナン及びヒアルロナンクロラミド（4 / 1）で製造されたファイバーからのニット布の調製

ファイバーの形成に使用した最初の原料は、実施例 3 によって調製したラウロイルヒアルロナン 400 mg と実施例 14 によって調製したヒアルロナンクロラミド 100 mg を含むコンビネーションであった。秤量したヒアルロナンクロラミドを 6 ml の脱塩水に溶解し、5.1 ml のイソプロパノール及び秤量したラウロイルヒアルロナン（NMR による DS : 91 % , MW 300 - 350 kDa）を添加した。調製した溶液（4.5 % の濃度であった）を、シリンジへ移し、遠心機によって脱気した。続いて、その溶液を、乳酸及びイソプロパノール 1 : 4 の混合物からなる凝固浴中に 200 μ l/分の速度でドーズした。該ファイバーを 1.32 m/分の速度で巻き取った。その後、該ファイバーをイソプロピルアル

50

コールで洗浄し、アセトンで安定化し、乾燥させた。該ファイバーは下記の特性を有していた：8 テックスの細さ，0.7 Nの引張強さ及び16 %の伸び。ニット布を得る目的で，3本のファイバーを，リング型撚糸機中，10 m/minの供給速度及び3000 min⁻¹のスピンデル速度で束ねて撚った；最終的な撚り数は300 m⁻¹であった。二床たて編機を使用して，閉じ目結合を有する両面ウェフトニットをスレッドから製造した。最終的なニットストリップは，10 mmの幅，91 g.m⁻²の基本重量及び36 cm⁻²のループ密度を有していた。

【0070】

実施例 36

凍結乾燥物の調製：酸化セルロース／ヒアルロナンクロラミド

10

蒸留水100 ml中の酸化セルロース (Mw 50 kg.mol⁻¹) 0.3 g及び実施例 5 により調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 gの溶液を，均質化に続いて直ちに - 50 の温度で急速冷凍し，凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって24 %と決定された。

【0071】

実施例 37

凍結乾燥物の調製：アルギナート／ヒアルロナンクロラミド

蒸留水100 ml中のアルギナート (Mw 40 kg.mol⁻¹) 0.3 g及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 gの溶液を，均質化に続いて直ちに - 50 の温度で急速冷凍し，凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって26 %と決定された。

20

【0072】

実施例 38

凍結乾燥物の調製：カルボキシメチルセルロース／ヒアルロナンクロラミド

蒸留水中100 mlのカルボキシメチルセルロース (Mw 30 kg.mol⁻¹) 0.3 g及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.03 gの溶液を，均質化に続いて直ちに - 50 の温度で急速冷凍し，凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって3 %と決定された。

【0073】

実施例 39

凍結乾燥物の調製：コンドロイチン硫酸／ヒアルロナンクロラミド

30

蒸留水100 ml中のコンドロイチン硫酸 (Mw 45 kg.mol⁻¹) 0.03 g及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.3 gの溶液を，均質化に続いて直ちに - 50 の温度で急速冷凍し，凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって75 %と決定された。

【0074】

実施例 40

凍結乾燥物の調製：ヒドロキシエチルセルロース／ヒアルロナンクロラミド

蒸留水100 ml中のヒドロキシエチルセルロース (Mw 45 kg.mol⁻¹) 0.3 g及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 gの溶液を，均質化に続いて直ちに - 50 の温度で急速冷凍し，凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって25 %決定された。

40

【0075】

実施例 41

凍結乾燥物の調製：ヒアルロナンホルミル／ヒアルロナンクロラミド

蒸留水100 ml中の実施例 4 によって調製したホルミル・ヒアルロナン (Mw 45 kg.mol⁻¹) 0.3 g及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 gの溶液を，均質化に続いて直ちに - 50 の温度で急速冷凍し，凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって25 %と決定された。

【0076】

50

実施例 4 2

凍結乾燥物の調製：CaCl₂で架橋したヒアルロナンクロラミド

蒸留水 100 ml 中の実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド (0.1 g) の溶液に 0.01 g の CaCl₂・2H₂O を添加し、その混合物を 20℃ で 1 時間攪拌した。均質化に続いて、最終粘稠溶液を -50℃ の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR によって 64% と決定された。

【0077】

実施例 4 3

インビトロ抗菌活性試験 (図 1 及び 2) :

試験する個々の微生物について、約 10⁵ の CFU/ml の濃度を有する懸濁液を調製した。100 µl の量の懸濁液を、ペトリ皿中のトリプトンソイ寒天の表面上に接種した (各皿に適用した微生物の概数は 10⁴ CFU であった)。その懸濁液を、滅菌ループにより皿の全表面に様に広げた。寒天に懸濁液を吸収させた後に、寒天の表面を試験のために選択された無菌の正方形の試料で覆った。試験する細菌株は 37℃ で 24 時間培養した。この試験は、実施例 25 によって調製された凍結乾燥したヒアルロナンクロラミド、及び実施例 32 によって調製されたヒアルロナンクロラミドを含む自己支持性フィルムの試験を含み、それぞれの対照材料はヒアルロナンクロラミドを含まない類似の四角片によって構成されていた。その目的のため、8 ~ 12 mg の重量で約 15 mm x 15 mm の大きさを有する四角片を作成した。有効性試験については拡散プレート法 (2D レイアウト) を選択した。培養のためには非選択的な基材 (トリプトンソイ寒天) を選択した。正方形の試料は下記の微生物に関して試験した: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis*。図 1 及び 2 は、ヒアルロナンクロラミドを含まない対照材料と比較して、本発明によるヒアルロナンクロラミドを含む組成物が著しく高い細菌増殖抑制の効果を与えることを明確に示す。

【0078】

実施例 4 4

プラーク減少に基づいた抗ウイルス活性の試験:

繰り返し数: 5, 実施例 19 により調製した試験物質, 試験したウイルス: 濃度 3 x 10⁷ PFU/ml の CVB3 (Nancy), VERO 細胞基材

方法:

1. 5 ml の体積に 10⁷ 倍希釈した後、ウイルスをペトリ皿中の細胞基材上に 30 分間吸着させた。ネガティブ対照は、ウイルスを含まない PBS を入れた。その後、ウイルスを吸引によって除去し、細胞に試験物質 (又はネガティブ対照材料に含まれる HA 及び PBS) の層を挿入し、5% CO₂ の存在下、37℃ で 5 時間インキュベートした。該細胞を PBS で洗浄し、不活化した FBS 5% 及びアガロース 0.75% を添加した MEM を含む培地の層で覆った。CO₂ 5% を含む環境中、37℃ で 4 日間のインキュベーション。続いて、培地を除去し、細胞をクリスタルバイオレット染料によって染色し、プラークの数を測定した。試験中、抗ウイルス活性はプラークの数の減少に比例した。

10

20

30

40

グループの記載	試験物質と共にインキュベーション	P D 上の P F U					平均	S D
P B S による細胞の試験	P B S	0	0	0	0	0	0	0
H A による細胞の試験	P B S 中の 1 % の H A クロラミド	0	0	0	0	0	0	0
毒性試験	P B S 中の 1 % の H A クロラミド	0	0	0	0	0	0	0
P B S によるウイルスの試験	P B S	13	9	7	14	10	10.6	2.88
H A によるウイルスの試験	P B S 中の 1 % の H A	10	6	14	12	10	10.4	2.97
試験 1	P B S 中の 0. 1 % の H A クロラミド	5	7	10	8	9	7.8	1.92
試験 2	P B S 中の 0. 5 % の H A クロラミド	8	5	8	7	8	7.2	1.3
試験 3	P B S 中の 1 % の H A クロラミド	4	1	2	3	3	2.6	1.14

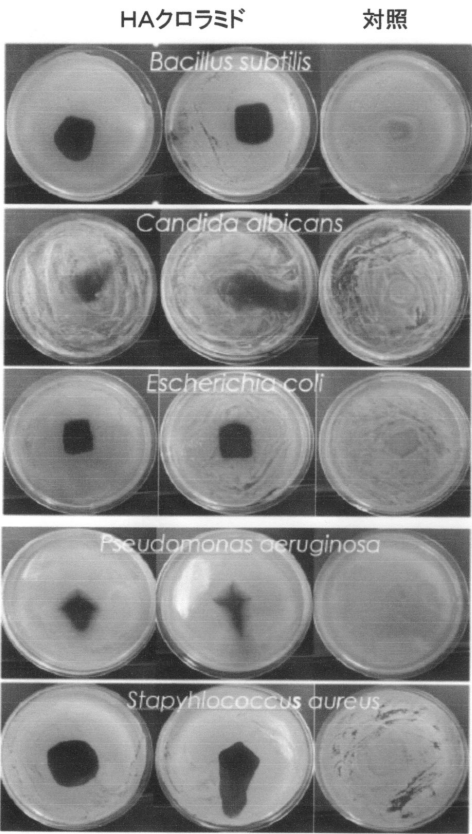
F B S : ウシ胎児血清 , V E R O : Cercopithecus aethiops の腎臓に由来する安定化された細胞系 , E M E M : イーグルの最少必須培地 , $3 \times 10^7 . 5$ PFU/ml : 感染懸濁液の調製のために使用したウイルスの濃度 - 1 ml 当たり $3 \times 10^7 . 5$ プラーク形成単位 , PFU/ml はウイルスの量の単位であり , PFU はプラーク形成単位である , P D : ペトリ皿 , S D : 標準偏差。

【 0 0 7 9 】

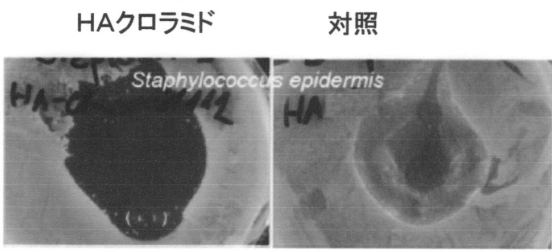
得られた結果は , 標準の「 H A によるウイルスの試験」と比較して , ヒアルロナンクロラミドの存在がウイルス増殖の抑制を引き起こすこと (試験 1 , 2 及び 3) , 及びヒアルロナンクロラミドの濃度が増加するとその抑制がより効率的になることを明確に示す。

【図面】

【図 1 A】



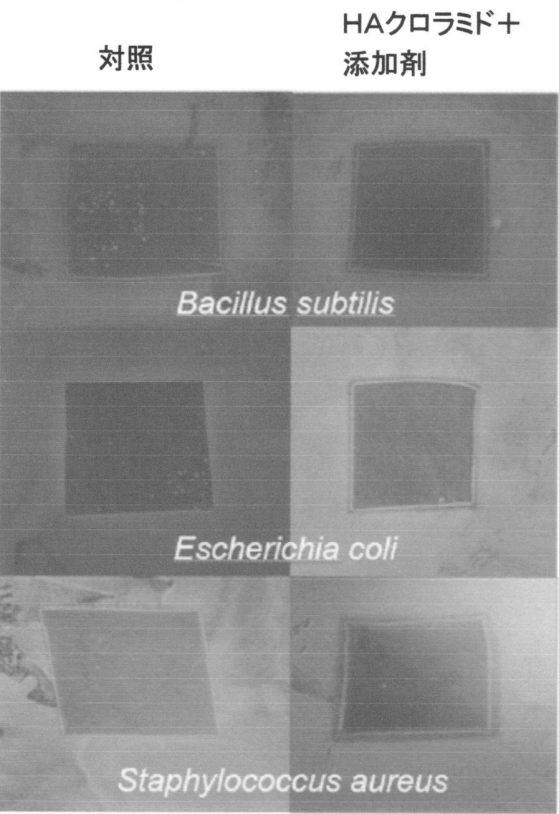
【図 1 B】



10

20

【図 2】



30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	9/70 (2006.01)	A 6 1 K	9/70	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/10 (2017.01)	A 6 1 K	47/10	
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K	47/36	
A 6 1 K	47/38 (2006.01)	A 6 1 K	47/38	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 L	15/28 (2006.01)	A 6 1 L	15/28	1 0 0

エルキー ハイエク 1 5 5 2

(72)発明者 クノトコヴァ, カテリナ

チェコ, 5 6 5 0 1 ホツェニ, ストロモヴカ 2 4 8

(72)発明者 クルハネク, ヤロミール

チェコ, ビーレー プジェドムニェスティー, 5 3 0 0 3 パルドゥピツェ, ダシツカー 1 7 6 9

(72)発明者 フメラシュ, ヨセフ

チェコ, ヒルヴァーティ, 5 6 2 0 3 ウスチー ナト オルリツィー, ポッド レセム 4 7 2

(72)発明者 ピチュハ, トマシュ

チェコ, フルディム アイ, 5 3 7 0 1 フルディム, プジェティスラヴォヴァ 6 5

(72)発明者 フラドコヴァ, ドラホミラ

チェコ, 5 6 1 5 1 ルカヴィツェ, ルカヴィツェ シー・ピー・ 2 0 7

(72)発明者 クレイチャー, ヘレナ

チェコ, プジェドムニェスティー, 5 6 8 0 2 スヴィタヴィー, パヴロヴォヴァ 1 4 2 4 / 1 1

(72)発明者 ヴァグネロヴァ, ハナ

チェコ, 5 6 1 5 3 ドルニ チェルムナー, ドルニ チェルムナー シー・ピー・ 1 0 2

(72)発明者 ソイカ, マルティン

スロバキア, 9 3 0 3 4 ホリツェ ナ オストロフ, スタラ ガラ 8 3

(72)発明者 ソボツカ, ルボス

チェコ, マルショヴィツェ, 5 0 0 0 9 フラデツ クラーローヴェー, ケー オサデ 7 3 0 / 7

(72)発明者 ヴェレブニー, ヴラディミル

チェコ, 5 6 4 0 1 ジャンベルク, サドヴァ 1 4 6 6

審査官 水島 英一郎

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 0 7 3 0 6 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 1 1 3 7 7 (J P , A)

特表 2 0 1 3 - 5 1 3 6 7 2 (J P , A)

J. AM. CHEM. SOC. , 2003年, 125(45), 13719-13733

Biomacromolecules , 2013年, 14, 585-601

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 8 B

C A p l u s (S T N)

R E G I S T R Y (S T N)