(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 917 T2** 2006.08.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 142 595 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 917.9**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 117 023.0**
(96) Europäischer Anmeldetag: **16.04.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.10.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **23.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61L 24/08*** (2006.01)
A61L 27/46 (2006.01)
A61L 27/44 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
PD920072 17.04.1992 IT

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Fidia Farmaceutici S.p.A., Abano Terme, Padua/Padova, IT

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
Dorigatti, Franco, 38015 Lavis, IT; Callegaro, Lanfranco, 336016 Thiene, IT; Romeo, Aurelio, 00161 Rome, IT

(54) Bezeichnung: **Biomaterial für Knochenersatz**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Biomaterialien, d.h. Bindelösungen für granulären Knochenersatz und Knochenersatz in Form von Pasten, umfassend Hyaluronsäure und Hyaluronsäurederivate.

Beschreibung des verwandten Fachgebiets

Hyaluronsäure

[0002] Hyaluronsäure ist ein natürliches Polysaccharid, das aus abwechselnd angeordneten Resten von D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucuronsäure besteht. Es handelt sich um ein lineares Polymer, das einen großen Molekulargewichtsbereich aufweist, welcher von der Ausgangsquelle, der Herstellungsweise und der Art der Molekulargewichtsbestimmung abhängt. In der Natur kommt es in der gelförmigen Substanz des perizellulären Raums, in der Grundsubstanz des Bindegewebes von Wirbeltieren, worin es die Hauptkomponente bildet, in der Synovialflüssigkeit der Gelenke, in der Glaskörperflüssigkeit, in Nabelschnurgewebe und in Hahnenkämmen vor.

[0003] Es sind spezifische Hyaluronsäurefraktionen mit bestimmten Molekulargewichten bekannt, welche keine entzündliche Aktivität besitzen und daher zur Förderung der Wundheilung oder als ein Ersatz für endobulbäre Flüssigkeit oder bei der Therapie von Gelenkpathologien durch intraartikuläre Injektion verwendet werden können, wie in dem Europäischen Patent Nr. 0138572, erteilt an die Anmelder, beschrieben ist.

[0004] Es sind auch Hyaluronsäureester bekannt, worin alle oder ein Teil der Carboxylgruppen der Säure verestert sind, und auch deren Verwendung auf den Gebieten der Pharmazeutika, Kosmetika und bioabbaubaren Kunststoffmaterialien, wie in den US-Patenten Nrn. 4,851,521 und 4,965,353, ebenfalls erteilt an die Anmelder, beschrieben ist.

[0005] Es ist bekannt, daß Hyaluronsäure eine wesentliche Rolle bei den Prozessen der Gewebewiederherstellung spielt, insbesondere in den ersten Schritten davon, d.h. bei der Bildung von Granulationsgewebe, der Stabilisierung der Koagulationsmatrix und der Kontrolle des Abbaus davon, der Förderung der Rekrutierung von Entzündungszellen wie polymorphkernigen Leukocyten und Monocyten und von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen sowie der Steuerung der nachfolgenden Migration der Epithelzellen.

[0006] Es ist ferner bekannt, daß die Heilung von Druckgeschwüren, Wunden und Verbrennungen durch das Aufbringen von Hyaluronsäurelösungen beschleunigt wird. Die Rolle von Hyaluronsäure in den verschiedenen Stadien der Gewebewiederherstellung ist mittels der Konstruktion eines theoretischen Modells durch Weigel P. H. et al., "A Model for the Role of Hyaluronic Acid and Fibrin in the Early Events During the Inflammatory Response and Wound Healing", J. Theor. Biol. 119 (1986), 219, beschrieben worden.

Granulärer Knochenersatz

[0007] Granuläre Knochenersatzstoffe sind eingehend untersucht worden und werden in der Zahnheilkunde und der Medizin wegen ihren biokompatiblen und knochenkonduktiven Eigenschaften, sowie infolge der Eigenschaft, unterschiedliche Hohlräume, wie durch Alveolarknochenschwund verursachte Hohlräume, nach Zahnextraktionen entstandene Hohlräume und Zystenhohlräume, ohne Schwierigkeiten auszufüllen, häufig verwendet. Eine Hauptschwierigkeit bei der Verwendung dieser Stoffe ist deren unzureichende Bindeeigenschaft, wodurch sie entweder während oder nach der Anwendung leicht verschoben werden. Um diesen Nachteil zu überwinden, sind verschiedene Arten von Bindematerialien für die Herstellung von Knochengranula enthaltenden Pasten vorgeschlagen worden. Fibrin wird bereits verwendet, wie in den Patentanmeldungen JP-A-60254640 und JP-A-60254641 beschrieben ist.

[0008] Ein Nachteil der Verwendung von Fibrin als ein Bindemittel ist, daß es aufgrund seiner menschlichen Herkunft eine Infektion durch das Hepatitisvirus sowie durch HIV oder andere Viren hervorrufen kann. Daher sind andere Materialien wie Pillulan, Chitin, Glykol, Carbomethylenchitin und Pektin, wie in der Patentanmeldung EP 0416398 beschrieben, vorgeschlagen worden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer viskosen Lösung, die aus Hyaluronsäure und/oder Hyaluronsäureestern oder Salzen von Hyaluronsäure in Verbindung mit Antibiotika besteht, welche allein oder in Kombination miteinander verwendet werden, um eine Bindung für Knochenersatz in granulärer Form zur Verwendung in der Zahnheilkunde oder auf allen Gebieten der Chirurgie vorzusehen. Solche Lösungen weisen hervorragende biokompatible und bioabsorbierbare Eigenschaften auf und neigen nicht dazu, Probleme wie eine Infektion hervorzurufen.

[0010] Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer Paste, welche eine viskose Lösung aus Hyaluronsäure und/oder Hyaluronsäureestern oder Salzen von Hyaluronsäure in Verbindung mit Antibiotika, welche allein oder in Kombination miteinander verwendet werden, und Knochengranula umfaßt. Die in die Paste eingebrachten Granula haften fest aneinander, wodurch deren Verwendung in der Zahnheilkunde und der Knochenchirurgie ermöglicht wird.

[0011] Ein weiterer Bereich für die Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung wird aus der nachstehend bereitgestellten ausführlichen Beschreibung offensichtlich. Es sollte jedoch selbstverständlich sein, daß die ausführliche Beschreibung und die spezifischen Beispiele, welche bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung veranschaulichen, nur zur Erläuterung angegeben werden, da aus dieser ausführlichen Beschreibung für den Fachmann verschiedene Veränderungen und Modifikationen innerhalb des Geistes und des Schutzumfangs der Erfindung ersichtlich werden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0012] Die folgende ausführliche Beschreibung wird bereitgestellt, um dem Fachmann bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung behilflich zu sein. Trotzdem sollte die folgende ausführliche Beschreibung nicht als eine unangemessene Begrenzung der vorliegenden Erfindung gedeutet werden, da durch den Fachmann Modifikationen und Veränderungen in den hierin besprochenen Ausführungsformen vorgenommen werden können, ohne vom Geist oder Schutzumfang der Entdeckung der vorliegenden Erfindung abzuweichen.

[0013] Die Inhalte einer jeden der hierin erwähnten Dokumente sind durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit eingeschlossen.

[0014] Die vorstehenden Aufgaben werden dadurch gelöst, daß Hyaluronsäure, Ester von Hyaluronsäure oder Salze von Hyaluronsäure in Verbindung mit Antibiotika, welche allein oder in Kombination miteinander verwendet werden, in Wasser gelöst werden, um hochviskose Lösungen zu bilden. Die Viskosität solcher Lösungen beträgt mindestens 15 Pa·s, vorzugsweise mehr als 22 Pa·s, bei einer Temperatur von 25°C und 50% ± 5% relativer Feuchtigkeit. Je mehr sich die Viskosität dem unteren Grenzwert nähert, desto flüssiger ist die Lösung; und je höher die Viskosität ist, desto dichter ist die Lösung. Der genaue Viskositätsgrad für optimale Verarbeitungsbedingungen ist ein subjektiver Parameter, welcher von dem Individuum abhängt, das die Viskosität davon durch Variieren der Konzentration der Lösung verändern kann. Die Eigenschaften des Materials, welches die Lösung umfaßt, wie das Molekulargewicht davon, werden gemäß dem erforderlichen Viskositätsgrad ausgewählt.

[0015] Die erfindungsgemäße Lösung wird durch Solubilisieren von Hyaluronsäure, einem partiellen Ester von Hyaluronsäure oder einer Mischung davon oder einem Salz von Hyaluronsäure in Verbindung mit einem Antibiotikum oder einer Mischung davon, welche vorher mit Gammastrahlen sterilisiert wurden, in sterilem Wasser oder einem Puffer hergestellt.

[0016] Die erfindungsgemäß verwendbaren Ester von Hyaluronsäure sind in den US-Patenten Nrn. 4,851,521 und 4,965,353 sowie in der PCT-Veröffentlichung WO 92/13579 beschrieben. Die erfindungsgemäß verwendbaren Salze von Hyaluronsäure in Verbindung mit Antibiotika sind in US-Patent Nr. 5,166,331 beschrieben. Diese können allein oder in verschiedenen Kombination miteinander oder zusammen mit Hyaluronsäure verwendet werden.

[0017] Das Pulver wird bei einer Temperatur von 25°C ± 2°C und 50% ± 5% Feuchtigkeit unter einem Sterilabzug in das Gefäß zur Solubilisierung eingebracht. Die Solubilisierung kann in einem Mischer, der aus zwei Spiralelementen besteht, die sich in entgegengesetzten Richtungen drehen, bewirkt werden.

[0018] Die Betriebsbedingungen hängen von der gewünschten Viskosität ab und können wie folgt sein:

Endviskosität	Solubilisierungs-temperatur	Anzahl der Drehungen im Mischer	Solubilisierungs-dauer
15 Pa.s	30°C ± 5°C	60 UpM	4 Stunden
22 Pa.s	45°C ± 2°C	40 UpM	8 Stunden

[0019] Vor der Verwendung wird die gesamte Luft aus der Lösung entfernt, indem sie während zwei Stunden einem verminderten Druck (Minimum 0,01 mbar) ausgesetzt wird. Es ist möglich, eine Lösung, welche aus einem nicht sterilen Material hergestellt wurde, dadurch zu sterilisieren, daß sie durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert wird. In diesem Fall kann die Lösung zur Vereinfachung der Filtration zuerst bei einer Viskosität, welche niedriger ist als diejenige, welche für die Verwendung davon erforderlich ist, hergestellt werden. Die Lösung wird dann filtriert und anschließend unter vermindertem Druck destilliert, bis sie die Konzentration erreicht, welche der gewünschten Viskosität entspricht. Die so hergestellten Lösungen können mit Knochengranula vermischt werden, um eine Paste zu bilden, welche zum Füllen von Knochenhohlräumen und -defekten verwendet wird. Das Verhältnis zwischen der Menge der Lösung und der Menge der Granula beträgt 1:3 (Gew./Gew.) oder mehr. Falls die Menge der Lösung zu gering ist, werden die Granula nicht ausreichend miteinander verbunden, so daß mehr der Lösung zugegeben werden muß. Falls die Paste für eine einfache Anwendung zu flüssig ist, kann sie für etwa zwei Minuten einem Hochvakuum ausgesetzt werden, wobei dieser Vorgang wiederholt wird, bis die geeignete Konsistenz erhalten wird.

[0020] Die erfindungsgemäß verwendbaren Knochengranula sind nicht besonders begrenzt. Im Allgemeinen ist es möglich solche zu verwenden, welche bereits allgemein gebräuchlich sind. Beispiele hierfür sind in den US-Patenten Nrn. 4,693,986 und 4,629,464 zu finden. Der Durchmesser der Granula kann zwischen 50 µm und 5 mm liegen, und die Granula können porös oder nichtporös sein. Materialien, die wegen ihrer Biokompatibilität bevorzugt werden, schließen Granula von Hydroxyapatit, Tricalciumphosphat und Calciumcarbonat ein.

[0021] Nachstehend werden einige Beispiele für die Herstellung von erfindungsgemäßen Lösungen und Pasten beschrieben, welche ausschließlich veranschaulichenden Zwecken dienen.

Ester von Hyaluronsäure

[0022] Erfindungsgemäß nützliche Ester von Hyaluronsäure sind Ester von Hyaluronsäure mit aliphatischen, araliphatischen, cycloaliphatischen oder heterocyclischen Alkoholen, in denen alle (sogenannte "vollständige Ester") oder nur ein Teil (sogenannte "partielle Ester") der Carboxylgruppen der Hyaluronsäure verestert sind, und Salze der partiellen Ester mit Metallen oder mit organischen Basen, welche unter einem pharmakologischen Gesichtspunkt biokompatibel oder verträglich sind.

[0023] Die nützlichen Ester schließen Ester ein, die von Alkoholen abgeleitet sind, welche selbst eine bedeutende pharmakologische Wirkung besitzen. Die gesättigten Alkohole der aliphatischen Reihe oder einfache Alkohole der cycloaliphatischen Reihe sind in der vorliegenden Erfindung nützlich.

[0024] In den vorstehend erwähnten Estern, worin einige der Carbonsäuregruppen frei bleiben (d.h. partielle Ester), können diese Gruppen ein Salz mit Metallen oder organischen Basen, wie mit Alkali- oder Erdalkalimetallen oder mit Ammoniak oder stickstoffhaltigen organischen Basen, bilden.

[0025] Die meisten Ester von Hyaluronsäure ("HY") zeigen im Gegensatz zu HY selbst einen gewissen Grad der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Diese Löslichkeit hängt von dem Prozentsatz der veresterten Carboxylgruppen und von der Art des Alkylrestes, welcher mit der Carboxylgruppe verbunden ist, ab. Daher weist eine HY-Verbindung, worin alle Carboxylgruppen in einer veresterten Form vorliegen, bei Raumtemperatur zum Beispiel in Dimethylsulfoxid eine hinreichende Löslichkeit auf (der Benzylester von HY löst sich in DMSO in einem Ausmaß von 200 mg/ml). Die meisten der vollständigen Ester von HY zeigen ebenfalls im Gegensatz zu HY und insbesondere deren Salzen eine unzureichende Löslichkeit in Wasser und sind in Wasser im Wesentlichen unlöslich. Die Löslichkeitseigenschaften zusammen mit besonderen und bemerkenswerten viskoelastischen Eigenschaften machen die HY-Ester zur Verwendung in zusammengesetzten Membranen besonders geeignet.

[0026] Alkohole der aliphatischen Reihe zur Verwendung als Veresterungskomponenten der Carboxylgrup-

pen von Hyaluronsäure für die Verwendung in erfindungsgemäßen zusammengesetzten Membranen sind zum Beispiel solche mit maximal 34 Kohlenstoffatomen, welche gesättigt oder ungesättigt sein können und welche möglicherweise auch mit anderen freien funktionellen oder funktionell modifizierten Gruppen wie Amin-, Hydroxyl-, Aldehyd-, Keton-, Mercaptan- oder Carboxylgruppen oder mit davon abgeleiteten Gruppen wie Kohlenwasserstoffresten oder Di-Kohlenwasserstoffaminresten (von nun an wird der Begriff Kohlenwasserstoff nicht nur verwendet, um auf monovalente Reste von Kohlenwasserstoffen wie solche vom C_nH_{2n+1}-Typ, sondern auch auf bivalente oder trivalente Reste wie Alkylene" C_nH_{2n} oder "Alkylidene" C_nH_{2n} zu verweisen), Ether- oder Estergruppen, Acetal- oder Ketalgruppen, Thioether- oder Thioestergruppen und veresterte Carboxyl- oder Carbamidgruppen sowie Carbamidgruppen, welche mit einem oder mehreren Kohlenwasserstoffresten, mit Nitrilgruppen oder mit Halogenatomen substituiert sind, substituiert sein können.

[0027] Von den vorstehend erwähnten, Kohlenwasserstoffreste enthaltenden Gruppen werden niedere aliphatische Reste wie Alkylreste mit maximal 6 Kohlenstoffatomen bevorzugt. Solche Alkohole können in der Kohlenstoffatomkette auch durch Heteroatome wie Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelatome unterbrochen sein. Bevorzugt werden Alkohole, welche mit einer oder zwei der funktionellen Gruppen substituiert sind.

[0028] Bevorzugt verwendete Alkohole aus der vorstehend erwähnten Gruppe sind solche mit höchstens 12 und insbesondere 6 Kohlenstoffatomen, und worin die Kohlenwasserstoffatome in den vorstehend erwähnten Amin-, Ether-, Ester-, Thioether-, Thioester-, Acetal- oder Ketalgruppen einen Alkylrest mit höchstens 4 Kohlenstoffatomen darstellen, und auch die Kohlenwasserstoffreste in den veresterten Carboxyl- oder substituierten Carbamidgruppen Alkylreste mit der gleichen Anzahl an Kohlenstoffatomen sind, und worin die Amin- oder Carbamidgruppen Alkylenamin- oder Alkylencarbamidreste mit maximal 8 Kohlenstoffatomen sein können. Von diesen Alkoholen werden gesättigte und unsubstituierte Alkohole wie die Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Isopropylalkohole, normaler Butylalkohol, Isobutylalkohol, tertiärer Butylalkohol, die Amyl-, Pentyl-, Hexyl-, Octyl-, Nonyl- und Dodecylalkohole, und insbesondere solche mit einer linearen Kette wie normale Octyl- und Dodecylalkohole besonders bevorzugt. Von den substituierten Alkoholen dieser Gruppe sind die zweiwertigen Alkohole wie Ethylenglykol, Propylenglykol und Butylenglykol, die dreiwertigen Alkohole wie Glycerin, die Aldehydalkohole wie Tartronalkohol, die Carboxylalkohole wie Milchsäuren, z.B. Glycolsäure, Äpfelsäure, die Weinsäuren, Citronensäure, die Aminoalkohole wie normales Aminoethanol, Aminopropanol, normales Aminobutanol und deren an der Amin-Funktion dimethylierten und diethylierten Derivate, Cholin, Pyrrolidinylethanol, Piperidinylethanol, Piperazinylethanol und die entsprechenden Derivate von normalem Propyl- oder normalem Butylalkohol, Monothioethylenglykol oder die Alkylderivate davon, wie die Ethylderivate in der Mercaptan-Funktion, nützlich.

[0029] Von den höheren gesättigten aliphatischen Alkoholen werden Cetylalkohol und Myricylalkohol bevorzugt, aber für die Aufgabe der vorliegenden Erfindung sind die höheren ungesättigten Alkohole mit einer oder zwei Doppelbindungen besonders wichtig, wie insbesondere solche, welche in vielen etherischen Ölen enthalten sind und eine chemische Verwandtschaft mit Terpen zeigen, wie Citronellol, Geraniol, Nerol, Nerolidol, Linalool, Farnesol oder Phytol. Von den ungesättigten niederen Alkoholen müssen Allylalkohol und Propargylalkohol berücksichtigt werden. Von den araliphatischen Alkoholen werden solche bevorzugt, welche nur einen Benzolrest aufweisen und worin die aliphatische Kette höchstens 4 Kohlenstoffatome aufweist, wobei der Benzolrest durch 1 bis 3 Methyl- oder Hydroxylgruppen oder durch Halogenatome, insbesondere durch Chlor, Brom und Iod, substituiert sein kann, und worin die aliphatische Kette durch eine oder mehrere Funktionen, gewählt aus der Gruppe bestehend aus freien Amingruppen oder mono- oder dimethylierten Amingruppen, oder durch Pyrrolidin- oder Piperidingruppen substituiert sein kann. Von diesen Alkoholen werden Benzylalkohol und Phenethylalkohol am meisten bevorzugt.

[0030] Die Alkohole der cycloaliphatischen oder aliphatisch-cycloaliphatischen Reihe können von mono- oder polycyclischen Kohlenwasserstoffen abgeleitet sein, können vorzugsweise maximal 34 Kohlenstoffatome aufweisen, können unsubstituiert sein und können einen oder mehrere Substituenten, wie die vorstehend für die aliphatischen Alkohole erwähnten, enthalten. Von den Alkoholen, welche von cyclischen Kohlenwasserstoffen mit einem Ring abgeleitet sind, werden solche mit maximal 12 Kohlenstoffatomen bevorzugt, wobei die Ringe vorzugsweise 5 bis 7 Kohlenstoffatome aufweisen, welche zum Beispiel durch einen bis drei niedere Alkylreste wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Isopropylgruppen substituiert sein können. Als spezifische Alkohole dieser Gruppe werden die folgenden am meisten bevorzugt: Cyclohexanol, Cyclohexandiol, 1,2,3-Cyclohexantriol und 1,3,5-Cyclohexantriol (Phloroglucit); Inosit; und die Alkohole, welche von p-Methan abgeleitet sind, wie Carvomenthol, Menthol und α-γ-Terpineol, 1-Terpineol, 4-Terpineol und Piperitol; oder die Mischung aus diesen Alkoholen, welche als "Terpineol" bekannt ist; sowie 1,4- und 1,8-Terpin. Von den Alkoholen, welche von Kohlenwasserstoffen mit kondensierten Ringen abgeleitet sind, wie solche von Thujan, Pinan oder Comphan, werden die folgenden bevorzugt: Thujanol, Sabinol, Pinol-Hydrat, D- und L-Borneol sowie D- und L-Isoborneol.

[0031] Aliphatisch-cycloaliphatische, polycyclische Alkohole, welche für die Ester der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind Sterole, Cholinsäuren und Steroide wie Sexualhormone und deren synthetischen Analoga, insbesondere Corticosteroide und deren Derivate. Es ist daher möglich, die folgenden Verbindungen zu verwenden: Cholesterin, Dihydrocholesterin, Epidihydrocholesterin, Coprostanol, Epicoprostanol, Sitosterol, Stigmasterol, Ergosterol, Cholinsäure, Desoxycholinsäure, Lithocholinsäure, Oestriol, Östradiol, Equilenin, Equilin und deren Alkylatderivate sowie deren Ethinyl- oder Propinylderivate in Position 17 wie 17α-Ethinyl-oestradiol oder 7α-Methyl-17α-ethinyl-oestradiol, Pregnenolon, Pregnandiol, Testosteron und dessen Derivate wie 17α-Methyltestosteron, 1,2-Dehydrotestosteron und 17α-Methyl-1,2-dehydrotestosteron, die Alkinylatderivate in Position 17 von Testosteron und 1,2-Dehydrotestosteron wie 17α-Ethinyltestosteron, 17α-Propinyltestosteron, Norgestrel, Hydroxyprogesteron, Corticosteron, Desoxycorticosteron, 19-Nortestosteron, 19-Nor-17α-methyltestosteron und 19-Nor-17α-ethinyltestosteron; und Antihormone wie Cyproteron, Cortison, Hydrocortison, Prednison, Prednisolon, Fluorocortison, Dexamethason, Betamethason, Paramethason, Flumethason, Fluocinolon, Fluprednyliden, Clobetasol, Beclomethason, Aldosteron, Desoxycorticosteron, Alfaxolon, Alfadolon und Bolasteron. Als Veresterungskomponenten für die Ester der vorliegenden Erfindung sind die folgenden Verbindungen nützlich: Genine (Aglycone) der kardioaktiven Glucoside wie Digitoxigenin, Gitoxigenin, Digoxigenin, Strophanthidin oder Tigogenin sowie Saponine.

[0032] Andere Alkohole zur Verwendung gemäß der Erfindung sind die Vitamine wie Axerophthol, Vitamin D_2 und D_3, Aneurin, Lactoflavin, Ascorbinsäure, Riboflavin, Thiamin und Pantothensäure.

[0033] Von den heterocyclischen Säuren können die folgenden als Derivate der vorstehend erwähnten cycloaliphatischen oder aliphatisch-cycloaliphatischen Alkohole angesehen werden, wenn deren lineare oder cyclische Ketten durch ein oder mehrere, zum Beispiel ein bis drei, Heteroatome, beispielsweise gewählt aus der Gruppe bestehend aus -O-, -S-, -N und -NH-, unterbrochen sind, wobei eine oder mehrere ungesättigte Bindungen, zum Beispiel Doppelbindungen, insbesondere eine bis drei, vorhanden sein können, wodurch auch heterocyclische Verbindungen mit aromatischen Strukturen eingeschlossen sind. Zum Beispiel sollten die folgenden Verbindungen erwähnt werden: Furfurylalkohol; Alkaloide und Derivate davon wie Atropin, Scopolamin, Cinchonin, 1α-Cinchonidin, Chinin, Morphin, Codein, Nalorphin, N-Butylscopolammoniumbromid und Ajmalin; Phenylethylamine wie Ephedrin, Isoproterenol und Epinephrin; Phenothiazin-Arzneistoffe wie Perphenazin, Pipothiazin, Carphenazin, Homofenazin, Acetophenazin, Fluophenazin und N-Hydroxyethylpromethazinchlorid; Thioxanthen-Arzneistoffe wie Flupenthixol und Clopenthixol; Krampflösemittel wie Meprophendiol; Antipsychotika wie Opipramol; Antiemetika wie Oxypendyl; Schmerzmittel wie Carbetidin, Phenoperidin und Methadol; Schlafmittel wie Etodroxizin; Appetitzügler wie Benzidrol und Diphemethoxidin; leichtere Tranquilizer wie Hydroxyzin; Muskelrelaxantien wie Cinnamedrin, Diphyllin, Mephenesin, Methocarbamol, Chlorphenesin, 2,2-Diethyl-1,3-propandiol, Guaifenesin und Hydrocilamid; Koronardilatatoren wie Dipyridamol und Oxyfedrin; Adrenorezeptor-Blocker wie Propanolol, Timolol, Pindolol, Bupranolol, Atenolol, Metroprolol und Practolol; Antineoplastika wie 6-Azauridin, Cytarabin und Floxuridin; Antibiotika wie Chloramphenicol, Thiamphenicol, Erythromycin, Oleandomycin und Lincomycin; antivirale Substanzen wie Idoxuridin; periphere Vasodilatatoren wie Isonicotinylalkohol; Carboanhydrase-Inhibitoren wie Sulocarbilat; Antiasthmatika und entzündungshemmende Substanzen wie Tiaramid; und Sulfamide wie 2-p-Sulfanilonoethanol.

[0034] In einigen Fällen können Hyaluronsäureester, worin die Estergruppen von zwei oder mehreren therapeutisch aktiven, hydroxylischen Stoffe abgeleitet sind, von Interesse sein, und natürlich können alle möglichen Varianten davon erhalten werden. Besonders interessant sind die Stoffe, in denen zwei Typen von unterschiedlichen Estergruppen, welche von Arzneistoffen mit einem hydroxylischen Charakter abgeleitet sind, vorhanden sind und in denen die restlichen Carboxylgruppen frei sind oder mit Metallen oder mit einer Base ein Salz bilden, wobei auch die Basen selbst therapeutisch aktiv ist und zum Beispiel die gleiche oder eine ähnliche Aktivität wie die Veresterungskomponente aufweisen. Insbesondere ist es möglich, Hyaluronsäureester zu erhalten, die einerseits von einem entzündungshemmenden Steroid, wie einem der bereits erwähnten, und andererseits von einem Vitamin, einem Alkaloid oder einem Antibiotikum, wie einem der angeführten, abgeleitet sind.

Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen HY-Estern

Verfahren A:

[0035] Die Ester der Hyaluronsäure können durch per se bekannte Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren hergestellt werden, wie zum Beispiel durch die Behandlung der freien Hyaluronsäure mit den gewünschten Alkoholen in Gegenwart von Katalysatoren wie starken anorganischen Säuren oder Ionenaustauschern vom Säuretyp oder mit einem Veretherungsmittel, welches fähig ist, den gewünschten Alkoholrest in

Gegenwart von anorganischen oder organischen Basen einzuführen. Als Veresterungsmittel können solche verwendet werden, welche in der Literatur bekannt sind, wie insbesondere die Ester von verschiedenen anorganischen Säuren oder von organischen Sulfonsäuren wie Wasserstoffsäuren, d.h. Kohlenwasserstoffhalogenide wie Methyl- oder Ethyliodid, oder neutrale Sulfate oder Kohlenwasserstoffsäuren, Alfite, Carbonate, Silicate, Phosphite oder Kohlenwasserstoffsulfonate wie Methylbenzol- oder p-Toluolsulfonat oder Methyl- oder Ethylchlorsulfonat. Die Umsetzung kann in einem geeigneten Lösungsmittel, zum Beispiel einem Alkohol, vorzugsweise demjenigen, welcher dem in die Carboxylgruppe einzuführenden Alkylrest entspricht, durchgeführt werden. Die Umsetzung kann aber auch in unpolaren Lösungsmitteln wie Ketonen oder Ethern wie Dioxan oder aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid durchgeführt werden. Als Base kann zum Beispiel ein Hydrat eines Alkali- oder Erdalkalimetalles oder Magnesium- oder Silberoxid oder ein basisches Salz eines dieser Metalle, wie ein Carbonat, und eine der organischen Basen oder eine tertiäre stickstoffhaltige Base wie Pyridin oder Collidin verwendet werden. Es ist auch möglich, anstelle der Base einen Ionenaustauscher vom basischen Typ zu verwenden.

[0036] Ein anderes Veresterungsverfahren verwendet ein Metallsalz oder ein Salz einer organischen stickstoffhaltigen Base, wie zum Beispiel ein Ammonium- oder Ammonium-Ersatz-Salz. Vorzugsweise werden die Salze der Alkali- oder Erdalkalimetalle verwendet, aber es kann auch irgendein anderes Metallsalz verwendet werden. In diesem Fall können die vorstehend erwähnten Veresterungsmittel verwendet werden, was auch für die Lösungsmittel zutrifft. Die Verwendung von aprotischen Lösungsmitteln, zum Beispiel Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid, wird bevorzugt.

[0037] In den Estern, welche gemäß diesem Verfahren oder gemäß dem anderen nachstehend beschriebenen Verfahren erhalten werden, können freie Carboxylgruppen der partiellen Ester gegebenenfalls in einer per se bekannten Weise in ein Salz überführt werden.

Verfahren B:

[0038] Die Hyaluronsäureester können auch durch ein Verfahren hergestellt werden, welches die Behandlung eines quaternären Ammoniumsalzes der Hyaluronsäure mit einem Veretherungsmittel, vorzugsweise in einem aprotischen organischen Lösungsmittel, beinhaltet.

[0039] Als organische Lösungsmittel werden vorzugsweise aprotische Lösungsmittel verwendet wie Dialkylsulfoxide oder Dialkylcarboxamide, wie insbesondere Dialkylsulfoxide mit einem niederen Alkylrest, besonders Dimethylsulfoxid, und Dialkylamide mit einem niederen Alkylrest von niederen aliphatischen Säuren, wie Dimethyl- oder Diethylformamid oder Dimethyl- oder Diethylacetamid.

[0040] Jedoch können auch andere Lösungsmittel verwendet werden, welche nicht immer aprotisch sind, wie Alkohole, Ether, Ketone und Ester, insbesondere aliphatische oder heterocyclische Alkohole und Ketone mit einem niedrigen Siedepunkt, wie Hexafluorisopropanol, Trifluorethanol und N-Methylpyrrolidon.

[0041] Die Umsetzung wird vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von etwa 0°C bis 100°C, insbesondere von etwa 25°C bis 75°C, zum Beispiel bei etwa 30°C, durchgeführt.

[0042] Die Veresterung wird vorzugsweise durch allmähliches Zugeben des Veresterungsmittels zu dem vorstehend erwähnten Ammoniumsalz in einem der vorstehend erwähnten Lösungsmittel, zum Beispiel in Dimethylsulfoxid, durchgeführt.

[0043] Als Alkylierungsmittel können die vorstehend erwähnten, insbesondere die Halogenkohlenwasserstoffe, zum Beispiel Alkylhalogenverbindungen, verwendet werden. Als Ausgangsverbindung wird vorzugsweise ein quaternäres Ammoniumsalz in Form eines niederen Ammoniumtetraalkylats, worin der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 6 Kohlenstoffatome aufweist, verwendet. Am meisten bevorzugt wird ein Hyaluronat von Tetrabutylammonium verwendet. Diese quaternären Ammoniumsalze können durch Umsetzen eines Metallsalzes von Hyaluronsäure, vorzugsweise eines der vorstehend erwähnten, insbesondere eines Natrium- oder Kaliumsalzes, in einer wäßrigen Lösung zusammen mit einem Sulfonsäureharz in der Salzform mit einer quaternären Ammoniumbase hergestellt werden.

[0044] Eine Veränderung des vorhergehend beschriebenen Verfahrens beinhaltet die Umsetzung eines Kalium- oder Natriumsalzes von Hyaluronsäure, das in einem geeigneten Lösungsmittel, zum Beispiel Dimethylsulfoxid, suspendiert ist, mit einem geeigneten Alkylierungsmittel in Gegenwart von katalytischen Mengen eines quaternären Ammoniumsalzes wie Tetrabutylammoniumiodid.

[0045] Für die Herstellung der Hyaluronsäureester ist es möglich, Hyaluronsäuren aus beliebigen Quellen zu verwenden, wie zum Beispiel die Säuren, welche aus den vorstehend erwähnten natürlichen Ausgangsmaterialien, zum Beispiel aus Hahnenkämmen, extrahiert werden. Die Herstellung solcher Säuren ist in der Literatur beschrieben. Vorzugsweise werden gereinigte Hyaluronsäuren verwendet. Insbesondere werden Hyaluronsäuren verwendet, welche Molekülfraktionen der gesamten Säuren umfassen, die direkt durch Extraktion der organischen Materialien erhalten werden, wobei das Molekulargewicht innerhalb eines großen Bereichs variiert, zum Beispiel von etwa 90%–80% (MW = 11,7 bis 10,4 Millionen) bis 0,2% (MW = 30.000) des Molekulargewichts der gesamten Säure mit einem Molekulargewicht von 13 Millionen, vorzugsweise von 5% bis 0,2%. Solche Fraktionen können durch verschiedene Verfahren, die in der Literatur beschrieben sind, wie durch Hydrolysierungs-, Oxidierungs-, enzymatische oder physikalische Verfahren wie mechanische oder Bestrahlungsverfahren, erhalten werden. Durch die bereits veröffentlichten Verfahren werden daher häufig Rohextrakte erhalten (vgl. zum Beispiel den vorstehend erwähnten Artikel von Balazs et al. in "Cosmetics & Toiletries"). Die Auftrennung und Reinigung der erhaltenen Molekülfraktionen werden durch bekannte Techniken, zum Beispiel durch Molekularfiltration, bewirkt.

[0046] Weiterhin nützlich sind gereinigte Fraktionen, welche aus Hyaluronsäure erhältlich sind, wie zum Beispiel diejenige, welche in der Europäischen Patentveröffentlichung Nr. 0138572 beschrieben sind.

[0047] Die Salzbildung von HY mit den vorstehenden Metallen zur Herstellung der Ausgangssalze für das spezielle Veresterungsverfahren, welches vorstehend beschrieben wurde, wird in einer per se bekannten Weise durchgeführt, wie zum Beispiel durch die Umsetzung von HY mit der berechneten Basenmenge, zum Beispiel mit Alkalihydraten oder mit basischen Salzen solcher Metalle wie Carbonaten oder Bicarbonaten.

[0048] Es ist möglich, in den partiellen Estern sämtliche der verbleibenden Carboxylgruppen oder nur einen Teil davon durch Dosierung der Basenmengen in ein Salz zu überführen, um den gewünschten stöchiometrischen Grad der Salzbildung zu erhalten. Mit dem geeigneten Grad der Salzbildung ist es möglich, Ester mit einem großen Bereich von unterschiedlichen Dissoziationskonstanten zu erhalten, welche auf diese Weise den gewünschten pH-Wert in Lösung oder "in situ" zum Zeitpunkt der therapeutischen Anwendung ergeben.

Herstellungsbeispiele:

[0049] Das Folgende veranschaulicht die Herstellung von Hyaluronsäureestern, welche in den zusammengesetzten Membranen der vorliegenden Erfindung nützlich sind.

Beispiel 1: Herstellung des (partiellen) Propylesters von Hyaluronsäure (HY),

worin
– 50% der Carboxylgruppen verestert sind, und
– 50% der Carboxylgruppen in Form eines Salzes (Na) vorliegen.

[0050] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 1,8 g (10,6 Moläquivalente) Propyliodid werden zugegeben, und die erhaltene Lösung wird während 12 Stunden bei einer Temperatur von 30°C gehalten.

[0051] Eine Lösung, enthaltend 62 ml Wasser und 9 g Natriumchlorid, wird zugegeben, und das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und dreimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 8 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0052] Das Produkt wird dann in 550 ml Wasser, enthaltend 1% Natriumchlorid, gelöst, und die Lösung wird unter ständigem Rühren langsam in 3.000 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und zweimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit 500 ml Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 7,9 g der partiellen Propylester-Titelverbindung erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 2: Herstellung des (partiellen) Isopropylesters von Hyaluronsäure (HY),

worin

– 50% der Carboxylgruppen verestert sind, und
– 50% der Carboxylgruppen in Form eines Salzes (Na) vorliegen.

[0053] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 160.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 1,8 g (10,6 Moläquivalente) Isopropyliodid werden zugegeben, und die erhaltene Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0054] Eine Lösung, enthaltend 62 ml Wasser und 9 g Natriumchlorid, wird zugegeben, und das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und dreimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 8 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0055] Das Produkt wird dann in 550 ml Wasser, enthaltend 1% Natriumchlorid, gelöst, und die Lösung wird unter ständigem Rühren langsam in 3.000 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und zweimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit 500 ml Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 7,8 g der partiellen Isopropylester-Titelverbindung erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 3: Herstellung des (partiellen) Ethylesters von Hyaluronsäure (HY),

worin
– 75% der Carboxylgruppen verestert sind, und
– 25% der Carboxylgruppen in Form eines Salzes (Na) vorliegen.

[0056] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 250.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 2,5 g (15,9 Moläquivalente) Ethyliodid werden zugegeben, und die erhaltene Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0057] Eine Lösung, enthaltend 62 ml Wasser und 9 g Natriumchlorid, wird zugegeben, und das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und dreimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 8 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0058] Das Produkt wird dann in 550 ml Wasser, enthaltend 1% Natriumchlorid, gelöst, und die Lösung wird unter ständigem Rühren langsam in 3.000 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und zweimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit 500 ml Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 7,9 g der partiellen Ethylester-Titelverbindung erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 4: Herstellung des (partiellen) Methylesters von Hyaluronsäure (HY),

worin
– 75% der Carboxylgruppen verestert sind, und
– 25% der Carboxylgruppen in Form eines Salzes (Na) vorliegen.

[0059] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 80.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 2,26 g (15,9 Moläquivalente) Methyliodid werden zugegeben, und die erhaltene Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0060] Eine Lösung, enthaltend 62 ml Wasser und 9 g Natriumchlorid, wird zugegeben, und das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und dreimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 8 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0061] Das Produkt wird dann in 550 ml Wasser, enthaltend 1% Natriumchlorid, gelöst, und die Lösung wird

unter ständigem Rühren langsam in 3.000 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und zweimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit 500 ml Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 7,8 g der partiellen Methylester-Titelverbindung erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 5 – Herstellung des Methylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0062] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 120.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 3 g (21,2 Moläquivalente) Methyliodid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0063] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0064] Es werden 8 g des Methylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 6 – Herstellung des Ethylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0065] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 85.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 3,3 g (21,2 Moläquivalente) Ethyliodid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0066] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0067] Es werden 8 g des Ethylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 7 – Herstellung des Propylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0068] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 3,6 g (21,2 Moläquivalente) Propyliodid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0069] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0070] Es werden 8,3 g des Propylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 8: Herstellung des (partiellen) Butylesters von Hyaluronsäure (HY).

worin
– 50% der Carboxylgruppen verestert sind, und
– 50% der Carboxylgruppen in Form eines Salzes (Na) vorliegen.

[0071] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 620.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 1,95 g (10,6 Moläquivalente) n-Butyliodid werden zugegeben, und die erhaltene Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0072] Eine Lösung, enthaltend 62 ml Wasser und 9 g Natriumchlorid, wird zugegeben, und das erhaltene

Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und dreimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 8 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0073] Das Produkt wird dann in 550 ml Wasser, enthaltend 1% Natriumchlorid, gelöst, und die Lösung wird unter ständigem Rühren langsam in 3.000 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und zweimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit 500 ml Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 8 g der partiellen Butylester-Titelverbindung erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 9: Herstellung des (partiellen) Ethoxycarbonylmethylesters von Hyaluronsäure (HY),

worin
– 75% der Carboxylgruppen verestert sind, und
– 25% der Carboxylgruppen in Form eines Salzes (Na) vorliegen.

[0074] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 180.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 2 g Tetrabutylammoniumiodid und 1,84 g (15 Moläquivalente) Ethylchloracetat werden zugegeben, und die erhaltene Lösung wird während 24 Stunden bei 30°C gehalten.

[0075] Eine Lösung, enthaltend 62 ml Wasser und 9 g Natriumchlorid, wird zugegeben, und das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und dreimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 8 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0076] Das Produkt wird dann in 550 ml Wasser, enthaltend 1% Natriumchlorid, gelöst, und die Lösung wird unter ständigem Rühren langsam in 3.000 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und zweimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit 500 ml Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 10 g der partiellen Ethoxycarbonylmethylester-Titelverbindung erhalten.

[0077] Die quantitative Bestimmung der Ethoxyestergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 10 – Herstellung des n-Pentylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0078] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 620.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 3,8 g (25 Moläquivalente) n-Pentylbromid und 0,2 g Tetrabutylammoniumiodid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0079] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0080] Es werden 8,7 g des n-Pentylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den ' Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 11 – Herstellung des Isopentylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0081] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 3,8 g (25 Moläquivalente) Isopentylbromid und 0,2 g Tetrabutylammoniumiodid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0082] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter

vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0083] Es werden 8,6 g des Isopentylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 12 – Herstellung des Benzylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0084] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,5 g (25 Moläquivalente) Benzylbromid und 0,2 g Tetrabutylammoniumiodid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0085] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0086] Es werden 9 g des Benzylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 13 – Herstellung des β-Phenylethylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0087] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 125.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,6 g (25 Moläquivalente) 2-Bromethylbenzol und 185 mg Tetrabutylammoniumiodid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0088] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Auf diese Weise bildet sich ein Niederschlag, der anschließend abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0089] Es werden 9,1 g des β-Phenylethylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 168–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 14 – Herstellung des Benzylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0090] 3 g Kaliumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 162.000 werden in 200 ml Dimethylsulfoxid suspendiert, und 120 mg Tetrabutylammoniumiodid und 2,4 g Benzylbromid werden zugegeben.

[0091] Die Suspension wird während 48 Stunden bei 30°C gerührt. Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 1.000 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 150 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0092] Es werden 3,1 g des Benzylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 15: Herstellung des (partiellen) Propylesters von Hyaluronsäure (HY),

worin
– 85% der Carboxylgruppen verestert sind, und
– 15% der Carboxylgruppen in Form eines Salzes (Na) vorliegen.

[0093] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 165.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 2,9 g (17 Moläquivalente) Propyliodid werden zugegeben, und die erhaltene Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0094] Anschließend wird eine Lösung, enthaltend 62 ml Wasser und 9 g Natriumchlorid, zugegeben, und das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und dreimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 8 Stunden bei 30°C getrocknet wird.

[0095] Das Produkt wird dann in 550 ml Wasser, enthaltend 1% Natriumchlorid, gelöst, und die Lösung wird unter ständigem Rühren langsam in 3.000 ml Aceton gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und zweimal mit 500 ml Aceton/Wasser (5:1) sowie dreimal mit 500 ml Aceton gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 8 g der partiellen Propylester-Titelverbindung erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 16 – Herstellung des n-Octylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0096] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,1 g (21,2 Moläquivalente) 1-Bromoctan werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0097] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 9,3 g des Octylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 17 – Herstellung des Isopropylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0098] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 2,6 g (21,2 Moläquivalente) Isopropylbromid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0099] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 8,3 g des Isopropylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird unter Anwendung des Verfahrens von Cundiff R. H. und Markunas P. C. [Anal. Chem. 33 (1961), 1028–1030] durchgeführt.

Beispiel 18 – Herstellung des 2,6-Dichlorbenzylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0100] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 5,08 g (21,2 Moläquivalente) 2,6-Dichlorbenzylbromid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0101] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 9,7 g des 2,6-Dichlorbenzylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 19 – Herstellung des 4-tert-Butylbenzylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0102] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,81 g (21,2 Moläquivalente) 4-tert-Butylbenzylbromid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0103] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 9,8 g des 4-tert-Butylbenzylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 20 – Herstellung des Heptadecylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0104] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 6,8 g (21,2 Moläquivalente) Heptadecylbromid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0105] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 11 g des Heptadecylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 21 – Herstellung des Octadecylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0106] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 7,1 g (21,2 Moläquivalente) Octadecylbromid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0107] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 11 g des Octadecylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 22 – Herstellung des 3-Phenylpropylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0108] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,22 g (21,2 Moläquivalente) 3-Phenylpropylbromid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0109] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 9 g des 3-Phenylpropylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 23 – Herstellung des 3,4,5-Trimethoxybenzylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0110] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,6 g (21,2 Moläquivalente) 3,4,5-Trimethoxybenzylchlorid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0111] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 10 g des 3,4,5-Trimethoxybenzylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren

ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 24 – Herstellung des Cinnamylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0112] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,2 g (21,2 Moläquivalente) Cinnamylbromid werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0113] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 9,3 g des Cinnamylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Beispiel 25 – Herstellung des Decylesters von Hyaluronsäure (HY)

[0114] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,7 g (21,2 Moläquivalente) 1-Bromdecan werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

[0115] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 9,5 g des Decylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

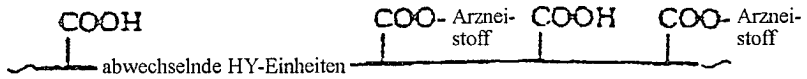
Beispiel 26 – Herstellung des Nonylesters von Hyaluronsäure (HY)

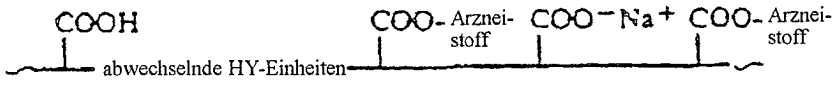
[0116] 12,4 g Tetrabutylammoniumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000, entsprechend 20 Moläquivalenten einer monomeren Einheit, werden in 620 ml Dimethylsulfoxid bei 25°C solubilisiert. 4,4 g (21,2 Moläquivalente) 1-Bromnonan werden zugegeben, und die Lösung wird während 12 Stunden bei 30°C gehalten.

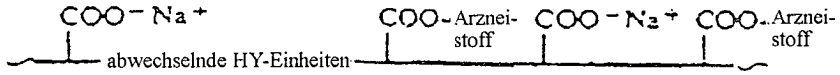
[0117] Das erhaltene Gemisch wird unter ständigem Rühren langsam in 3.500 ml Ethylacetat gegossen. Es bildet sich ein Niederschlag, der abfiltriert und viermal mit 500 ml Ethylacetat gewaschen und schließlich unter vermindertem Druck während 24 Stunden bei 30°C getrocknet wird. Es werden 9 g des Nonylester-Titelprodukts erhalten. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verfahren ausgeführt, das auf den Seiten 169–172 von Siggia S. und Hanna J. G., "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Auflage, John Wiley and Sons, beschrieben ist.

Komplexe von Hyaluronsäure und antibiotischen Arzneistoffen –

unter Verwendung von partiellen Salzen von Hyaluronsäure zusammen mit einer basischen, aktiven Arzneistoffkomponente, wobei die verbleibenden Säuregruppen der Hyaluronsäure frei bleiben oder mit Metallen oder Basen neutralisiert werden. Diese Komplexe können wiedergegeben werden durch:

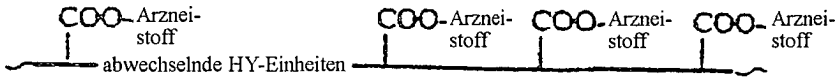
(a) 

(b) 

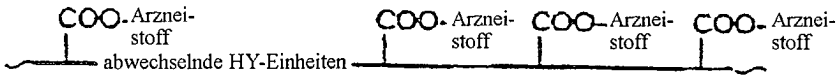
(c) 

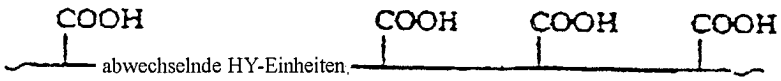
Komplexe von Hyaluronsäure und antibiotischen Arzneistoffen –

unter Verwendung von stöchiometrisch neutralen Salzen von HY zusammen mit einer basischen Arzneistoffkomponente, wobei weitere Mengen der Arzneistoffkomponente hinzugefügt werden. Diese Komplexe können wiedergegeben werden durch:

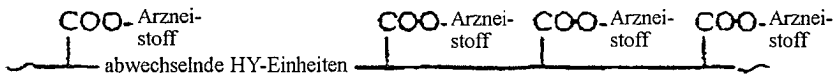
(a) 

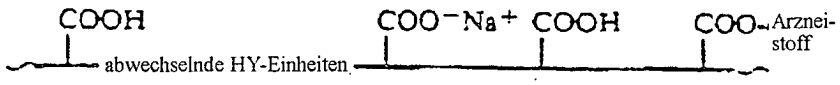
(b) Gemisch von:



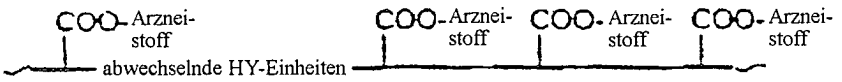


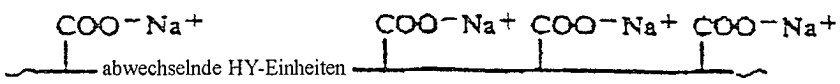
(c) Gemisch von:





(d) Gemisch von:



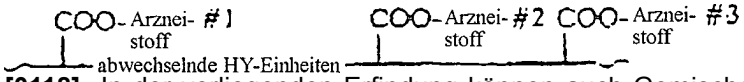


Komplexe von Hyaluronsäure und antibiotischen Arzneistoffen –

unter Verwendung von stöchiometrisch neutralen Salzen von HY zusammen mit einer basischen Arzneistoffkomponente, wobei weitere Mengen der Arzneistoffkomponente hinzugefügt werden.

Komplexe von Hyaluronsäure und antibiotischen Arzneimitteln –

unter Verwendung von stöchiometrisch neutralen Salzen von HY zusammen mit beliebigen Gemischen aus verschiedenen Arzneistoffkomponenten. Diese Komplexe können wiedergegeben werden durch:



[0118] In der vorliegenden Erfindung können auch Gemische aus irgendwelchen der vorstehenden mögli-

chen Arzneimittel verwendet werden.

Beispiele für aktive Arzneistoffkomponenten

[0119] In der vorliegenden Erfindung verwendbare Arzneistoffkomponenten können verschiedener Art sein, sind jedoch basischer Natur und liegen als ein primäres, sekundäres, tertiäres oder quaternäres Amin vor, wobei der basische Aminanteil des Arzneistoffes einen Komplex mit dem Säureanteil des Hyaluronsäuremoleküls bildet.

[0120] Beispiele für pharmakologisch aktive Stoffe zur Verwendung in erfindungsgemäßen Arzneimitteln sind: basische und nichtbasische Antibiotika, zum Beispiel Aminoglucoside, Makrolide, Tetracyclin und Peptide wie zum Beispiel Gentamicin, Neomycin, Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Kanamycin, Amikacin, Tobramycin, Spectinomycin, Erythromycin, Oleandomycin, Carbomycin, Spiramycin, Oxytetracyclin, Rolitetracyclin, Bacitracin, Polymyxin B, Gramicidin, Colistin, Chloramphenicol, Lincomycin, Vancomycin, Novobiocin, Ristocetin, Clindamycin, Amphotericin B, Griseofulvin und Nystatin sowie möglicherweise deren Salze wie Sulfate oder Nitrate, oder Verbindungen miteinander oder mit anderen Wirkstoffbestandteilen, wie den nachstehend erwähnten.

[0121] Andere Arzneistoffe zur vorteilhaften Verwendung im Einklang mit der vorliegenden Erfindung sind: andere infektionshemmende Mittel wie Diethylcarbamazin, Mebendazol und die Sulfamide wie Sulfacetamid, Sulfadiazin und Sulfisoxazol; sowie Antivirus- und Antitumormittel wie Ioddesoxyuridin, Adeninarabinosid, Trifluorthymidin, Aciclovir, Ethyldesoxyuridin, Bromvinyldesoxyuridin und 5-Iodo-5'-amino-2',5'-didesoxyuridin.

[0122] Verbindungen oder Mischungen solcher Arzneistoffe miteinander und möglicherweise mit anderen Wirkstoffen können auch als antibiotische Arzneimittel im Einklang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Falls anstelle eines einzigen aktiven Stoffes eine Verbindung oder Mischungen von aktiven Stoffen, wie die vorstehend erwähnten, verwendet werden, können die Salze aus den basischen aktiven Stoffen und der Hyaluronsäure und deren Molekülfraktionen Mischsalze aus einem oder mehreren solcher basischen Stoffen oder möglicherweise Mischsalze dieses Typs, in denen eine bestimmte Anzahl der anderen Säuregruppen des Polysaccharids mit Metallen oder Basen ein Salz bilden, sein.

[0123] Von den Antibiotika sind die folgenden von besonderer Bedeutung: Erythromycin, Bacitracin, Gentamicin, Neomycin, Aureomycin und Gramicidin und Verbindungen davon; und von den antibakteriellen Mitteln und Desinfektionsmittel: Nitrofurazon, Mafenide, Chlorhexidin und Derivate von 8-Hydroxychinolin und möglicherweise deren Salze. Diese Aufstellung dient natürlich nur veranschaulichenden Zwecken, und irgendwelche anderen antibiotischen Mittel, welche bekannt oder in der Literatur beschrieben sind, können verwendet werden.

Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen antibiotischen Hyaluronsäuresalzen

[0124] Die Herstellung der erfindungsgemäßen antibiotischen Salze kann in einer per se bekannten Weise durchgeführt werden, d.h. durch Kombination von Lösungen oder Suspensionen (in Wasser oder in organischen Lösungsmitteln) der Komponenten in den berechneten Mengen und Isolierung der Salze in einer amorphen, wasserfreien Form gemäß per se bekannten Techniken. Es ist auch möglich, Basen oder basische Salze mit Alkali- oder Erdalkalimetallen oder Magnesium oder Aluminium oder Ammonium zu verwenden. Es ist zum Beispiel möglich, (a) zuerst wäßrige Lösungen der zwei Komponenten herzustellen, (b) solche Komponenten aus wäßrigen Lösungen ihrer Salze mit Säuren der jeweiligen Metallsalze (zum Beispiel Sulfate und Natriumsalze) für die Behandlung mit Ionenaustauschern einzufrieren, und (c) die zwei Lösungen bei niedriger Temperatur, zum Beispiel zwischen 0°C und 20°C, zu vereinigen. Wenn das auf diese Weise erhaltene Salz in Wasser leicht löslich ist, sollte es gefriergetrocknet werden, während Salze, die nicht ohne weiteres löslich sind, durch Zentrifugation, Filtration oder Dekantieren abgetrennt und möglicherweise dann getrocknet werden können.

Beispiel 27 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Streptomycin

[0125] 2,43 g Streptomycinsulfat (10 Moläquivalente) werden in 25 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml quaternäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH^--Form, bei 5°C eluiert. Das sulfatfreie Eluat wird in einem Thermogefäß bei 5°C gesammelt.

[0126] 4,0 g Natriumsalz einer Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von 255.000 (entsprechend 10

Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird gesammelt und unter Rühren zu der Lösung der Streptomycin-Base zugegeben. Die erhaltene Lösung wird eingefroren und sofort gefriergetrocknet. In dem auf diese Weise erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen der Hyaluronsäure ein Salz mit den Basenfunktionen von Streptomycin. Ausbeute: 5,5 g.

[0127] Die mikrobiologische Analyse für B. subtilis ATCC 6633 im Vergleich zu Standard-Streptomycin ergab einen Gehalt von 33,8 Gew.-% für die Streptomycin-Base, was dem theoretisch berechneten Gewicht entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 66,2% Gew.-% (theoretischer Prozentwert – 66,0%).

Beispiel 28 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Erythromycin

[0128] 4,0 g Natriumsalz einer Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von 77.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird bei einer Temperatur von 5°C gehalten.

[0129] 7,34 g Erythromycin-Base (10 Moläquivalente) werden zu der Lösung von HY unter Rühren bei 5°C zugegeben, bis eine vollständige Solubilisierung erreicht wird. Die erhaltene Lösung wird eingefroren und gefriergetrocknet. In dem auf diese Weise erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen der Hyaluronsäure ein Salz mit Erythromycin. Ausbeute: 10,8 g.

[0130] Die mikrobiologische Analyse für St. aureus ATCC 6538p im Vergleich zu Standard-Erythromycin ergibt einen Gehalt von 66,0 Gew.-% für die Erythromycin-Base, was dem theoretischen Wert entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 34,0%, was dem theoretisch berechneten Prozentwert entspricht.

Beispiel 29 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Kanamycin

[0131] 1,46 g Kanamycinsulfat (10 Moläquivalente) werden in 25 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml quaternäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH^--Form, bei 5°C eluiert. Das sulfatfreie Eluat wird in einem Thermogefäß bei 5°C gesammelt.

[0132] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 165.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird gesammelt und unter Rühren mit Hilfe eines Vortexgeräts zu der Lösung der Kanamycin-Base zugegeben. Die auf diese Weise erhaltene Lösung wird sofort eingefroren und gefriergetrocknet. Ausbeute: 4,8 g. In dem erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen von HY ein Salz mit Kanamycin.

[0133] Die mikrobiologische Analyse für B. subtilis ATCC 6633 im Vergleich zu Standard-Kanamycin ergibt einen Gehalt von 24,2 Gew.-% für die Kanamycin-Base, was dem theoretisch berechneten Prozentwert entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 75,8 Gew.-%, was ebenfalls dem theoretischen Gehalt entspricht.

Beispiel 30 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Neomycin

[0134] 1,52 g Neomycinsulfat (10 Moläquivalente) werden in 20 ml destilliertem H_2O solubilisiert und in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml quaternäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH^--Form, bei 5°C eluiert. Das sulfatfreie Eluat wird in einem Thermogefäß bei 5°C gesammelt.

[0135] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert und in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird gesammelt und unter Rühren zu der Lösung der Neomycin-Base zugegeben. Der sich bildende viskoelasti-

sche Niederschlag wird durch Dekantieren abgetrennt und gefriergetrocknet. Ausbeute: 4,76 g. In dem Salz bilden alle Säuregruppen von HY ein Salz mit Neomycin.

[0136] Eine quantitative mikrobiologische Analyse, welche für St. aureus ATCC 6538p im Vergleich zu Standard-Neomycin durchgeführt wurde, ergibt einen Gehalt von 21,2 Gew.-% für die Neomycin-Base, was dem theoretisch berechneten Wert entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 78,8 Gew.-%.

Beispiel 31 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Gentamicin

[0137] 1,45 g Gentamicinsulfat (10 Moläquivalente) werden in 25 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml quaternäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH^--Form, bei 5°C eluiert. Das sulfatfreie Eluat wird in einem Thermogefäß bei 5°C gesammelt.

[0138] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird gesammelt und unter Rühren mit Hilfe eines Vortexgeräts zu der Lösung der Gentamicin-Base zugegeben. Der sich bildende Niederschlag, welcher dick und sehr viskos ist, wird durch Dekantieren abgetrennt und gefriergetrocknet. Ausbeute: 4,65 g. In dem auf diese Weise erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen von HY ein Salz mit Gentamicin.

[0139] Die quantitative mikrobiologische Analyse, welche für S. epidermidus ATCC 12228 im Vergleich zu Standard-Gentamicin durchgeführt wurde, ergibt einen Gehalt von 20,0 Gew.-% für die Gentamicin-Base, was dem theoretischen Gehalt entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 80,0%.

Beispiel 32 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Amikacin

[0140] 1,47 g Amikacinsulfat (10 Moläquivalente) werden in 100 ml destilliertem H_2O bei 5°C solubilisiert.

[0141] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert.

[0142] Das natriumfreie Eluat wird gesammelt und unter Rühren mit Hilfe eines Vortexgeräts zu der Lösung der Amikacin-Base zugegeben. Der sich bildende Niederschlag, welcher dick und sehr viskos ist, wird durch Dekantieren abgetrennt und gefriergetrocknet. Ausbeute: 5,16 g.

[0143] In dem auf diese Weise erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen von HY ein Salz mit Amikacin.

[0144] Die quantitative mikrobiologische Analyse, welche für St. aureus ATCC 29737 im Vergleich zu Standard-Amikacin durchgeführt wurde, ergibt einen Gehalt von 27,7 Gew.-% für die Amikacin-Base, was dem theoretischen Gehalt entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 72,3 Gew.-%.

Beispiel 33 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Rolitetracyclin

[0145] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird bei einer Temperatur von 5°C gehalten.

[0146] 5,3 g Rolitetracyclin-Base (10 Moläquivalente) werden unter Rühren bei 5°C im Dunkeln zu der Lösung der HY-Säure zugegeben, bis eine vollständige Solubilisierung erreicht wird. Die auf diese Weise erhaltene Lösung wird sofort eingefroren und gefriergetrocknet. Ausbeute: 8,9 g. In dem auf diese Weise erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen von HY ein Salz mit Rolitetracyclin.

[0147] Die mikrobiologische Analyse für B. pumilus ATCC 14884 im Vergleich zu Standard-Rolitetracyclin ergibt einen Gehalt von 58,2 Gew.-% für die Rolitetracyclin-Base, was dem theoretischen Wert entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 41,8 Gew.-%.

Beispiel 34 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Polymyxin B

[0148] 2,4 g Polymyxin B-Base (10 Moläquivalente) werden in 100 ml destilliertem H_2O bei 5°C solubilisiert.

[0149] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird gesammelt und unter starkem Rühren bei 5°C zu der Suspension der Polymyxin-Base zugegeben. Nach einer ersten Phase, während der die Lösung klar wird, bildet sich zunehmend ein schwerlösliches Produkt, welches mit 5 Volumina von Aceton vollständig ausgefällt wird. Der Niederschlag wird filtriert, mit Aceton gewaschen und dann unter vermindertem Druck getrocknet. Ausbeute: 6,05 g. In dem auf diese Weise erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen von HY ein Salz mit Polymyxin B.

[0150] Die quantitative mikrobiologische Analyse, welche für B. bronchiseptica ATCC 4617 im Vergleich zu Standard-Polymyxin B durchgeführt wurde, ergibt einen Gehalt von 38,7% für die Polymyxin B-Base, was dem theoretischen Wert entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 61,3%.

Beispiel 35 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Gramicidin S

[0151] 6,7 g Gramicidin S-Hydrochlorid (10 Moläquivalente) werden in 200 ml Ethanol/H_2O (80:20, Vol./Vol.) suspendiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml quaternäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH^--Form, bei 5°C eluiert.

[0152] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 165.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Zu dem natriumfreien Eluat werden 200 ml DMSO zugegeben, und das Gemisch wird unter Rühren bei 5°C gehalten. Anschließend wird die Lösung der Gramicidin-Base langsam zugegeben. Die erhaltene Lösung wird mit 10 Volumina von Aceton gefällt. Der Niederschlag wird filtriert, mit Aceton gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Ausbeute: 9,55 g. In dem auf diese Weise erhaltenen Salz bilden alle Säuregruppen von HY ein Salz mit Gramicidin S.

[0153] Die quantitative mikrobiologische Analyse, welche für S. faecium ATCC 10541 im Vergleich zu Standard-Gramicidin S durchgeführt wurde, ergibt einen Gehalt von 60,0% für die Gramicidin S-Base, was dem theoretischen Wert entspricht. Die kolorimetrische Analyse für die Glucuronsäure in Kombination mit dem Polysaccharid nach der Methode von Bitter et al. (Anal. Biochem. 4 (1962), 330) ergibt für die HY-Säure einen Gehalt von 40,0%.

Beispiel 36 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Neomycin und mit Polymyxin

[0154] 4,0 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 170.000 (entsprechend 10 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 400 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird in einem Thermogefäß bei 5°C gesammelt. 0,150 g Polymyxin B-Base (0,63 Moläquivalente) werden unter starkem Rühren zugegeben. 1,425 g Neomycinsulfat (9,37 Moläquivalente) werden in 25 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird in einer thermostatischen Säule, enthaltend 15 ml quaternäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH^--Form, bei 5°C eluiert.

[0155] Das sulfatfreie Eluat wird gesammelt und unter starkem Rühren zu der Lösung von HY-Säure und Polymyxin B zugegeben. Der sich bildende Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt und unter vermindertem Druck getrocknet. Ausbeute: 4,85 g. 17,25 mg dieses Produkts enthalten:
Neomycin, entsprechend 5,0 mg Neomycinsulfat, und
Polymyxin B, entsprechend 0,63 mg (etwa 500 UI) Polymyxinsulfat.

[0156] Anmerkung: Die Bestimmungen wurden nach Trennung der zwei Wirkstoffe mittels HPLC durchgeführt.

Beispiel 37 – Herstellung des Salzes einer Hyaluronsäure (HY) mit Streptomycin und mit Natrium

[0157] 98,68 g Natriumsalz von HY mit einem Molekulargewicht von 255.000 (entsprechend 246 Moläquivalenten einer monomeren Einheit) werden in 8,5 l destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 300 ml Sulfonsäureharz (Dowex 50 × 8) in der H^+-Form, bei 5°C eluiert. Das natriumfreie Eluat wird in einem Thermogefäß bei 5°C gesammelt.

[0158] 1,88 g Streptomycinsulfat (7,74 Moläquivalente) werden in 20 ml destilliertem H_2O solubilisiert. Die Lösung wird dann in einer thermostatischen Säule, enthaltend 12 ml quaternäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH^--Form, bei 5°C eluiert. Das sulfatfreie Eluat wird gesammelt und unter Rühren zu der Lösung der HY-Säure zugegeben. 238,3 ml einer Lösung von 1 M NaOH werden unter Rühren langsam zugegeben, und die erhaltene Lösung wird sofort eingefroren und gefriergetrocknet. Ausbeute 99,8 g. 100 g des Produkts enthalten 1,5 g Streptomycin als eine Base.

Beispiel 38

[0159] Eine Paste, welche den 25%igen Benzylester von Hyaluronsäure, HYAFF 11 p25, mit einem Molekulargewicht zwischen 160.000 und 230.000 Dalton sowie Hydroxyapatit-Granula mit einem Nenndurchmesser von 420 bis 1000 µm umfaßt, wurde in folgender Weise erhalten.

[0160] 5 g HYAFF 11 p25, sterilisiert mittels Gammastrahlen mit einer Intensität von 1,25 mrad, wurden zu 50 g sterilisiertem Wasser zugegeben. Das System wurde in einem Doppel-Spiralmischer bei 40 UpM behandelt. Die Temperatur wurde bei 30°C ± 2°C gehalten, und die Solubilisierung wurde während 8 Stunden durchgeführt. Die Lösung wurde dann während 2 Stunden unter ein Hochvakuum bei 0,01 mbar gebracht, um die gelöste Luft zu entfernen. Die erhaltene Viskosität betrug 23 Pa·s.

[0161] Anschließend wurden 0,5 g eines im Handel erhältlichen Hydroxyapatits ("Interpore 200") zu 1 g dieser Lösung zugegeben, und das Gemisch wurde mit einem Spatel von Hand gerührt, bis eine homogene Paste erhalten wurde. Es wurde gezeigt, daß die Granula aneinanderhaften und ein Material bilden, welches ohne Schwierigkeiten in Hohlräume eingebracht werden kann, ohne daß das Risiko besteht, daß der granuläre Knochenersatz entweder während oder nach der Operation verschoben wird.

Beispiel 39

[0162] Eine Paste, welche den 50%igen Ethylester von Hyaluronsäure, HYAFF 7p50, mit einem Molekulargewicht zwischen 140.000 und 210.000 Dalton sowie Hydroxyapatit-Granula mit einem Nenndurchmesser von 420 bis 1000 µm umfaßt, wurde wie folgt erhalten.

[0163] 7 g HYAFF 7p50, sterilisiert mittels Gammastrahlen mit einer Intensität von 1,25 mrad, wurden zu 50 g sterilisiertem Wasser zugegeben. Das System wurde in einem Doppel-Spiralmischer bei einer Geschwindigkeit von 40 UpM behandelt. Die Temperatur wurde bei 40°C ± 2°C gehalten, und die Solubilisierung wurde während 8 Stunden durchgeführt. Nach der Solubilisierung wurde die Lösung während 2 Stunden einem Vakuum bei 0,01 mbar ausgesetzt, um jegliche gelöste Luft zu entfernen. Die erhaltene Viskosität betrug 25 Pa·s.

[0164] Anschließend wurden 0,4 g eines im Handel erhältlichen Hydroxyapatits ("Interpore 200") zu 1 g dieser Lösung zugegeben, und das Gemisch wurde mit einem Spatel von Hand gerührt, bis eine homogene Paste erhalten wurde. Es wurde gezeigt, daß die Granula aneinanderhaften und ein Material bilden, welches ohne Schwierigkeiten in Hohlräume eingebracht werden kann, ohne daß das Risiko besteht, daß der granuläre Knochenersatz entweder während oder nach der Operation verschoben wird.

Beispiel 40

[0165] Eine Paste, welche ein Gemisch aus 50%igen Benzylestern von Hyaluronsäure, HYAFF 11p50, mit einem Molekulargewicht zwischen 140.000 und 250.000 Dalton sowie Granula aus porösem Calciumcarbonat mit einer Porengröße von 630 bis 1000 µm umfaßt, wurde wie folgt erhalten.

[0166] 6 g HYAFF 11p50, sterilisiert mittels Gammastrahlen mit einer Intensität von 1,25 mrad, wurden zu 50

g sterilisiertem Wasser zugegeben. Das System wurde in einem Doppel-Spiralmischer bei einer Geschwindigkeit von 40 UpM behandelt. Die Temperatur wurde bei 40°C ± 2°C gehalten, und die Solubilisierung wurde während 6 Stunden durchgeführt. Nach der Solubilisierung wurde die Lösung während 2 Stunden einem Hochvakuum bei 0,01 mbar ausgesetzt, um jegliche Luft zu entfernen. Die erhaltene Viskosität betrug 21 Pa·s.

[0167] Anschließend wurden 0,6 g eines im Handel erhältlichen Calciumcarbonats ("Biocoral 1000") zu 1 g dieser Lösung zugegeben, und dieses Gemisch wurde mit einem Spatel von Hand gerührt, bis eine homogene Paste erhalten wurde. Es wurde gezeigt, daß die Granula aneinanderhaften und ein Material bilden, welches ohne Schwierigkeiten in Hohlräume eingebracht werden kann, ohne daß das Risiko besteht, daß der granuläre Knochenersatz entweder während oder nach der Operation verschoben wird.

Beispiel 41

[0168] Eine Paste, welche Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von 140.000 bis 180.000 Dalton und Hydroxyapatit-Granula mit einem Nenndurchmesser von 420 bis 1000 µm enthält, wurde in folgender Weise erhalten.

[0169] 7 g sterilfiltrierte Hyaluronsäure wurden zu 50 g sterilisiertem Wasser zugegeben. Das System wurde in einem Doppel-Spiralmischer bei 40 UpM behandelt. Die Temperatur wurde bei 25°C gehalten, und die Solubilisierung wurde während 16 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung während 2 Stunden einem Hochvakuum ausgesetzt, um die gelöste Luft zu entfernen. Die erhaltene Viskosität betrug 24,7 Pa·s.

[0170] Anschließend wurden 0,4 g eines im Handel erhältlichen Hydroxyapatits ("Interpore 200") zu 1 g dieser Lösung zugegeben, und das Gemisch wurde mit einem Spatel von Hand gerührt, bis eine homogene Paste erhalten wurde. Es wurde gezeigt, daß die Granula aneinanderhaften und ein Material bilden, welches ohne Schwierigkeiten in Hohlräume eingebracht werden kann, ohne daß das Risiko besteht, daß der granuläre Knochenersatz entweder während oder nach der Operation verschoben wird.

Tiermodell und Behandlung

[0171] Um die Verweildauer von Hydroxyapatitteilchen zu erhöhen und um die Einfachheit der Handhabung zu verbessern, wurde die vorstehend erwähnte Zubereitung dazu verwendet, frische Zahnextraktionsstellen bei Hunden zu füllen. Als Tiermodell wurden Beagle-Hunde verwendet. Die maxillaren und mandibularen Schneidezähne und Backenzähne wurden entfernt, so daß jedem Tier 12 Defekte, sechs im Oberkiefer und sechs im Unterkiefer, zugefügt wurden. Anschließend wurde das interradikuläre Septum entfernt, um das Volumen des Defektes zu vergrößern. Die Extraktionsstellen wurde mit der vorstehend erwähnten Zubereitung als Implantat gefüllt oder blieben leer oder wurden mit Hydroxyapatit-Granula als Kontrollen gefüllt. Eine einfache Naht wurde dazu verwendet, die Zahnfleischlappen miteinander zu verbinden. Die Tiere wurden 1, 2 und 3 Monate nach der Operation getötet. Zum Zeitpunkt der Tötung wurde eine Gewebefixierung mittels der Perfusionstechnik durch Einführen einer Kanüle in die Maxillararterie und die Injektion von Karnowsky-Fixativ durchgeführt.

[0172] Diese Studie zeigte die Einfachheit der Verwendung von Hyaluronsäure-Hydroxyapatit-Zusammensetzungen beim Füllen von frischen Zahnextraktionsstellen. Das Gemisch kann manuell eingebracht werden oder unter Druck in einen Knochendefekt in situ injiziert werden. Es wurde ein Verbleiben der Teilchen erreicht, wobei die Bindelösung mit der Zeit resorbiert wurde und der Knocheneinwuchs fortschritt.

Patentansprüche

1. Paste für granulären Knochenersatz, umfassend eine Bindelösung, die Hyaluronsäure in Verbindung mit einem Wirkstoff oder ein Hyaluronsäurederivat in Verbindung mit einem Wirkstoff umfasst und natürliche oder künstliche Knochengranula, wobei die Hyaluronsäure oder das Hyaluronsäurederivat ein Molekulargewicht von 77.000 Dalton bis 255.000 Dalton aufweist und wobei der Wirkstoff kein Antibiotikum ist.

2. Paste nach Anspruch 1, wobei die Verbindung zwischen der Hyaluronsäure oder dem Hyaluronsäurederivat und dem Wirkstoff eine physikalische Verbindung, eine kovalente Verbindung oder eine ionische Verbindung ist.

3. Paste nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Hyaluronsäurederivat ein vollständiger oder ein partieller Ester der Hyaluronsäure ist oder ein vollständiges oder ein partielles Salz der Hyaluronsäure ist.

4. Paste nach Anspruch 3, wobei der Alkoholbestandteil des Esters der Hyaluronsäure, der der Wirkstoff ist, ein pharmakologisch aktiver Alkohol ist.

5. Paste nach Anspruch 4, wobei zwei oder mehr pharmakologisch aktive Alkohole vorhanden sind.

6. Paste nach Anspruch 4 oder 5, wobei in dem partiellen Ester der Hyaluronsäure die übrigen Gruppen frei sind, mit Metallen in ein Salz überführt wurden und/oder mit weiteren Wirkstoffen, die therapeutisch aktive Basen sind, in ein Salz überführt wurden.

7. Paste nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei die pharmakologisch aktiven Alkohole ausgewählt sind aus Steroidverbindungen, Vitaminen, Furfurylalkoholen, Alkaloiden und Derivaten davon, Phenylethylaminen, Phenothiazinarzneistoffen, Thioxanthenarzneistoffen, Krampflösemitteln, Antipsychotika, Antiemetika, Schmerzmitteln, Schlafmitteln, Appetitzüglern, leichteren Tranquilizern, Muskelrelaxantien, Koronardilatatoren, Adrenorezeptorenblockern, Antineoplastika, Antibiotika, antiviralen Substanzen, peripheren Vasodilatatoren, Carboanhydraseinhibitoren, Antasthmatika, Entzündungshemmern und Sulfamiden.

8. Paste nach einem der Ansprüche 3, 6 oder 7, wobei der Wirkstoff in Verbindung mit dem Salz der Hyaluronsäure oder der weitere Wirkstoff ausgewählt ist aus einem oder mehreren Arzneistoffen, die keine Antibiotika sind, und einem Gemisch aus einem oder mehreren Antibiotika oder einem oder mehreren Arzneistoffen, die keine Antibiotika sind.

9. Paste nach Anspruch 8, wobei der Arzneistoff, der kein Antibiotikum ist, ausgewählt ist aus antiinfektiösen Mitteln, antiviralen Mitteln, Antitumor-Mitteln und Desinfektionsmitteln.

10. Verwendung von Hyaluronsäure in Verbindung mit einem Wirkstoff oder einem Hyaluronsäurederivat in Verbindung mit einem Wirkstoff wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 definiert und von natürlichen oder künstlichen Knochengranula für die Herstellung eines Arzneimittels zur Verwendung als Bindelösung für granulären Knochenersatz.

11. Verwendung der Paste nach einem der Ansprüche 1 bis 9 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Förderung des Wachstums oder der Instandsetzung von beschädigten oder schadhaften Knochen in der menschlichen oder veterinären Zahnheilkunde oder Chirurgie.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen