

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6110037号
(P6110037)

(45) 発行日 平成29年4月5日(2017.4.5)

(24) 登録日 平成29年3月17日(2017.3.17)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 31/737	(2006.01)	A 6 1 K	31/737
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P 27/04	(2006.01)	A 6 1 P	27/04

請求項の数 8 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2016-533212 (P2016-533212)	(73) 特許権者	000195524 生化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
(86) (22) 出願日	平成28年1月15日 (2016.1.15)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/051176	(72) 発明者	船山 奨 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 生 化学工業株式会社内
(87) 国際公開番号	W02016/114397	(72) 発明者	野寺 梨紗 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 生 化学工業株式会社内
(87) 国際公開日	平成28年7月21日 (2016.7.21)	(72) 発明者	島中 貴弘 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 生 化学工業株式会社内
審査請求日	平成28年5月20日 (2016.5.20)		
(31) 優先権主張番号	特願2015-7072 (P2015-7072)		
(32) 優先日	平成27年1月16日 (2015.1.16)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2015-150976 (P2015-150976)		
(32) 優先日	平成27年7月30日 (2015.7.30)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
早期審査対象出願			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】コンドロイチン硫酸架橋体、並びにこれ含有する組成物、及び眼疾患処置剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

架橋基を介した架橋構造をコンドロイチン硫酸の構成二糖単位間に有するコンドロイチン硫酸誘導体を有効成分として含有する、ドライアイ又は角膜上皮障害の処置用の、眼疾患処置剤。

【請求項 2】

前記架橋基が、多価アミン、多価エポキシ化合物、多価ビニル化合物、及びエピハロヒドリンからなる群より選択される少なくとも1種に由来する基である、請求項1に記載の眼疾患処置剤。

【請求項 3】

前記架橋基が、多価アミンに由来する基である、請求項1に記載の眼疾患処置剤。

【請求項 4】

前記多価アミンが、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、主鎖の原子数が1～20の、置換又は無置換の多価アミンである、請求項3に記載の眼疾患処置剤。

【請求項 5】

前記多価アミンが、エタン-1,2-ジアミン、1,3-ジアミノプロパン、1,4-ジアミノブタン、1,5-ジアミノペンタン、1,6-ジアミノヘキサン、1,8-ジアミノオクタン、1,12-ジアミノドデカン、スペルミジン、L-リシンエチルエステル、L-オルニチンエチルエステル、1,3-ジアミノ-2-プロパノール、2-(アミノメチル)-2-メチルプロパン-1,3-ジアミン、(E)-2-ブテン-1,4-ジア

10

20

ミン、1,4-ビス(アミノメチル)ベンゼン、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン、2,2'-チオジエタンアミン、2,2'-オキシジエタンアミン、1,11-ジアミノ-3,6,9-トリオキサウンデカン、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項3又は4に記載の眼疾患処置剤。

【請求項6】

前記架橋構造が、次の一般式(I)；



(式中、Y-CO-は、コンドロイチン硫酸分子内の構成二糖単位に由来する部分を表し、

-CO-Zは前記と同一の又は異なるコンドロイチン硫酸分子の構成二糖単位に由来する部分を表し、

Rは、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、置換又は無置換の炭化水素基を表し、

-CO-NH-及び-NH-CO-はコンドロイチン硫酸の構成糖であるグルクロン酸のカルボキシ基と多価アミンが有するアミノ基とのアミド結合を表す)

で示される、請求項1～5のいずれか1項に記載の眼疾患処置剤。

【請求項7】

前記炭化水素基が、主鎖の原子数が1～20の炭化水素基である、請求項6に記載の眼疾患処置剤。

【請求項8】

点眼剤である、請求項1～7のいずれか1項に記載の眼疾患処置剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コンドロイチン硫酸架橋体、並びにこれを含有する組成物、及び眼疾患処置剤に関する。

【背景技術】

【0002】

「ドライアイ」は、国際的な組織であるDry Eye WorkShop(DEWS)により、「涙液と眼表面の多因子的な疾患であり、その結果として眼表面の潜在的な障害とともに、不快感、視覚障害、涙液層の不安定性などの症状を生じる。それは涙液層の浸透圧の上昇と眼表面の炎症を伴う」と定義されている(The Ocular Surface Vol.5, No.2:75-92, 2007)。

【0003】

日本において、コンドロイチン硫酸(以下、「CS」ともいう。)を含有する点眼剤(コンドロロン(登録商標))が知られており、その効能・効果は「角膜表層の保護」である。角膜上皮に対するCSの作用に関する研究報告(Tsutomu Fujiharaら、Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, Vol.11, No.4:503-508, 1995)では、角膜上皮障害の予防を検討している。Teruo Nishidaら、Experimental Eye Research, 53:753-758, 1991では、CSが角膜上皮細胞に与える作用の有無について検証されている。また、最近の文献であるGary D. Novack, The Ocular Surface, Vol.12, No.3:227-230, 2014では、日本や米国のドライアイ治療薬が種々挙げられている。

【0004】

一方、架橋基を介した架橋構造を有するCS誘導体(以下、「CS架橋体」ともいう。)(国際公開第91/16881号パンフレット、特開平6-73102号公報、Amnon Sintovら、Biomaterials, 16:473-478, 1995)のうち、1,12-ジアミノドデカン(以下、「1,12-ジアミノドデカン」)を架橋剤として用いてCS誘導体の製造を試みたRubinsteinらの報告がある(国際公開第91/16881号パンフレット、Amnon Sintovら、Biomaterials, 16:473-478, 1995)。CS分野では、CSの水に溶けやすい性質を水に溶けにくいものに変化させ、膜や錠剤などの形態とするために架橋が用いられる。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第91/16881号パンフレット

【特許文献2】特開平6-73102号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】The Ocular Surface Vol.5, No.2:75-92, 2007

【非特許文献2】Tsutomu Fujiharaら、Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, Vol.11, No.4:503-508, 1995

【非特許文献3】Teruo Nishidaら、Experimental Eye Research, 53:753-758, 1991 10

【非特許文献4】Gary D. Novack, The Ocular Surface, Vol.12, No.3:227-230, 2014

【非特許文献5】Amnon Sintovら、Biomaterials, 16:473-478, 1995

【非特許文献6】C. Bourieら、Journal of Biomaterials Applications, Vol.12:201-221, 1998

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, Vol.11, No.4:503-508, 1995では、既に発症した角膜上皮障害に対する処置は開示されていない。Experimental Eye Research, 53:753-758, 1991には、CSが角膜上皮細胞の伸展作用を有しないことが示されている。また、The Ocular Surface, Vol.12, No.3:227-230, 2014では、CSを有効成分とする治療薬の記載は一切ない。 20

また、国際公開第91/16881号パンフレット又はBiomaterials, 16:473-478, 1995記載の製造方法を再現し種々の分析法を用いても、結局CSの架橋は確認されず(C. Bourieら、Journal of Biomaterials Applications, Vol.12:201-221, 1998)、実際はCS架橋体が得られないことが明らかとなった。

そこで本発明は、多価アミンに由来する基を介した架橋構造を有するCS誘導体を提供することを課題とする。また、同CS誘導体を含む組成物を提供することを課題とする。また、本発明は、角膜上皮障害及び/又はドライアイに対して治療効果を有する眼疾患処置剤及び処置方法を提供することを課題とする。本発明は、少なくともこれらの一つ 30

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明者らは、多価アミンに由来する基を介した架橋構造を有するCS誘導体を初めて製造し、本発明を完成した。また、CSの架橋はCSを難溶性にするために用いられるというこれまでの知見に反して、CS架橋体を含む組成物が、意外にも溶液状で用いることができ、また、角膜上皮障害及び/又はドライアイに対して優れた治療効果を発揮することを見出し、本発明を完成した。

【0009】

本発明は以下の態様を包含する。 40

[A1] 架橋基を介した架橋構造をコンドロイチン硫酸の構成二糖単位間に有する、コンドロイチン硫酸誘導体。

[A2] 前記架橋基が、多価アミン、多価エポキシ化合物、多価ビニル化合物、及びエピハロヒドリンからなる群より選択される少なくとも1種に由来する基である、[A1]に記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A3] 前記架橋基が多価アミンに由来する基である、[A1]又は[A2]に記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A4] 前記多価アミンが、主鎖上に生分解点を有しない多価アミンである、[A3]に記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A5] 前記多価アミンが、主鎖上にジスルフィド結合を有しない多価アミンである、[50

A 3] 又は [A 4] に記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 6] 前記多価アミンが、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、主鎖の炭素数が 1 ~ 20 の、置換又は無置換の多価アミンである、[A 3] ~ [A 5] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 7] 前記多価アミンが、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、主鎖の原子数が 1 ~ 20 の、置換又は無置換の多価アミンである、[A 3] ~ [A 5] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 8] 前記多価アミンが脂肪族多価アミンである、[A 3] ~ [A 7] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 9] 前記多価アミンがジアミンである、[A 3] ~ [A 8] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 10] 前記多価アミンが、エタン - 1, 2 - ジアミン、1, 3 - ジアミノプロパン、1, 4 - ジアミノブタン、1, 5 - ジアミノペンタン、1, 6 - ジアミノヘキサン、1, 8 - ジアミノオクタン、1, 12 - ジアミノドデカン、スペルミジン、L - リシンエチルエステル、L - オルニチンエチルエステル、1, 3 - ジアミノ - 2 - プロパノール、2 - (アミノメチル) - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、(E) - 2 - ブテン - 1, 4 - ジアミン、1, 4 - ビス(アミノメチル)ベンゼン、1, 4 - ビス(アミノメチル)シクロヘキサン、2, 2' - チオジエタンアミン、2, 2' - オキシジエタンアミン、1, 11 - ジアミノ - 3, 6, 9 - トリオキサウンデカン、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも 1 種である、[A 3] ~ [A 7] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 11] 前記架橋構造が、次の一般式 (I) ;



(式中、Y - CO - は、コンドロイチン硫酸分子内の構成二糖単位に由来する部分を表し、

- CO - Z は前記と同一の又は異なるコンドロイチン硫酸分子の構成二糖単位に由来する部分を表し、

R は、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、置換又は無置換の炭化水素基を表し、

- CO - NH - 及び - NH - CO - はコンドロイチン硫酸の構成糖であるグルクロン酸のカルボキシ基と多価アミンが有するアミノ基とのアミド結合を表す)

で示される、[A 1] ~ [A 10] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 12] 一般式 (I) において、

R が、主鎖上に生分解点を有しない、[A 11] に記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 13] 一般式 (I) において、

R が、主鎖上にジスルフィド結合を有しない、[A 11] 又は [A 12] に記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 14] 一般式 (I) において、

R が、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、置換又は無置換の炭化水素基を表し、

ヘテロ原子を有する場合のヘテロ原子は、窒素、酸素、及び硫黄からなる群から選択される 1 ~ 3 個の原子であり、

置換の場合の置換基は、炭素数 1 ~ 3 のアルキル基、炭素数 1 ~ 3 のアミノアルキル基、炭素数 1 ~ 3 のヒドロキシアルキル基、炭素数 1 ~ 3 のアルキルエステル基、炭素数 1 ~ 3 のアルコキシ基、アミノ基、ホルミル基、ヒドロキシ基、及びカルボキシ基からなる群から選択される少なくとも 1 種である、[A 11] ~ [A 13] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 15] 前記炭化水素基が、主鎖の炭素数が 1 ~ 20 の炭化水素基である、[A 11] ~ [A 14] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。

[A 16] 前記炭化水素基が、主鎖の炭素数が 1 ~ 10 の炭化水素基である、[A 11]

10

20

30

40

50

- ～ [A 1 4] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。
- [A 1 7] 前記炭化水素基が、主鎖の炭素数が 1 ～ 8 の炭化水素基である、 [A 1 1] ～ [A 1 4] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。
- [A 1 8] 前記炭化水素基が、主鎖の原子数が 1 ～ 2 0 の炭化水素基である、 [A 1 1] ～ [A 1 4] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。
- [A 1 9] 前記炭化水素基が、主鎖の原子数が 1 ～ 1 1 の炭化水素基である、 [A 1 1] ～ [A 1 4] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。
- [A 2 0] 前記炭化水素基が、主鎖の原子数が 1 ～ 8 の炭化水素基である、 [A 1 1] ～ [A 1 4] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。
- [A 2 1] 前記炭化水素基が、脂肪族炭化水素基である、 [A 1 1] ～ [A 2 0] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。 10
- [A 2 2] 水溶性である、 [A 1] ～ [A 2 1] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体。
- [A 2 3] [A 1] ～ [A 2 2] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体、及び薬学的に許容される担体を含む組成物。
- [A 2 4] 水溶液である、 [A 2 3] に記載の組成物。
- [A 2 5] 2 5 の条件下、多孔質フィルター（孔径 5 . 0 μ m、直径 2 5 m m）を通過させたときのフィルター通過率が 8 0 % 以上である [A 2 3] 又は [A 2 4] に記載の組成物。
- [A 2 6] 粘度が、 5 ～ 1 1 , 0 0 0 m P a ・ s である [A 2 3] ～ [A 2 5] のいずれかに記載の組成物。 20
- [A 2 7] 前記コンドロイチン硫酸誘導体の濃度が、組成物の総量に対し、 0 . 1 ～ 1 5 重量 % である、 [A 2 3] ～ [A 2 6] のいずれかに記載の組成物。
- [A 2 8] [A 1] ～ [A 2 2] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体を含む医薬。
- [A 2 9] 眼疾患処置剤である、 [A 2 3] ～ [A 2 7] のいずれかに記載の組成物。
- [A 3 0] 角膜上皮障害処置剤である、 [A 2 3] ～ [A 2 7] のいずれかに記載の組成物。
- [A 3 1] ドライアイ処置剤である、 [A 2 3] ～ [A 2 7] のいずれかに記載の組成物。 30
- [B 1] [A 1] ～ [A 2 2] のいずれかに記載のコンドロイチン硫酸誘導体を有効成分として含む組成物、眼疾患処置剤。
- [B 2] 点眼剤である、 [B 1] に記載の眼疾患処置剤。
- [B 3] 水性点眼剤である、 [B 1] 又は [B 2] に記載の眼疾患処置剤。
- [B 4] 水溶液である、 [B 1] ～ [B 3] のいずれかに記載の眼疾患処置剤。
- [B 5] 2 5 の条件下、多孔質フィルター（孔径 5 . 0 μ m、直径 2 5 m m）を通過させたときのフィルター通過率が 8 0 % 以上である [B 1] ～ [B 4] のいずれかに記載の眼疾患処置剤。
- [B 6] 前記眼疾患が角膜上皮障害である、 [B 1] ～ [B 5] のいずれかに記載の眼疾患処置剤。 40
- [B 7] 前記眼疾患がドライアイである、 [B 1] ～ [B 5] のいずれかに記載の眼疾患処置剤。
- [B 8] 前記処置が治療である、 [B 1] ～ [B 7] のいずれかに記載の眼疾患処置剤。
- [C 1] [A 2 3] ～ [A 2 7] のいずれかに記載の組成物を眼に投与することを含む、眼疾患処置方法。
- [C 2] 眼への投与方法が点眼である、 [C 1] に記載の方法。
- [C 3] 前記組成物が水性点眼剤である、 [C 1] 又は [C 2] に記載の方法。
- [C 4] 前記組成物が水溶液である、 [C 1] ～ [C 3] のいずれかに記載の方法。
- [C 5] 前記組成物が、 2 5 の条件下、多孔質フィルター（孔径 5 . 0 μ m、直径 2 5 m m）を通過させたときのフィルター通過率が 8 0 % 以上である、 [C 1] ～ [C 4] の 50

いずれかに記載の方法。

[C 6] 前記眼疾患が角膜上皮障害である、[C 1] ~ [C 5] のいずれかに記載の方法。

[C 7] 前記眼疾患がドライアイである、[C 1] ~ [C 5] のいずれかに記載の方法。

[C 8] 前記処置が治療である、[C 1] ~ [C 7] のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明の一態様によれば、多価アミンに由来する基を介した架橋構造を有する C S 誘導体を提供できる。また、本発明の別の態様によれば、前記 C S 架橋体を含有する組成物を提供できる。また、本発明の別の態様によれば、角膜上皮障害及び / 又はドライアイに対して治療効果を有する眼疾患処置剤を提供できる。本発明の別の態様によれば、眼疾患処置方法を提供できる。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】コンドロイチナーゼ A B C による消化液の HPLC チャートを示す。

【図 2】多段階質量分析の結果の一例を示す。

【図 3】多段階質量分析の結果の一例を示す。

【図 4】モデル動物に 1 日 2 回点眼した場合のフルオレセイン染色の程度の平均値を示す。

【図 5】モデル動物に 1 日 2 回点眼した場合のフルオレセイン染色の程度の平均値を示す。

20

【図 6】モデル動物に 1 日 2 回点眼した場合のフルオレセイン染色の程度の平均値を示す。

【図 7】モデル動物に 1 日 2 回点眼した場合のフルオレセイン染色の程度の平均値を示す。

【図 8】モデル動物に 1 日 2 回点眼した場合のフルオレセイン染色の程度の平均値を示す。

【図 9】モデル動物に 1 日 2 回点眼した場合のフルオレセイン染色の程度の平均値を示す。

【図 10】モデル動物に 1 日 2 回点眼した場合のフルオレセイン染色の程度の平均値を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

初めに、本明細書において使用する用語を以下のように定義する。「コンドロイチン硫酸」(「C S」ともいう。)とは、コンドロイチン硫酸又はその塩のことを意味する。「コンドロイチン硫酸架橋体」(「C S 架橋体」ともいう。)とは、架橋基を介した架橋構造を C S の構成二糖単位間に有する C S 誘導体又はその塩のことを意味する。同架橋構造は、同一の C S 分子内、及び / 又は異なる C S 分子間に存在してよい。

【 0 0 1 3 】

本明細書において、「置換」とは、化合物中の 1 又は 2 以上の水素原子が、他の原子又は原子団で置き換わることを意味する。この際に、水素原子の代わりに導入された原子又は原子団を「置換基」という。「ヘテロ原子」とは、化合物中に含まれる炭素及び水素以外の原子を意味し、例えば、窒素、酸素、硫黄等が挙げられる。「ヘテロ原子を有する」とは、別に記載のない限り、1 又は 2 種以上のヘテロ原子を、それぞれ 1 又は 2 個以上有することを意味する。「鎖上にヘテロ原子を有する」とは、鎖を構成する少なくとも 1 つの炭素原子がヘテロ原子で置き換えられていることを意味する。「炭素鎖」とは、場合により分岐を有してよく、また、鎖上にヘテロ原子を有してよい、主に炭素で構成される原子鎖を意味する。「反応性官能基」とは、コンドロイチン硫酸が有する官能基と反応する性能を有する官能基を意味する。「主鎖」とは、別に記載のない限り、2 個の反応性官能基の間を結ぶ直鎖の炭素鎖を意味する。反応性官能基が 3 個以上ある場合は、反応性官能

40

50

基の間を結ぶ炭素鎖のうち、最長の炭素鎖を主鎖とする。炭素鎖が分岐を有する場合は、別に記載のない限り、分岐を構成する炭素鎖は主鎖に含まない。主鎖は、反応性官能基に直接結合している位置を除き1又は2個以上のヘテロ原子を有してもよい。反応性官能基の間を結ぶ炭素鎖中に環状構造が存する場合は、当該環状構造を、少なくとも1つの分岐を有し、かつ分岐した炭素鎖の少なくとも2つが終点となる原子を共有する構造とみなして、各分岐鎖のうち最長のものを主鎖とする。本明細書において「主鎖の原子数」は、主鎖を構成する原子の数を意味し、主鎖上にヘテロ原子を有する場合は、同ヘテロ原子を含めた原子の数を指すものとする。本明細書において、多価アミン、又は多価アミンに由来する基における「主鎖」とは、反応性官能基である2個の一級アミノ基の間を結ぶ直鎖の炭素鎖を意味する。

10

【0014】

本明細書において、「炭化水素」とは、炭素及び水素を有する基や化合物等をいい、別に記載のない限り、ヘテロ原子、及び/又は置換基を有してもよい。また、「炭化水素」は、直鎖であっても、分岐を有してもよい。「脂肪族」とは、芳香族性を持たない基や化合物等を意味する。「環式」とは、分子内に環状構造を有する基や化合物等を意味する。「非環式」とは、分子内に環状構造を有しない基や化合物等を意味する。「アルキル基」とは、1価の直鎖又は分岐の飽和脂肪族炭化水素基をいい、「アルキレン基」とは、2価の直鎖又は分岐の飽和脂肪族炭化水素基をいう。「アルケニレン基」とは、少なくとも1つの二重結合を有する、2価の直鎖又は分岐の不飽和脂肪族炭化水素基をいう。「アルキニレン基」とは、少なくとも1つの三重結合を有する、2価の直鎖又は分岐の不飽和脂肪族炭化水素基をいう。「アリール基」とは、1価の単環式又は多環式の芳香族炭化水素基をいう。「アリーレン基」とは、2価の単環式又は多環式の芳香族炭化水素基をいう。「アリールアルキレン基」とは、アリール基の水素原子1個がアルキレン基で置換された2価の基、又は芳香環の水素原子2個がアルキレン基で置換された2価の基をいう。「シクロアルキル基」とは、1価の環式脂肪族炭化水素基をいう。「シクロアルキレン基」とは、2価の環式脂肪族炭化水素基をいう。「シクロアルキルアルキレン基」とは、シクロアルキル基の水素原子1個がアルキレン基で置換された2価の基、又はシクロアルカンの水素原子2個がアルキレン基で置換された2価の基をいう。「アミノアルキル基」とは、アルキル基にアミノ基が置換した基をいう。「ヒドロキシアルキル基」とは、アルキル基にヒドロキシ基が置換した基をいう。

20

30

本明細書において「多価アミン」とは一級アミノ基(-NH₂)を2個以上有するアミンを意味する。また、本明細書において、「ジアミン」は一級アミノ基を2個、「トリアミン」は一級アミノ基を3個有するアミンを意味する。

本明細書において「脂肪族多価アミン」とは、脂肪族炭化水素の2以上の水素原子が一級アミノ基で置換された多価アミンを意味する。「芳香族多価アミン」とは、芳香族炭化水素の2以上の水素原子が一級アミノ基又はアミノアルキル基で置換された多価アミンを意味する。

【0015】

本明細書において、「~」を用いて示された数値範囲は、「~」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。また、組成物中の各成分の含有量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

40

【0016】

以下、本発明を発明の実施形態により詳説する。本発明は、これらの実施形態によって限定されるものではない。

<CS架橋体>

本発明における「CS架橋体」は、CSの構成二糖単位間に、架橋基を介した架橋構造を有しており、前記架橋構造は、同一のCS分子内、及び/又は異なるCS分子間で形成されていてよい。前記CS架橋体の原料に用いられるCSは、D-グルクロン酸とN-アセチル-D-ガラクトサミンの二糖構造の繰り返しを基本骨格とし、主に構成糖のヒドロ

50

キシ基の一部が硫酸化されたグリコサミノグリカンである限りにおいて特に限定されない。また、このCS架橋体、及びその原料に用いるCSは、塩を形成しない遊離状態であっても、薬学的に許容される塩を形成していてもよい。

【0017】

前記の薬学的に許容される塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属イオンとの塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属イオンとの塩等が挙げられる。本発明におけるCS架橋体は、生体への適用性及び親和性の観点から、薬学的に許容されるアルカリ金属イオンとの塩であることが好ましく、ナトリウム塩であることがより好ましい。

本発明におけるCS架橋体、及びその原料に用いられるCSは、水和物又は溶媒和物の形態をとっていてもよい。

10

【0018】

CS架橋体の原料に用いられるCSの種類は特に限定されず、例えば、コンドロイチン硫酸C(以下、「CS C」ともいう。)が挙げられる。CS架橋体の原料に用いられるCSの由来等は特に限定されず、天然物由来、化学的に合成したもの等のいずれをも用いることができる。例えば天然物からCSを取得する場合には、所望のCSの種類等に応じて、原料とすべき天然物を適宜選択することができる。また、天然物由来物質を化学合成手法により適宜修飾して、目的とするCSを得てもよい。

【0019】

CS架橋体の原料に用いられるCSの重量平均分子量は特に限定されないが、10,000~100,000であることが好ましく、10,000~80,000であることがより好ましく、10,000~60,000であることが更に好ましく、15,000~45,000であることが特に好ましい。CSの重量平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィー、又は光散乱法を用いた常法により測定できる。

20

このようなCSに架橋剤を共有結合させることにより、CS架橋体を製造することができる。

【0020】

<架橋基>

本発明において、「架橋基」とは、CSが有する基と共有結合しうる基を2個以上有する化合物に由来する基をいう。このような化合物としては、アミノ基、エポキシ基、ビニル基、及びハロアルキル基からなる群より選択される少なくとも1種の基を2個以上有するものであることが好ましい。本発明におけるCS架橋体は、これらの基により架橋が形成されていることが好ましい。また、CSが有する基と共有結合しうる基を2個以上有する化合物としては、多価アミン、多価エポキシ化合物、多価ビニル化合物、及びエピハロヒドリンからなる群より選択される少なくとも1種の化合物であることがより好ましい。

30

【0021】

本発明における架橋基が有する炭素の数、並びに、本発明の多価アミン、多価エポキシ化合物、多価ビニル化合物、及びエピハロヒドリンの炭素数は、特に限定されないが、1~20、1~12、1~10、1~8、1~6、1~4、2~12、2~10、2~8、2~6、2~4、4~12、4~10、4~8が例示される。

40

【0022】

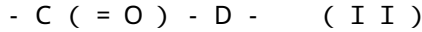
アミノ基はCSのカルボキシ基とアミド結合を形成しうる。エポキシ基、ビニル基、及びハロアルキル基は、CSのヒドロキシ基とエーテル結合を形成しうる。CSは構成二糖単位中にただ1つのみのカルボキシ基を有するので、CS架橋体の構造の多様性を低減させるためには、架橋基はアミノ基に由来する基を有することが好ましく、多価アミンに由来する基であることが特に好ましい。多価アミンとしては、一級アミノ基(-NH₂)を2個以上有していれば特に限定されないが、例えば、トリアミン、ジアミン等が挙げられ、CS架橋体の構造の多様性低減の点から、ジアミンが好ましい。

【0023】

本発明における多価アミンは、生体中で分解可能な結合、すなわち生分解点を有しない

50

多価アミンであってよい。本発明における多価アミンは、分子内の主鎖上に生分解点を有しない多価アミンであってよい。本明細書では、「生分解点」とは、以下の一般式 (I I) ;



(D は、酸素原子、又は硫黄原子を表す)

で示される構造を意味する。すなわち、生分解点としては、エステル結合又はチオエステル結合が挙げられる。よって、本発明における多価アミンは、分子内の主鎖上にエステル結合及びチオエステル結合を有しない多価アミンであってよい。

【 0 0 2 4 】

本発明における多価アミンは、ジスルフィド結合を有しない多価アミンであってよい。また、同多価アミンは、その主鎖上にジスルフィド結合を有しない多価アミンであってよい。

10

【 0 0 2 5 】

本発明における多価アミンとしては、例えば、脂肪族多価アミン、及び芳香族多価アミンが挙げられ、このうち脂肪族多価アミンが好ましい。脂肪族多価アミンは、非環式脂肪族多価アミン、又は環式脂肪族多価アミンのいずれであってよいが、非環式脂肪族多価アミンが好ましい。脂肪族多価アミンは、飽和脂肪族多価アミン、又は不飽和脂肪族多価アミンのいずれであってよい。すなわち、脂肪族多価アミンは、非環式飽和脂肪族多価アミン、非環式不飽和脂肪族多価アミン、環式飽和脂肪族多価アミン、又は環式不飽和脂肪族多価アミンのいずれであってよいが、このうち、非環式飽和脂肪族多価アミンが好ましい。また、生体成分と同一物質又はその誘導体を多価アミンとしてよく、例えば、多価アミンは塩基性アミノ酸又はその誘導体であってよい。

20

【 0 0 2 6 】

本発明における多価アミンとしては、例えば、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、置換又は無置換の、脂肪族多価アミン、芳香族多価アミン等が挙げられる。

本発明における置換基としては、例えば、アルキル基、アミノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アルキルエステル基、アルコキシ基、アミノ基、ホルミル基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、カルボニル基等が挙げられるが、アミノアルキル基等の反応性官能基を含む基が置換基となる場合は、当該置換基が主鎖を構成しないように置換しているものとする。このうち、アルキル基、アミノアルキル基、アルキルエステル基、又はヒドロキシ基が好ましい。アルキル基、アミノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アルキルエステル基、及びアルコキシ基の炭素数はそれぞれ独立して 1 ~ 5 が好ましく、1 ~ 3 がより好ましい。アルキル基としては、炭素数 1 ~ 3 のアルキル基、すなわち、メチル基、エチル基、又はプロピル基が好ましい。アミノアルキル基としては、アミノメチル基、アミノエチル基、又はアミノプロピル基が好ましい。アルキルエステル基としては、メチルエステル基、エチルエステル基、プロピルエステル基、ブチルエステル基が例示され、このうち、メチルエステル基、又はエチルエステル基が好ましい。置換基を有する場合、置換基の数は特に限定されないが、置換可能な位置に 1 ~ 5 個有してよく、1 ~ 3 個が好ましい。置換基が 2 個以上の場合、各置換基は同一でも異なってもよい。

30

本発明におけるヘテロ原子としては、例えば、窒素、酸素、硫黄等が挙げられる。主鎖上にヘテロ原子を有する場合、同ヘテロ原子の数は特に限定されないが、1 ~ 5 個、又は 1 ~ 3 個が例示される。ヘテロ原子を 2 個以上有する場合、各ヘテロ原子は同一でも異なってもよい。主鎖上にヘテロ原子を 2 個以上有する場合、これらヘテロ原子同士が直接結合しないように位置してもよい。主鎖上にヘテロ原子を有する場合、反応性官能基、特に一級アミノ基と直接結合している位置以外にヘテロ原子を有してよい。

40

【 0 0 2 7 】

本発明における多価アミンの主鎖の炭素数は、1 以上、又は 2 以上が例示され、20 以下、12 以下、10 以下、8 以下、6 以下、又は 4 以下が例示される。前記炭素数は例えば、1 ~ 20、1 ~ 12、1 ~ 10、1 ~ 8、1 ~ 6、1 ~ 4、2 ~ 20、2 ~ 12、2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

50

又は12が挙げられる。架橋反応効率の点からは、多価アミンの主鎖の炭素数は、1~10が好ましく、1~8がより好ましく、1~6がより好ましく、2~4が特に好ましい。また、薬効の点からは、多価アミンの主鎖の炭素数は、1~10が好ましく、1~8がより好ましく、1~6がより好ましく、2~5がより好ましく、2~4がより好ましい。

【0028】

本発明における多価アミンの主鎖の原子数は、1以上、又は2以上が例示され、20以下、12以下、11以下、10以下、8以下、6以下、又は4以下が例示される。前記原子数は例えば、1~20、1~12、1~11、1~10、1~8、1~6、1~4、2~20、2~12、2~11、2~10、2~8、2~6、2~4、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12が挙げられる。架橋反応効率の点からは、多価アミンの主鎖の原子数は、1~11が好ましく、1~10がより好ましく、1~8がより好ましく、1~6がより好ましく、2~4が特に好ましい。また、薬効の点からは、多価アミンの主鎖の原子数は、1~11が好ましく、1~10がより好ましく、1~8がより好ましく、1~6がより好ましく、2~5がより好ましく、2~4がより好ましい。

10

【0029】

本発明における多価アミンは、トリアミン、又はジアミンであることが好ましく、ジアミンであることがより好ましい。

本発明における多価アミンは、脂肪族ジアミン又は芳香族ジアミンが好ましく、脂肪族ジアミンがより好ましい。脂肪族ジアミンとしては、非環式脂肪族ジアミン又は環式脂肪族ジアミンが例示され、なかでも非環式脂肪族ジアミンが好ましい。環式脂肪族ジアミンとしては、シクロアルキレンジアミン、及びビス(アミノアルキル)シクロアルカンなどが例示され、非環式脂肪族ジアミンとしては、アルキレンジアミン、アルケニレンジアミン、及びアルキニレンジアミンが例示される。このうち、アルキレンジアミン又はアルケニレンジアミンが好ましく、アルキレンジアミンが特に好ましい。芳香族ジアミンとしては、例えば、アリーレンジアミン、及びビス(アミノアルキル)ベンゼンなどが挙げられる。

20

【0030】

本発明における多価アミンの具体例としては、エタン-1,2-ジアミン、1,3-ジアミノプロパン、1,4-ジアミノブタン(プトレシン)、1,5-ジアミノペンタン(カダペリン)、1,6-ジアミノヘキサン、1,7-ジアミノヘプタン、1,8-ジアミノオクタン、1,9-ジアミノノナン、1,10-ジアミノデカン、1,11-ジアミノウンデカン、1,12-ジアミノドデカン、1,3-ジアミノ-2-プロパノール、2,2'-チオジエタンアミン、2,2'-オキシジエタンアミン、1,11-ジアミノ-3,6,9-トリオキサウンデカン、L-リシンエチルエステル、L-オルニチンエチルエステル、N-(2-アミノエチル)-1,2-エタンジアミン、N-(3-アミノプロピル)ブタン-1,4-ジアミン(スペルミジン)、N,N'-ビス(3-アミノプロピル)ブタン-1,4-ジアミン(スペルミン)等のアルキレンジアミン、プロパン-1,2,3-トリアミン、ペンタン-1,3,5-トリアミン、2-(アミノメチル)-2-メチルプロパン-1,3-ジアミン等のトリアミン、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン、1,4-ビス(アミノメチル)ベンゼン、(E)-2-ブテン-1,4-ジアミン、及びこれらの塩が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を併せて使用できる。

30

40

【0031】

本発明における多価エポキシ化合物は、エポキシ基を2個以上有していれば、特に限定されない。ジエポキシ化合物としては、例えば、ジグリシジル化合物が挙げられる。

本発明における多価ビニル化合物としては、ビニル基を2個以上有していれば、特に限定されない。ジビニル化合物としては、例えば、ジビニルスルホンが挙げられる。

本発明におけるエピハロヒドリンとしては、例えば、エピクロロヒドリンが挙げられる。

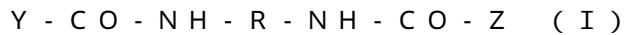
【0032】

50

< 架橋構造 >

本発明において、「架橋構造」とは、同一の又は異なるCS分子を、架橋基を介して、共有結合により結びつけている構造のことを意味する。

本発明において、架橋基が多価アミンに由来する基である場合、本発明のCS架橋体は、以下の一般式(I)；



(式中、Y - CO - は、コンドロイチン硫酸分子内の構成二糖単位に由来する部分を表し、
- CO - Zは前記と同一の又は異なるコンドロイチン硫酸分子の構成二糖単位に由来する部分を表し、

Rは、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、置換又は無置換の炭化水素基を表し、

- CO - NH - 及び - NH - CO - はコンドロイチン硫酸の構成糖であるグルクロン酸のカルボキシ基と多価アミンが有するアミノ基とのアミド結合を表す)

で示される架橋構造を有してよい。

【0033】

また、本発明において、架橋基が多価アミンに由来する基である場合、本発明のCS架橋体は、以下の一般式(III)；



(式中、Y - CO - 、R、- CO - NH - は、先に式(I)で定義されたとおりである)で示される構造、すなわち、多価アミンのアミノ基のうち1つがCSと共有結合した構造を有してよい。

【0034】

一般式(I)及び(III)において、- NH - R - NH - 、及び - NH - R - NH₂ は、多価アミンに由来する基であるため、前記の< 架橋基 >の項目の本発明における多価アミンに関する説明における記述、例示、及び好ましい範囲がそのまま適用できる。

【0035】

一般式(I)及び(III)におけるRは、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、置換又は無置換の炭化水素基であってよい。ここでいう炭化水素基は、脂肪族炭化水素基、又は芳香族炭化水素基であってよいが、脂肪族炭化水素基が好ましい。脂肪族炭化水素基は、非環式脂肪族炭化水素基、又は環式脂肪族炭化水素基のいずれであってよいが、非環式脂肪族炭化水素基が好ましい。脂肪族炭化水素基は、飽和脂肪族炭化水素基、又は不飽和脂肪族炭化水素基のいずれであってよい。すなわち、脂肪族炭化水素基は、非環式飽和脂肪族炭化水素基、非環式不飽和脂肪族炭化水素基、環式飽和脂肪族炭化水素基、又は環式不飽和脂肪族炭化水素基のいずれであってよいが、なかでも非環式飽和脂肪族炭化水素基が好ましい。非環式脂肪族炭化水素基としては、アルキレン基、アルケニレン基、及びアルキニレン基が例示され、なかでもアルキレン基、又はアルケニレン基が好ましく、アルキレン基がより好ましい。環式脂肪族炭化水素基としては、シクロアルキレン基、及びシクロアルキルアルキレン基が例示される。芳香族炭化水素基としては、アリーレン基、及びアリールアルキレン基が例示される。一般式(I)及び(III)におけるRは、主鎖上にヘテロ原子を有しない無置換の炭化水素基以外の炭化水素基であってよい。

本発明における置換基、ヘテロ原子としては、前記の< 架橋基 >の項目の本発明における多価アミンに関する説明における記述、例示、及び好ましい範囲がそのまま適用できる。

【0036】

一般式(I)及び(III)におけるRは、生分解点を有しない炭化水素基であってよい。同Rは、主鎖上に生分解点を有しない炭化水素基であってよい。生分解点としては、例えば、エステル結合又はチオエステル結合が挙げられる。すなわち、Rは、主鎖上にエステル結合及びチオエステル結合を有しない炭化水素基であってよい。

【0037】

一般式 (I) 及び (III) における R は、ジスルフィド結合を有しない炭化水素基であってよい。同 R は、その主鎖上にジスルフィド結合を有しない炭化水素基であってよい。同 R は、その主鎖上にヘテロ原子を 2 個以上有する場合、これらヘテロ原子同士が直接結合しないように位置してもよい。一般式 (I) 及び (III) における R は、その両端の原子、すなわち窒素原子と結合している原子が炭素原子であってよい。

【0038】

一般式 (I) 及び (III) における R の主鎖の炭素数及び原子数は、前記の〈架橋基〉の項目の本発明における多価アミンの主鎖の炭素数及び原子数に関する記述、例示、及び好ましい範囲がそのまま適用できる。

10

【0039】

本発明の CS 架橋体の一つの実施形態では、一般式 (I) 及び (III) における R が、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{R}^1-\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-$ である。ここで R^1 は酸素原子、硫黄原子、又は $-\text{NH}$ のいずれかを表し、 n が 2 以上のときは、各 R^1 は同じであっても異なってもよい。また、 n は 1 ~ 5、又は 1 ~ 3 の整数を表す。

【0040】

本発明の CS 架橋体の一つの実施形態では、一般式 (I) 及び (III) における R が、 $-(\text{CH}_2)_1-(\text{CR}^2\text{R}^3)-(\text{CH}_2)_m-$ である。ここで R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して、水素原子、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、炭素数 1 ~ 3 のアルキル基、アルキルエステル基、又はアミノアルキル基であり、 l は 1 ~ 5 の整数であり、 m は 0 ~ 5 の整数である。さらなる実施形態では、R は前記式 $-(\text{CH}_2)_1-(\text{CR}^2\text{R}^3)-(\text{CH}_2)_m-$ で表され、ここで R^2 、 R^3 、 l 及び m は先に定義したとおりであり、 R^2 が水素原子の場合には、 R^3 は水素原子でない。別のさらなる実施形態では、R は前記式 $-(\text{CH}_2)_1-(\text{CR}^2\text{R}^3)-(\text{CH}_2)_m-$ で表され、ここで R^2 、 R^3 及び l は先に定義したとおりであり、 m は 1 ~ 5 の整数であり、 R^2 が水素原子の場合には、 R^3 は水素原子でない。

20

【0041】

本発明の CS 架橋体の一つの実施形態では、一般式 (I) 及び (III) における R が、 $-(\text{CH}_2)_p-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_q-$ である。ここで p 及び q はそれぞれ独立して、0 ~ 3、又は 1 ~ 2 の整数である。

30

【0042】

一般式 (I) 及び (III) における R の具体例としては、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5-$ 、 $-(\text{CH}_2)_6-$ 、 $-(\text{CH}_2)_7-$ 、 $-(\text{CH}_2)_8-$ 、 $-(\text{CH}_2)_9-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{10}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{11}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{12}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{X}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{Ph}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{NH}_2)(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{COOCH}_2\text{CH}_3)-$ 、及び $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{COOCH}_2\text{CH}_3)-$ が挙げられる (ここで、X は 1, 4-シクロヘキシレン基を、Ph は 1, 4-フェニレン基を表す)。

40

【0043】

また、架橋基として多価アミンに由来する基を選択する場合、CS におけるカルボキシ基のすべてが、架橋基とアミド結合している必要はなく、その一部がアミド結合していてもよい。

【0044】

本発明の CS 架橋体の一実施形態として、以下が挙げられる。

多価アミンに由来する基を介した架橋構造を CS の構成二糖単位間に有する CS 誘導体

50

であって、前記架橋構造が、次の一般式 (I) ;



(式中、Y - CO - は、CS分子内の構成二糖単位に由来する部分を表し、
- CO - Z は前記と同一の又は異なるCS分子の構成二糖単位に由来する部分を表し、
R は、主鎖上にヘテロ原子を有するか又は有しない、主鎖の原子数が1 ~ 11の、置換又は無置換の脂肪族炭化水素基を表し、ヘテロ原子を有する場合のヘテロ原子は、窒素、酸素、及び硫黄からなる群から選択される1 ~ 3個の原子であり、置換の場合の置換基は、炭素数1 ~ 3のアルキル基、炭素数1 ~ 3のアミノアルキル基、炭素数1 ~ 3のヒドロキシアルキル基、炭素数1 ~ 3のアルキルエステル基、炭素数1 ~ 3のアルコキシ基、アミノ基、ホルミル基、ヒドロキシ基、及びカルボキシ基からなる群から選択される少なくとも1種であり、

- CO - NH - 及び - NH - CO - はCSの構成糖であるグルクロン酸のカルボキシ基と多価アミンが有するアミノ基とのアミド結合を表す)

で示されるものである、CS誘導体。ここで、この実施形態におけるCS架橋体は、一般式 (I) 中のRが、主鎖上に生分解点及び/又はジスルフィド結合を有しない炭化水素基であってよい。

【 0 0 4 5 】

< CS架橋体の製造方法 >

本発明におけるCS架橋体は、CSが有する2つの官能基と架橋剤が有する2つの反応性官能基を、通常用いられる方法によって共有結合させることにより製造することができる。CSが有する2つの官能基は、同一のCS分子の基でも、異なるCS分子の基でもよい。架橋剤としては、多価アミン、多価エポキシ化合物、多価ビニル化合物、エピハロヒドリン等の多官能性架橋剤を使用することができ、前記<架橋基>の項目におけるそれぞれの例示や好ましい範囲がそのまま適用できる。

【 0 0 4 6 】

CSと架橋剤を反応させる際の溶媒中のCSの濃度は、2 ~ 20重量% (以下、「wt %」ともいう。) が好ましく、2 ~ 15重量%がより好ましく、3 ~ 15重量%が特に好ましい。

【 0 0 4 7 】

架橋反応時の溶媒としては、CS及び架橋剤が溶解する溶媒であれば特に限定されないが、水、及び水混和性有機溶媒の混合溶媒が好ましい。水混和性有機溶媒は、特に限定されないが、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n - プロパノール、第三級ブタノールなどの低級アルコール類、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテルなどのグリコールエーテル類、アセトン、1, 4 - ジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが挙げられる。これらの中でも、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、1, 4 - ジオキサンが好ましい。これらの水混和性有機溶媒は、水に対して単独で用いてもよく、2種以上を混合して用いてもよい。

【 0 0 4 8 】

架橋反応時間は、特に限定されるものではないが、1 ~ 48時間、1 ~ 24時間、2 ~ 20時間、終夜等が例示される。本明細書において、「終夜」とは10 ~ 24時間を意味する。なお、10%炭酸ナトリウム水溶液を添加すること等により、架橋反応の途中で反応を停止してもよい。架橋反応時の温度は、特に限定されず、使用する溶媒により適宜選択されるが、5 ~ 60℃が好ましく、15 ~ 30℃がより好ましい。

【 0 0 4 9 】

架橋反応の後に、適宜、アルカリによる処理工程を加えることができる。架橋反応後の反応液をアルカリ性にするアルカリ処理は、該反応液がアルカリ性となる処理である限り特に限定されない。具体的には、アルカリ処理には無機塩基を使用することが好ましく、なかでも、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、又は炭酸ナトリウムを使用することが好ましい。アルカリ処理のpH条件としては、7.2 ~ 11、好ましくは7.5 ~ 10

10

20

30

40

50

が例示される。アルカリによる処理時間は、特に限定されるものではないが、2～12時間、好ましくは2～6時間が例示される。アルカリ処理の際の温度は、5～60℃が好ましく、15～30℃がより好ましい。

【0050】

架橋反応後、又は上記のアルカリによる処理工程後のCS架橋体を含む反応液を、1) 攪拌工程、2) 沈殿工程、3) 洗浄工程、4) 乾燥工程を経由させることで、最終的に乾燥粉末状態のCS架橋体が得られる。

攪拌工程、沈殿工程、洗浄工程、及び乾燥工程は、当業者にとって一般的に行われる方法で行うことができ、特に限定されない。

【0051】

<多価アミンを架橋剤として用いた、CSの架橋方法>

架橋剤として多価アミンを使用する場合、CSのカルボキシ基と架橋剤のアミノ基を、通常用いられるアミド化方法によって共有結合させることにより架橋することができる。

【0052】

この場合のアミド化方法としては、例えば、溶媒中、水溶性カルボジイミド(例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリドN水和物(DMT-MM)等の縮合剤を用いる方法、対称酸無水物法、混合酸無水物法、活性エステル法などを挙げることができる。アミド化方法の反応条件は、使用するCSと架橋剤に応じて適宜選択される。

【0053】

CSのカルボキシ基と多価アミン架橋剤を反応させる場合、溶媒中のCSの濃度は、2～20重量%が好ましく、2～15重量%がより好ましく、3～15重量%が特に好ましい。

CSに対する多価アミン架橋剤のモル当量としては、CSの二糖単位1.00モル当量(eq)に対して、0.005～0.500eqが好ましく、0.005～0.300eqがより好ましく、0.005～0.250eqがより好ましく、0.005～0.200eqがより好ましく、0.005～0.100eqが特に好ましい。

【0054】

多価アミン架橋剤に対する縮合剤のモル当量としては、多価アミン架橋剤の1.00モル当量(eq)に対して、(0.50～5.00)×価数eqが好ましく、(1.00～4.00)×価数eqがより好ましく、(1.00～3.00)×価数eqが特に好ましい。ここで「価数」とは、多価アミンの価数を意味する。

【0055】

架橋反応時の溶媒、架橋反応時間、及び架橋反応時の温度については、前記の例示及び好ましい範囲がそのまま適用される。架橋反応時のアミド化法、CSの濃度、多価アミン架橋剤の構造、架橋剤の添加量、縮合剤の添加量、及び溶媒は、CS架橋体に求められる性質によって、適宜選択される。

【0056】

CSのヒドロキシ基を利用した架橋の場合、利用されるヒドロキシ基の位置の違いにより、多様な構造のCS架橋体が生じうる。このため、CS架橋体の構造の多様性を低減させるためには、CSのカルボキシ基を利用した架橋を選択することが好ましい。すなわち、CSのカルボキシ基とアミド結合を形成する点で、架橋剤としては、多価アミンが好ましい。また、CS架橋体の構造の多様性を低減させるためには、ジアミンが特に好ましい。

【0057】

CS架橋体の架橋構造は、例えば、実施例12Aに記載の方法により確認することができる。

【0058】

<架橋率>

10

20

30

40

50

本発明におけるCS架橋体の架橋率は、CSの繰り返し二糖単位当たりの、2以上の官能基がCSと結合した架橋基の数を百分率で表した値を意味する。例えば、ジアミンに由来する基を介した架橋構造を有するCS誘導体の架橋率は、以下の式(A)により算出される。

【数1】

$$\frac{\text{両端のアミノ基がCSと結合した架橋基のモル数(mol)}}{\text{CS架橋体中の総—CORモル数(mol)}} \times 100 (\%) \quad (A)$$

(上記式中、Rは、-OH、-OM(Mは、周期表1族又は2族の金属元素を表す)、又は、ジアミンに由来する基を表す。)

【0059】

本発明のCS架橋体の架橋率は特に限定されないが、0.01%以上、0.05%以上、0.1%以上、0.5%以上、30%以下、10%以下、5%以下、3%以下、1%以下が例示され、0.01~30%が好ましく、0.05~10%がより好ましく、0.1~5%がより好ましく、0.25~4%がより好ましく、0.5~3%が特に好ましい。

【0060】

<架橋率測定>

ジアミンに由来する基を介した架橋構造を有するCS誘導体の架橋率は、例えば、以下の方法により測定できる。被験物質に希硫酸を加え60℃、6時間加熱を行った後、得られた溶液を塩基性にし、プロピレンオキサイドを添加し60℃で一晩加熱を行う。強酸性にした溶液を110℃で一晩加熱を行い、得られた溶液を塩基性にし、イソチオシアン酸フェニルを用いて架橋基のアミノ基のラベル化を行い、ラベル化された架橋基をLC/MSにより定量する。そして、CS二糖単位のモル数に対する架橋基のモル数を百分率で算出する。

【0061】

<薬学的に許容される担体>

本明細書における「薬学的に許容される担体」としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、精製水、注射用水等が挙げられる。また、適宜、pH調整剤、緩衝剤、等張化剤、安定化剤、防腐剤等の通常用いられる添加剤を使用してよい。添加剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素一カリウム、エデト酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム等が挙げられる。

【0062】

<CS架橋体を含有する組成物>

本発明のCS架橋体を含有する組成物(「本発明の組成物」ともいう。)の調製方法は特に限定されないが、例えば、本発明のCS架橋体を、薬学的に許容される担体と混合し、4~24時間、又はそれ以上の時間、振盪機で振盪することにより、調製することができる。

【0063】

本発明のCS架橋体を含有する組成物は、液状であることが好ましく、溶質が十分に微粒状態で溶媒中に均質に分散していると考えられる点で、水溶液であることがより好ましい。本明細書における「水溶液」とは、水を媒質とする組成物であって、その性状(以下、「溶状」ともいう。)が澄明のものをいう。溶状は、後述する「溶状確認試験」により判定することができる。特に、本発明の組成物を点眼剤等の医薬として使用する場合、不溶物が存在すると、これが異物感につながる可能性があるため、本発明の組成物は水溶液であることが好ましい。水を媒質とする組成物としては、具体的には、本発明のCS架橋体を生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、精製水、又は注射用水と混合した組成物が例示される。

本発明のCS架橋体は、水溶性であることが好ましい。CS架橋体が水溶性か否かは、後述する「水溶性確認試験」により判定することができる。

10

20

30

40

50

本発明のCS架橋体を含有する組成物は、CS架橋体のフィルター通過率が50%以上であることが好ましく、60%以上であることがより好ましく、70%以上であることがより好ましく、80%以上であることがより好ましく、85%以上であることが特に好ましい。

本発明のCS架橋体を含有する組成物の粘度は、5～11,000、10～5,000、20～1,000、30～300、又は30～250 mPa・sであってよい。本発明のCS架橋体を含有する組成物中のCS架橋体の濃度は、組成物の総量に対し、0.1～15重量%、0.3～13重量%、又は1～10重量%であってよい。

【0064】

<溶状確認試験>

調製した組成物の600nmにおける吸光度を紫外可視分光光度計(UV-1800、(株)島津製作所社製)を使用して測定する。吸光度値が0.1以下の場合にその組成物の溶状を「澄明」と、0.1を超える場合に「白濁」と判定する。

【0065】

<水溶性確認試験>

CS架橋体を濃度が2.0%(w/w)になるように水又はPBSに溶解し、その組成物の600nmにおける吸光度を紫外可視分光光度計(UV-1800、(株)島津製作所社製)を使用して測定する。吸光度値が0.1以下となる場合にそのCS架橋体を「水溶性」と判定する。

【0066】

<粘度測定>

E型回転粘度計(TV-L/H、東機産業社)、標準コーン(CORD-1, 1°34'xR24)を使用して、25での5rpm値を測定し、本明細書における「粘度」(mPa・s)とした。5rpm値が検出範囲外の場合は、その他回転数から外挿値を算出し、本明細書における「粘度」(mPa・s)とした。

【0067】

<フィルター通過性試験>

25条件下で多孔質フィルター(孔径が5.0μm、直径25mm)に試料を通過させ、通過前後の試料中のCSの二糖単位換算濃度(以下、「CS濃度」ともいう。)を後記カルバゾール硫酸法で測定し、以下の式(B)により、本明細書における「フィルター通過率」が算出される。なお、フィルター通過時の圧力は5.3kgf/cm²以下とする。

【数2】

$$\frac{\text{フィルター通過後の試料中のCS濃度(重量\%)}}{\text{フィルター通過前の試料中のCS濃度(重量\%)}} \times 100 (\%) \quad (\text{B})$$

例えば、フィルター通過前の試料中のCS濃度が1.00%で、フィルター通過後の試料中のCS濃度が0.90%の場合、フィルター通過率は90%になる。

【0068】

<カルバゾール硫酸法によるCS濃度の算出>

D-グルクロノラクトン(分子量:176.12)の20.0μg/mL水溶液を標準品として使用したカルバゾール硫酸法から以下の式(C)によりCS濃度(mol/L)が算出される。

【数3】

$$\text{OD530[サンプル]} \div \text{OD530[標準品]} \times \text{D-グルクロノラクトン濃度(mol/L)} \quad (\text{C})$$

(ここで、OD530とは、波長530nmにおける光学濃度を表す)

【0069】

本発明のCS架橋体、及び本発明の組成物は、医薬、眼疾患処置剤等として使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。すなわち、本発明のCS架橋体は、医薬、眼疾患処置剤の有効成分として使用することができる。

【0070】

<眼疾患処置剤>

本発明の眼疾患処置剤は、本発明のCS架橋体を有効成分として含有する、眼疾患処置剤である。CS架橋体としては、本明細書にて先に説明したCS架橋体、特に、先に[A1]～[A22]のいずれかとして挙げた態様のCS誘導体が挙げられる。本明細書における「眼疾患」とは、前眼部における何らかの異常であれば特に限定されない。前眼部のなかでも、眼表面が好ましく、角膜がより好ましく、角膜上皮が特に好ましい。本明細書における「前眼部」には、涙液が含まれる。本明細書における「眼疾患」としては、角膜上皮障害、涙液層の異常、又はドライアイが好ましく、なかでも、角膜上皮障害、又はドライアイが特に好ましい。本明細書において「ドライアイ」とは、ドライアイ疾患又はドライアイ症候群の両方、又はいずれであってもよい。「涙液層の異常」とは、涙液層が破綻した状態や、涙液層が破綻しやすい状態にあることをいい、DEWSによるドライアイの定義(The Ocular Surface Vol.5, No.2:75-92, 2007)で言及されている「涙液層の不安定」な状態を包含する意味である。涙液層の異常の原因としては、涙液の蒸発の亢進、涙液の減少等が挙げられる。涙液層の異常は、シルマー法、涙液層破壊時間(BUT)、角膜球面不正指数(SRI)等を用いて評価することもできる。

10

【0071】

「角膜上皮障害」とは、角膜上皮に生じる障害であれば、特に限定されない。例えば、角膜上皮欠損、角膜上皮びらん、角膜潰瘍、角膜穿孔等が挙げられ、点状表層角膜症や角膜炎等による角膜上皮障害も包含する。また、例えば、ドライアイ、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群等の内因性疾患に伴う角膜上皮障害、又は、コンタクトレンズ装用、外傷、手術、感染性、薬剤性等の外因性疾患に伴う角膜上皮障害も包含する。なかでも、ドライアイに伴う角膜上皮障害であることが好ましい。

20

【0072】

本明細書における「処置」には、治療が含まれる。「治療」とは、改善、治癒、治癒促進することを包含する。すなわち、「処置剤」には、治療剤が含まれ、「治療剤」には、改善剤、治癒促進剤が包含される。本明細書において、涙液層の異常を治療することを、「涙液層安定化」ともいう。

30

【0073】

本明細書における「眼疾患処置剤」は、前眼部における異常、なかでも、眼表面、又は涙液における異常に対する処置剤であることが好ましい。具体的には、角膜上皮障害処置剤、涙液層安定化剤、及びドライアイ処置剤が例示される。

【0074】

<剤形及び製剤>

本発明のCS架橋体を有効成分として含有する眼疾患処置剤(以下、「本発明の剤」ともいう。)の剤形は、特に限定されるものではないが、例えば、点眼剤、眼軟膏剤、クリーム剤、ローション剤等が挙げられ、なかでも点眼剤が好ましく、水性点眼剤が特に好ましい。「水性点眼剤」とは、水を50重量%以上含有する点眼剤を意味する。本発明の水性点眼剤としては、水を80重量%以上含有する点眼剤が好ましく、90重量%以上含有する点眼剤がより好ましい。本発明の水性点眼剤に含有される水は、製薬上又は生理学的に許容されるものであればよい。例えば、蒸留水、精製水、滅菌精製水、注射用水、注射用蒸留水等を使用できる。これらの定義は第十六改正日本薬局方に基づく。生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水等を使用してもよく、また、適宜、pH調整剤、緩衝剤、等張化剤、安定化剤、防腐剤等の通常用いられる添加剤を使用してよい。添加剤としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素一カリウム、エデト酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム等が挙げられる。点眼剤のpH、及び浸透圧比は、眼科製剤に許容される範囲であれば特に限定されない。なお、本発明の剤には、ヒアルロン酸を含まなくてよい。

40

50

【 0 0 7 5 】

本発明の剤は、液状であることが好ましく、溶質が十分に微粒状態で溶媒中に均質に分散していると考えられる点で、水溶液であることがより好ましい。特に、本発明の剤を点眼剤として使用する場合、不溶物が存在すると、これが異物感につながる可能性があるため、本発明の剤は水溶液であることが好ましい。また、本発明の剤は、CS架橋体のフィルター通過率が60%以上であることが好ましく、70%以上がより好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上が特に好ましい。

【 0 0 7 6 】

本発明の剤に含まれるCS架橋体の濃度は、特に限定されないが、所望の薬効を示す有効濃度であってよく、0.01~20重量%、0.1~15重量%、0.3~10重量%が例示される。

10

【 0 0 7 7 】

< 適用対象 >

本発明の剤の適用対象は、哺乳動物が好ましい。哺乳動物としては、特に限定されないが、ヒト、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット、マウスなどが例示される。本発明の剤は、ヒト又は動物用の医薬にすることができ、ヒト用の医薬とすることが好ましい。

【 0 0 7 8 】

< 用法及び用量 >

本発明の剤の投与量は、患者の症状の軽重、年令、体重、医師の判断などに応じて適宜変えることができる。

20

本発明の剤の1日当たりの投与回数、及び投与期間は、特に限定されない。1日当たりの投与回数としては、例えば、1~8回、1~6回、1~4回、1~3回、1又は2回等が挙げられ、「適宜増減可能」としてもよい。投与期間としては、特に限定されないが、例えば、1週間~数ヶ月が挙げられる。また、連日投与が好ましい。また、点眼剤としては、1回1~2滴、又は1回1~3滴の点眼が例示される。したがって、1回1~3滴の1日1~8回点眼、1回1~3滴の1日1~6回点眼、1回1~3滴の1日1~4回点眼、1回1~3滴の1日1~3回点眼、1回1~3滴の1日1又は2回点眼が例示され、これらの連日点眼が例示される。

【 0 0 7 9 】

< 本発明の剤の使用方法 >

本発明の剤は、これをヒト又は動物の眼に投与することにより使用することができる。本発明の剤のヒト又は動物の眼への投与は、医学的に許容される態様で行われ、かつ本発明の効果を発揮できるものである限りにおいて特に限定されない。

30

投与の具体的方法も特に限定されず、剤形や製剤形態に応じて適宜投与すればよいが、点眼を好ましく例示することができる。

【 0 0 8 0 】

< 眼疾患の処置方法 >

本発明の処置方法は、本発明の剤、又は本発明のCS架橋体を含有する組成物をヒト又は動物の眼に投与することを含む、眼疾患処置方法である。本発明の処置方法は、前記< 適用対象 >、< 用法及び用量 >、< 本発明の剤の使用方法 >等の説明に従って、同様に実施することができる。

40

【 実施例 】

【 0 0 8 1 】

以下、本発明を実施例及び試験例により具体的に詳説する。しかしながら、これにより本発明の技術的範囲が制限されるべきものではない。なお、特に断りのない限り「%」は質量基準である。また、特に断りのない限り、多価アミン架橋剤、及び縮合剤のモル当量はCSの構成二糖単位に対するモル当量を表し「eq」で示した。

【 0 0 8 2 】

実施例 1

50

CS-NC2N架橋体の製造(A)代表例

CS(CSC、局外規コンドロイチン硫酸ナトリウム、重量平均分子量40,000、生化学工業株式会社)2.00g(二糖単位3.91mmol[二糖単位の平均分子量を511として算出]、1.00eq)を濃度10%となるよう注射用水(WFI)に溶解させ、エタノール(EtOH)20.0mLを混和した。架橋剤としてエタン-1,2-ジアミン・2塩酸塩(NC2N・2HCl、和光純薬工業株式会社)10.4mg(0.0783mmol,0.0200eq)の50%エタノール溶液4.00mLと、縮合剤としてDMT-MM(TRIAZIMOCH、株式会社トクヤマ)86.6mg(0.313mmol,0.0800eq)の50%エタノール溶液4.00mLを順次滴下し、室温にて終夜攪拌した(架橋反応)。10%炭酸ナトリウム水溶液(Na₂CO₃/WFI)20mLを加え、2~4時間激しく攪拌した。50wt%酢酸水溶液(AcOH/WFI)4.0mLで中和した後、塩化ナトリウム(NaCl)2.0gを加え、EtOHを用いて沈殿させた。得られた沈殿をろ取り、90%EtOH200mLで3回、EtOH200mLで2回順次洗浄した。得られた沈殿を、42℃で終夜減圧乾燥することで、CS架橋体(CS-NC2N架橋体、化合物1)を白色粉体として1.81g得た。

【0083】

(B)代表例とは架橋剤の当量が異なる製造例

NC2N・2HClのモル当量を(0.0050,0.0100,0.0150,0.0175,0.0225,0.0250,0.0275eq)、DMT-MMのモル当量を(0.0200,0.0400,0.0600,0.0700,0.0900,0.100,0.110eq)とした以外は、実施例1(A)と同様の方法で、CS架橋体(CS-NC2N架橋体、化合物2~8)を白色粉体として得た(各約1.75g)。

【0084】

実施例2CS-NC2N架橋体の製造(A)10gスケール

CS量を10g、NC2N・2HClのモル当量を0.020eq、DMT-MMのモル当量を0.080eqとした以外は、実施例1(A)と同様の方法で、CS架橋体(CS-NC2N架橋体、化合物9)を白色粉末として8.94g得た。

(B)20gスケール

CS量を20g、NC2N・2HClのモル当量を0.02375eq、DMT-MMのモル当量を0.0950eq、架橋反応時間を3時間46分とした以外は、実施例1(A)と同様の方法で、CS架橋体(CS-NC2N架橋体、化合物10)を白色粉末として19.1g得た。

【0085】

実施例3CS-NC3N架橋体の製造

CS量を1g、架橋剤を1,3-ジアミノプロパン・2塩酸塩(NC3N・2HCl、東京化成工業株式会社)(モル当量は、0.0150,0.0200,0.0300,0.0400eq)、DMT-MMのモル当量を0.0600,0.0800,0.120,0.160eqとした以外は、実施例1(A)と同様の方法で、CS架橋体(CS-NC3N架橋体、化合物11~14)を白色粉末として得た(各約0.84g)。

【0086】

実施例4CS-NC4N架橋体の製造

CS量を4g、架橋剤を1,4-ジアミノブタン・2塩酸塩(NC4N・2HCl、和光純薬工業株式会社)(モル当量は、0.0300,0.0425,0.0450,0.0475eq)、DMT-MMのモル当量を0.120,0.170,0.180,0.190eqとした以外は、実施例1(A)と同様の方法で、CS架橋体(CS-NC4N架橋体、化合物15~18)を白色粉末として得た(各約3.85g)。

【0087】

実施例5CS-NC5N架橋体の製造

CS量を1g、架橋剤を1,5-ジアミノペンタン・2塩酸塩(NC5N・2HCl、東京化成工業株式会社)(モル当量は、0.0250,0.0350,0.0450,0.0550eq)、DMT-MMのモル当量を0.1

10

20

30

40

50

00, 0.140, 0.180, 0.220eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS 架橋体 (CS-NC5N架橋体、化合物 19 ~ 22) を白色粉末として得た(各約0.85g)。

【0088】

実施例 6

CS-NC6N架橋体の製造

CS量を4g、架橋剤を1, 6 - ジアミノヘキサン・2 塩酸塩 (NC6N・2HCl、和光純薬工業株式会社) (モル当量は、0.0400, 0.0525, 0.0550, 0.0575eq)、DMT-MMのモル当量を0.160, 0.210, 0.220, 0.230eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS 架橋体 (CS-NC6N架橋体、化合物 23 ~ 26) を白色粉末として得た(各約3.83g)。

【0089】

実施例 7

CS-NC8N架橋体の製造

CS量を4g、架橋剤を1, 8 - ジアミノオクタン・2 塩酸塩 (NC8N・2HCl、1, 8 - ジアミノオクタン[和光純薬工業株式会社]に、1 N 塩酸を2.00eq分添加して調製した) (モル当量は、0.0500, 0.0650, 0.0700, 0.0725eq)、DMT-MMのモル当量を0.200, 0.260, 0.280, 0.290eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS 架橋体 (CS-NC8N架橋体、化合物 27 ~ 30) を白色粉末として得た(各約3.88g)。

【0090】

実施例 8

CS-NC12N架橋体の製造

CS量を1g、架橋剤を1, 12 - ジアミノドデカン・2 塩酸塩 (NC12N・2HCl、1, 12 - ジアミノドデカン[Sigma-Aldrich社]に、1 N 塩酸を2.00eq分添加して調製した) (モル当量は、0.0550, 0.0700eq)、DMT-MMのモル当量を0.220, 0.280eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS 架橋体 (CS-NC12N架橋体、化合物 31 及び 32) を白色粉末として得た(各約0.82g)。

【0091】

実施例 9

CS-LysEt架橋体の製造

CS量を1g、架橋剤をL-リシンエチルエステル・2 塩酸塩 (LysEt・2HCl、Sigma-Aldrich社) (モル当量は0.0450eq)、DMT-MMのモル当量を0.180eqで固定し、架橋反応時間を2時間、3時間、3時間40分、4時間20分、5時間、5時間50分とした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS 架橋体 (CS-LysEt架橋体、化合物 33 ~ 38) を白色粉末として得た(各約1.04g)。

【0092】

実施例 10

CS-OrnEt架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤をオルニチンエチルエステル・2 塩酸塩 (OrnEt・2HCl、Chem-Impex International社) (モル当量は、0.0200, 0.0300, 0.0325, 0.0350eq)、DMT-MMのモル当量を0.0800, 0.120, 0.130, 0.140eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS 架橋体 (CS-OrnEt架橋体、化合物 39 ~ 42) を白色粉末として得た(各約1.99g)。

【0093】

実施例 11

CS-Spermidine架橋体の製造

CS量を1又は2g、架橋剤をスペルミジン・3 塩酸塩 (Spermidine・3HCl、Sigma-Aldrich社) (モル当量は、0.0100, 0.0200, 0.0220eq)、DMT-MMのモル当量を0.0400, 0.0800, 0.0880eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS 架橋体 (CS-Spermidine架橋体、化合物 43, 44 及び 67) を白色粉末として得た(それぞれ約0.77, 0.77, 及び1.75g)。

【0094】

10

20

30

40

50

実施例 A 1CS-triAmine架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤を2 - (アミノメチル) - 2 - メチルプロパン - 1 , 3 - ジアミン・3 塩酸塩 (triAmine・3HCl、Aldrich社) (モル当量は、0.0091, 0.0092, 0.0097eq)、DMT-MMのモル当量を0.0364, 0.0368, 0.0388eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-triAmine架橋体、化合物 4 8 ~ 5 0) を白色粉末として得た (各約1.74 g)。

【 0 0 9 5 】

実施例 A 2CS-NC3(OH)N架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤を1 , 3 - ジアミノ - 2 - プロパノール・2 塩酸塩 (NC3(OH)N・2HCl、1 , 3 - ジアミノ - 2 - プロパノール[Aldrich社]に、1N塩酸を2.00eq分添加して調製した) (モル当量は、0.0220, 0.0240, 0.0260eq)、DMT-MMのモル当量を0.0880, 0.0960, 0.1040eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-NC3(OH)N架橋体、化合物 5 1 ~ 5 3) を白色粉末として得た (各約1.75g)。

【 0 0 9 6 】

実施例 A 3CS-NC4(=)N架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤を (E) - 2 - ブテン - 1 , 4 - ジアミン・2 塩酸塩 (NC4(=)N・2HCl、Small Molecules, Inc.社) (モル当量は、0.0270, 0.0275eq)、DMT-MMのモル当量を0.1080, 0.1100eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-NC4(=)N架橋体、化合物 5 4 及び 5 5) を白色粉末として得た (各約1.80g)。

【 0 0 9 7 】

実施例 A 4CS-Xylylene架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤を1 , 4 - ビス (アミノメチル) ベンゼン・2 塩酸塩 (Xylylene・2HCl、1 , 4 - ビス (アミノメチル) ベンゼン[Aldrich社]に、1N塩酸を2.00eq分添加して調製した) (モル当量は、0.0135, 0.0145, 0.0150eq)、DMT-MMのモル当量を0.0540, 0.0580, 0.0600eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-Xylylene架橋体、化合物 5 6 ~ 5 8) を白色粉末として得た (各約1.77g)。

【 0 0 9 8 】

実施例 A 5CS-Cyclohex架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤を1 , 4 - ビス (アミノメチル) シクロヘキサン・2 塩酸塩 (Cyclohex・2HCl、1 , 4 - ビス (アミノメチル) シクロヘキサン[関東化学社]に、1N塩酸を2.00eq分添加して調製した) (モル当量は、0.0410, 0.0425eq)、DMT-MMのモル当量を0.1640, 0.1700eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-Cyclohex架橋体、化合物 5 9 及び 6 0) を白色粉末として得た (各約1.80g)。

【 0 0 9 9 】

実施例 A 6CS-NC5(S)N架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤を2 , 2' - チオジエタンアミン・2 塩酸塩 (NC5(S)N・2HCl、2 , 2' - チオジエタンアミン[東京化成社]に、1N塩酸を2.00eq分添加して調製した) (モル当量は、0.0170, 0.0180eq)、DMT-MMのモル当量を0.0680, 0.0720eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-NC5(S)N架橋体、化合物 6 1 及び 6 2) を白色粉末として得た (各約1.77g)。

【 0 1 0 0 】

実施例 A 7CS-Glycol(C5)架橋体の製造

CS量を2g、架橋剤を2 , 2' - オキシジエタンアミン・2 塩酸塩 (Glycol(C5)・2HCl

10

20

30

40

50

、和光純薬社) (モル当量は、0.0290, 0.0310eq)、DMT-MMのモル当量を0.1160, 0.1240 eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-Glycol (C5)架橋体、化合物 6 3 及び 6 4) を白色粉末として得た (各約1.76g)。

【 0 1 0 1 】

実施例 A 8

CS-Glycol (C11)架橋体の製造

CS量を 2 g、架橋剤を 1 , 1 1 - ジアミノ - 3 , 6 , 9 - トリオキサウンデカン・2 塩酸塩 (Glycol (C11)・2HCl、1 , 1 1 - ジアミノ - 3 , 6 , 9 - トリオキサウンデカン [東京化成社]に、1N塩酸を2.00eq分添加して調製した) (モル当量は、0.0380, 0.0410eq)、DMT-MMのモル当量を0.1520, 0.1640eqとした以外は、実施例 1 (A)と同様の方法で、CS架橋体 (CS-Glycol (C11)架橋体、化合物 6 5 及び 6 6) を白色粉末として得た (各約1.87g)。

10

【 0 1 0 2 】

比較例 1

CS - NC 1 2 N誘導体 (比較例) の製造

1 , 1 2 - ジアミノドデカンにより修飾されたCS誘導体の粉末を以下の手順で製造した。なお、本製造方法の引用元である文献によれば、同修飾はCSの親水性を低下させることを目的とする。

国際公開第 9 1 / 1 6 8 8 1 号の実施例 5、「A.コンドロイチンの修飾」、及びBiomaterials, 16:473-478, 1995に記載の方法に従い、コンドロイチン硫酸 A (CSA、Sigma-Aldrich社) 1.00g (二糖単位2.18mmol [二糖単位の平均分子量を458として算出]、1.00eq)、1 , 1 2 - ジアミノドデカン・2 塩酸塩 (Sigma-Aldrich社) (モル当量 0 . 3 0、0 . 6 0、0 . 9 0 eq)、及び縮合剤としてジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (モル当量 0 . 6 6、1 . 3 2、1 . 9 8 eq) を使用し、CS誘導体 (「CS - NC 1 2 N誘導体 (比較例)」、化合物 4 5 ~ 4 7) を白色粉末として得た (各約 0 . 4 6 g)。

20

【 0 1 0 3 】

上記実施例及び比較例で製造した化合物の一覧を表 1 ~ 4 に示す。

【 0 1 0 4 】

【表 1】

化合物名	架橋体名	架橋剂	架橋剂当量 (eq)	DMT-MM当量 (eq)
化合物 1	GS-NC2N架橋体 (実施例 1、2)	NC2N·2HCl	0.0200	0.0800
化合物 2			0.0050	0.0200
化合物 3			0.0100	0.0400
化合物 4			0.0150	0.0600
化合物 5			0.0175	0.0700
化合物 6			0.0225	0.0900
化合物 7			0.0250	0.100
化合物 8			0.0275	0.110
化合物 9			0.020	0.080
化合物 10			0.02375	0.0950
化合物 11	GS-NC3N架橋体 (実施例 3)	NC3N·2HCl	0.0150	0.0600
化合物 12			0.0200	0.0800
化合物 13			0.0300	0.120
化合物 14			0.0400	0.160
化合物 15	GS-NC4N架橋体 (実施例 4)	NC4N·2HCl	0.0300	0.120
化合物 16			0.0425	0.170
化合物 17			0.0450	0.180
化合物 18			0.0475	0.190
化合物 19	GS-NC5N架橋体 (実施例 5)	NC5N·2HCl	0.0250	0.100
化合物 20			0.0350	0.140
化合物 21			0.0450	0.180
化合物 22			0.0550	0.220
化合物 23	GS-NC6N架橋体 (実施例 6)	NC6N·2HCl	0.0400	0.160
化合物 24			0.0525	0.210
化合物 25			0.0550	0.220
化合物 26			0.0575	0.230
化合物 27	GS-NC8N架橋体 (実施例 7)	NC8N·2HCl	0.0500	0.200
化合物 28			0.0650	0.260
化合物 29			0.0700	0.280
化合物 30			0.0725	0.290
化合物 31	GS-NC12N架橋体 (実施例 8)	NC12N·2HCl	0.0550	0.220
化合物 32			0.0700	0.280

【0105】

10

20

30

40

【表 2】

化合物名	架橋体名	架橋剤	架橋剤当量 (eq)	DMT-MM当量 (eq)
化合物 3 3 ¹⁾	CS-LysEt架橋体 (実施例 9)	LysEt・2HCl	0.0450	0.180
化合物 3 4 ¹⁾				
化合物 3 5 ¹⁾				
化合物 3 6 ¹⁾				
化合物 3 7 ¹⁾				
化合物 3 8 ¹⁾				
化合物 3 9	CS-OrnEt架橋体 (実施例 10)	OrnEt・2HCl	0.0200	0.0800
化合物 4 0			0.0300	0.120
化合物 4 1			0.0325	0.130
化合物 4 2			0.0350	0.140
化合物 4 3	CS-Spermidine架橋体 (実施例 11)	Spermidine・3HCl	0.0100	0.0400
化合物 4 4			0.0200	0.0800

10

1) 化合物 3 3 ~ 3 8 は、架橋剤当量及びDMT-MM当量を固定し、架橋反応時間をそれぞれ 2時間、3時間、3時間40分、4時間20分、5時間、5時間50分として製造した。

20

【 0 1 0 6 】

【表 3】

化合物名	架橋体名	架橋剤	架橋剤当量 (eq)	DMT-MM当量 (eq)
化合物48	CS-triAmine架橋体 (実施例A1)	triAmine・3HCl	0.0091	0.0364
化合物49			0.0092	0.0368
化合物50			0.0097	0.0388
化合物51	CS-NC3(OH)N架橋体 (実施例A2)	NC3(OH)N・2HCl	0.0220	0.0880
化合物52			0.0240	0.0960
化合物53			0.0260	0.1040
化合物54	CS-NC4(=)N架橋体 (実施例A3)	NC4(=)N・2HCl	0.0270	0.1080
化合物55			0.0275	0.1100
化合物56	CS-Xylylene架橋体 (実施例A4)	Xylylene・2HCl	0.0135	0.0540
化合物57			0.0145	0.0580
化合物58			0.0150	0.0600
化合物59	CS-Cyclohex架橋体 (実施例A5)	Cyclohex・2HCl	0.0410	0.1640
化合物60			0.0425	0.1700
化合物61	CS-NC5(S)N架橋体 (実施例A6)	NC5(S)N・2HCl	0.0170	0.0680
化合物62			0.0180	0.0720
化合物63	CS-Glycol(C5)架橋体 (実施例A7)	Glycol(C5)・HCl	0.0290	0.1160
化合物64			0.0310	0.1240
化合物65	CS-Glycol(C11)架橋体 (実施例A8)	Glycol(C11)・2HCl	0.0380	0.1520
化合物66			0.0410	0.1640
化合物67	CS-Spermidine架橋体 (実施例11)	Spermidine・3HCl	0.0220	0.0880

30

40

【 0 1 0 7 】

【表 4】

化合物名	誘導体名	架橋剤	架橋剤当量 (eq)	DCC当量 (eq)
化合物 4 5	CS-NC12N誘導体	NC12N・2HCl	0.30	0.66
化合物 4 6	(比較例)		0.60	1.32
化合物 4 7	(比較例 1)		0.90	1.98

【 0 1 0 8 】

実施例 1 2 A

分析 (架橋構造の確認)

国際公開第 9 1 / 1 6 8 8 1 号に記載されている方法により製造されたCS-NC12N誘導体を分析したところ、種々の分析法を用いてもCSの架橋は確認されなかった (C. Bourie, et al., J.Biomater.Appl., 12, (1998), 201-221)。そこで、本発明のCS架橋体の架橋を実証するために、本発明のCS架橋体の酵素消化物を液体クロマトグラフィー (HPLC) / 多段階質量分析にて解析した。

< 試験物質 >

CS (CSC、局外規コンドロイチン硫酸ナトリウム、重量平均分子量 40,000、生化学工業株式会社)、CS-NC2N架橋体(化合物 9)を用いた。

< 方法 >

(1) CS、及びCS-NC2N架橋体の酵素消化

CS、及びCS-NC2N架橋体の1% w/v水溶液各 20 μ Lに、50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)-0.1% BSA溶液にて希釈したコンドロイチナーゼABC (C - ABC) (生化学工業株式会社) (50 U/mL) を10 μ L添加した。反応溶液を37、3時間加温後、30秒間の煮沸により反応を停止した。

(2) 酵素消化物のHPLC分析

C - ABC消化液の組成が、水：アセトニトリル = 1 : 1 (v/v)となるよう希釈した(全量200 μ L)溶液を、HPLC (Prominence、島津製作所製) にESI-MS (LCMS-IT-TOF、島津製作所製) を接続したLC-MS装置を用いて分析した。カラムは、TSKgel Amide-80 HR 4.6mmI. D x 250mmを用いた。溶離液は、20mM ギ酸アンモニウム水溶液 (Solvent A) 及びアセトニトリル (Solvent B) により、C-ABC消化液を分析した (Detect: 232nm及びMS)。ESI-MSは、-3.5 kVのインターフェース電圧、200 のCDL温度及びヒートブロック温度にそれぞれセットして操作した。スキャン分子量範囲は、MSでは $m/z = 300 \sim 1500$ 、MSⁿでは $m/z = 50 \sim 2000$ に設定した。

(3) 新規出現ピークの多段階質量分析

LC-MS分析結果により、CS-NC2N架橋体のチャートにのみ検出されたピークに関して、以下の条件で質量分析を実施した。ESI-MSにはnanoESI イオン源 (NES-100; New Objective 製) を接続したLCMS-IT-TOF (島津製作所製) を使用した。上述のHPLC条件により分画したCS-NC2N架橋構造を含む溶液を、減圧化で溶媒留去後、0.5% NH₃含有50% MeOH溶液に溶解した。この溶液を、シリンジポンプを用いて直接注入した。10 μ L/hの流速、-1.5kVのインターフェース電圧、200 のCDL温度及びヒートブロック温度にそれぞれセットして操作した。スキャン分子量範囲は、MSでは $m/z = 1300 \sim 1500$ 、MSⁿでは $m/z = 50 \sim 2000$ に設定した。

【 0 1 0 9 】

< 試験結果 >

C - ABC消化は、CS、CS - NC2N架橋体同様に進行したことを、消化液のHPLCチャートから確認した (図 1)。図 1 中、ピーク A、及び B は、未架橋のCSでは検出されない代表的なピークであり、LC-MSでの解析から、ジアミンに由来する基を有する構造体に由来するピークであることが示唆された。その他、質量電荷比よりジアミンに由来する基を有すると推定された構造について、一覧を表 5 にまとめた。

次に、ジアミンに由来する基による架橋構造を確認するため、ピーク B に関して、多段

10

20

30

40

50

階質量分析を実施した。結果の一例を図2、図3に示した。図2、図3に示されている通り、CSの2つのグルクロン酸とエタン-1,2-ジアミンが、共有結合していると示唆されるピークが検出された。

【0110】

【表5】

m/z	価数	M	組成					理論値	誤差(ppm)
			GalNAc	GlcA	硫酸基	架橋剤	Na		
710.60	2	1423.22	3	3	3	1	1	1423.23	-9.84
524.75	3	1577.27	3	4	3	1	0	1577.28	-3.80
532.08	3	1599.26	3	4	3	1	1	1599.26	1.25
592.44	3	1780.34	4	4	3	1	0	1780.36	-8.43
464.07	4	1860.31	4	4	4	1	0	1860.32	-1.61
660.40	3	1984.22	4	4	5	1	2	1984.24	-5.54
806.12	3	2421.38	5	5	6	1	1	2421.32	26.43

10

【0111】

<結論>

CS-NC2N架橋体の酵素消化液の液体クロマトグラフィー/多段階質量分析により、ジアミンが、確かに2つのグルクロン酸のカルボキシ基と共有結合を形成していることが示された。このことから、本発明のCS架橋体が、架橋構造を有することが実証された。

【0112】

実施例12B

架橋率の測定

実施例1及び2で調製した試料の一部を10mg秤量し、20mM硫酸を1mL添加し、脱気溶解を行った。得られた溶液を60℃で6時間加熱を行った後塩基性にし、エタノール及びプロピレンオキサイドを添加し、60℃で一晩加熱を行った。冷却した溶液を酸性にした後、溶液を減圧乾固させた。そこに内部標準物質としてジミノブタンを加え、更に6M塩酸を加え、得られた溶液を110℃で一晩加熱した。溶液を減圧乾固し、そこにジメチルスルホキシド：水=3：1の溶液を加え、30分間振とうした。得られた液を別容器に分取し、そこにトリエチルアミン、及びイソチオシアン酸フェニル：アセトニトリル=1：9の溶液を加え、良く攪拌した後20分間30℃で加熱した。0.22µmのフィルターを通した後、LC-ESI-MSを用いてポジティブモードで分析した。カラムは、Gemini-NX 3µm C18 2x50mmを用いた。溶離液は、H₂O(SolventA)、MeCN(SolventB)、100mM NH₄HCO₃(pH 10.0 by NH₄OH)(SolventC)により分析した。結果を表6に示した。

20

30

【0113】

【表6】

化合物名	架橋体名	架橋剤当量(eq)	架橋率(%)
化合物2	CS-NC2N架橋体	0.0050	0.064
化合物10		0.02375	0.59
化合物8		0.0275	0.89

【0114】

実施例13

CS架橋体を含有する組成物の調製

次の組成のリン酸緩衝生理食塩水(本明細書において、「PBS」ともいう。)を調製した。

0.065%(w/v)リン酸2水素ナトリウム2水和物、

0.03%(w/v)リン酸水素2ナトリウム12水和物

0.9%(w/v)塩化ナトリウム

実施例1、2、4、6~11、及びA1~A8で製造されたCS架橋体の各種を表7、8及び9に示す濃度になるように前記PBSと混合し、終夜振盪機で振盪することにより、各試料を調製した(試料1~43、試料55~71、及び試料75~77)。その後、

40

50

一部の試料について、600 nmにおける吸光度を紫外可視分光光度計（UV - 1800、（株）島津製作所社製）を用いて測定した。結果を表7、8及び9に示した。

【0115】

比較例2

CSを含有する組成物の調製

CS（CSC[生化学工業株式会社]、及びCSA[Sigma-Aldrich社]）を用いて、実施例13の方法に準じて、表10に示す濃度になるように各試料を調製した（試料47～54）。その後、試料53について、600 nmにおける吸光度を紫外可視分光光度計（UV - 1800、（株）島津製作所社製）を用いて測定した。結果を表10に示した。

【0116】

10

比較例3

CS - NC12N誘導体（比較例）を含有する組成物の調製

比較例1で製造されたCS - NC12N誘導体（比較例）を用いて、実施例13の方法に準じて、表8に示す濃度になるように各試料を調製した（試料44～46、72～74）。その後、各試料について、600 nmにおける吸光度を紫外可視分光光度計（UV - 1800、（株）島津製作所社製）を用いて測定した。結果を表8に示した。

【0117】

実施例14

各試料の粘度測定

実施例13、及び比較例2で調製した試料について、E型回転粘度計（TV - L/H、東機産業社）、標準コーン（CORD-1, 1°34' xR24）を使用して、25 での5 rpm値を測定し粘度（mPa・s）とした。5 rpm値が検出範囲外の場合は、その他回転数から外挿値を算出し、粘度（mPa・s）とした。結果を、表7～10に示した。

20

【0118】

【表 7】

試料番号	化合物	CS架橋体濃度 (w t %)	粘度 (mPa・s)	吸光度 (Abs)	溶状 (澄明/白濁)
試料 1	化合物 2	2.00	7	—	—
試料 2		3.82	18	—	—
試料 3		6.00	58	—	—
試料 4		8.00	132	—	—
試料 5		10.00	274	—	—
試料 6		12.00	493	—	—
試料 7		14.00	936	0.011	澄明
試料 8	化合物 3	2.00	8	—	—
試料 9		4.00	29	—	—
試料 10		6.00	83	—	—
試料 11		8.00	199	—	—
試料 12		10.00	441	—	—
試料 13		12.00	890	0.007	澄明
試料 14	化合物 4	2.00	12	—	—
試料 15		5.00	94	—	—
試料 16		10.00	1245	0.014	澄明
試料 17	化合物 5	2.00	15	—	—
試料 18		5.00	161	—	—
試料 19		10.03	2360	0.013	澄明
試料 20	化合物 1	1.97	32	—	—
試料 21		5.00	367	—	—
試料 22		10.00	3000	0.010	澄明
試料 23	化合物 6	1.00	33	—	—
試料 24		2.03	115	—	—
試料 25		5.00	1306	—	—
試料 26		7.49	4340	0.025	澄明
試料 27	化合物 7	0.50	25	—	—
試料 28		1.00	156	—	—
試料 29		2.00	673	—	—
試料 30		4.00	2880	—	—
試料 31		6.00	8190	0.020	澄明
試料 32	化合物 8	0.50	139	—	—
試料 33		1.00	646	—	—
試料 34		2.00	2800	—	—
試料 35		4.00	10649	0.020	澄明
試料 36	化合物 10	2.00	52	0.009	澄明

— : データなし

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

【表 8】

試料番号	化合物	CS架橋体／誘導体濃度 (wt%)	粘度 (mPa・s)	吸光度 (Abs)	溶状 (澄明/白濁)
試料 3 7	化合物 1 8	8.00	3770	0.025	澄明
試料 3 8	化合物 2 6	8.75	4000	0.033	澄明
試料 3 9	化合物 3 0	8.00	3330	0.018	澄明
試料 4 0	化合物 3 2	5.00	3740	0.014	澄明
試料 4 1	化合物 3 6	7.50	3600	—	—
試料 4 2	化合物 4 2	8.25	3200	0.028	澄明
試料 4 3	化合物 4 4	7.50	3230	—	—
試料 4 4	化合物 4 5	2.00	—	2.923	白濁
試料 4 5	化合物 4 6	2.00	—	2.034	白濁
試料 4 6	化合物 4 7	2.00	—	1.457	白濁
試料 7 2	化合物 4 5	0.40	—	1.352	白濁
試料 7 3	化合物 4 6	0.40	—	0.417	白濁
試料 7 4	化合物 4 7	0.40	—	0.238	白濁

— : データなし

【 0 1 2 0 】

【表 9】

試料番号	化合物	CS架橋体濃度 (wt%)	粘度 (mPa・s)	吸光度 (Abs)	溶状 (澄明/白濁)
試料55	化合物48	2.00	38	0.003	澄明
試料56	化合物49	2.00	60	0.008	澄明
試料57	化合物50	2.00	122	0.001	澄明
試料58	化合物51	2.00	27	0.005	澄明
試料59	化合物52	2.00	62	0.000	澄明
試料60	化合物53	2.00	130	0.002	澄明
試料61	化合物54	2.00	42	0.004	澄明
試料62	化合物55	2.00	98	0.003	澄明
試料63	化合物56	2.00	45	0.001	澄明
試料64	化合物57	2.00	72	0.003	澄明
試料65	化合物58	2.00	191	0.004	澄明
試料66	化合物59	2.00	49	0.002	澄明
試料67	化合物60	2.00	88	0.001	澄明
試料68	化合物61	2.00	44	0.000	澄明
試料69	化合物62	2.00	100	0.001	澄明
試料70	化合物63	2.00	50	0.002	澄明
試料71	化合物64	2.00	123	0.005	澄明
試料75	化合物65	2.00	51	0.002	澄明
試料76	化合物66	2.00	157	0.010	澄明
試料77	化合物67	2.00	85	0.003	澄明

【 0 1 2 1 】

【表 10】

試料番号	化合物	CS濃度 (w t %)	粘度 (mPa・s)	吸光度 (Abs)	溶状 (澄明/白濁)
試料 4 7	CS	2.00	5	—	—
試料 4 8		4.00	18	—	—
試料 4 9		6.00	47	—	—
試料 5 0		8.00	100	—	—
試料 5 1		10.00	200	—	—
試料 5 2		12.49	423	—	—
試料 5 3		14.99	822	0.002	澄明
試料 5 4	GSA	2.00	—	—	—

10

— : データなし

【 0 1 2 2 】

< 結論 >

上記試料 7、13、16、19、22、26、31、35～40、42、53、55～71、及び 75～77 の溶状は澄明であり、これらは水溶液であることが確認された。また、高濃度組成物の溶状が澄明であれば、これより低濃度の組成物の溶状も澄明であると考えられる。なお、試料 1～43、47～71、及び 75～77 は、目視によっても澄明（ここでいう「澄明」とは、組成物が澄みきっていることを意味する）であることが確認された。一方、CS - NC 1 2 N 誘導体（比較例）（化合物 45～47）を含有する組成物の溶状は白濁であり、同組成物は水溶液ではなかった。

20

【 0 1 2 3 】

実施例 1 5

フィルター通過性試験

実施例 1 3 で調製された試料のうち、一部の試料を、多孔質フィルター（孔径 5 . 0 μ m、直径 2 5 mm、Millex（登録商標） SV 5.00 μ m（Millipore Ireland社））を装着した 1mL シリンジ（SS-01T、テルモ社）に充填した。2 5 の条件下、前記試料を 5.3kgf /cm² 以下の圧力でピストンにより押し出し、フィルターを通過させた。フィルター通過前の試料と、0 . 5 mL 以上通過させた後のフィルター通過試料について、D - グルクロノラクトンの 2 0 . 0 μ g / mL 水溶液を標準品として、カルバゾール硫酸法により CS 濃度を測定した。この数値から通過前の CS 濃度に対する通過後の CS 濃度の割合を計算し、フィルター通過率を算出した。結果を表 1 1 に示した。

30

【 0 1 2 4 】

【表 1 1】

試料番号	化合物	CS架橋体濃度 (wt%)	粘度 (mPa・s)	通過率 (%)
試料36	化合物10	2.00	52	99
試料22	化合物1	10.00	3000	96
試料26	化合物6	7.49	4340	97
試料31	化合物7	6.00	8190	99
試料35	化合物8	4.00	10649	95
試料30	化合物7	4.00	2880	>99
試料34	化合物8	2.00	2800	89
試料55	化合物48	2.00	38	>99
試料56	化合物49	2.00	60	>99
試料57	化合物50	2.00	122	98
試料58	化合物51	2.00	27	>99
試料59	化合物52	2.00	62	98
試料60	化合物53	2.00	130	97
試料61	化合物54	2.00	42	99
試料62	化合物55	2.00	98	98
試料63	化合物56	2.00	45	>99
試料64	化合物57	2.00	72	>99
試料65	化合物58	2.00	191	96
試料66	化合物59	2.00	49	>99
試料67	化合物60	2.00	88	>99
試料68	化合物61	2.00	44	95
試料69	化合物62	2.00	100	>99
試料70	化合物63	2.00	50	96
試料71	化合物64	2.00	123	>99
試料75	化合物65	2.00	51	>99
試料76	化合物66	2.00	157	99
試料77	化合物67	2.00	85	>99

10

20

【 0 1 2 5 】

< 結論 >

以上の結果から、今回調製された試料のフィルター通過率は80%以上になることが分かった。

【 0 1 2 6 】

実施例 1 6

CS架橋体の角膜上皮障害治癒促進作用の検証(1)

SDラット(日本チャールス・リバー株式会社)を用い、Fujiharaらの方法(Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42(1):96-100(2001))に準じ、ドライアイモデルを作製した。モデル作製後、試験物質を点眼し、角膜上皮障害治癒促進作用を検証した。

40

< 試験物質 >

CS(CSC、局外規コンドロイチン硫酸ナトリウム、重量平均分子量40,000、生化学工業株式会社)、化合物10、化合物18、又は化合物42を、CS架橋体の濃度が2%になるようにPBSと混合し、終夜振盪機で振盪することにより、試験物質を調製した。試験物質として、2%CS、2%CS-NC2N架橋体、2%CS-NC4N架橋体、及び2%CS-Ornet架橋体を使用し、対照としてPBSを使用した。

< 方法 >

(1)ドライアイモデルの作製

SDラットを用いて、イソフルランによる吸入麻酔下で両眼の眼窩外涙腺を摘出し、ドライアイモデルを作製した。

50

(2) 試験物質の点眼

モデル作製から約8週後に、角膜上皮の障害部分をフルオレセインにて染色した。角膜上皮の上部、中間部、及び下部のそれぞれについて、フルオレセインによる染色の程度を下記の基準に従ってスコア判定し、上記各部のスコアの合計値を算出した。両眼の平均スコアが5以上の個体に対して、試験物質を各眼5 μ Lずつ1日2回3週間点眼した。コントロールとしてPBSを用い、上記と同じ操作を行った。

< 判定基準 >

- 0 : 点染色がない
- 1 : 疎 (点状のフルオレセイン染色が離れている)
- 2 : 中間 (1と3の中間)
- 3 : 密 (点状のフルオレセイン染色が隣接)

10

(3) 角膜上皮障害治癒作用の評価

点眼開始1、2、3週間後に、(2)に記載した方法で角膜上皮障害のスコアを評価した。

(4) 統計解析方法

点眼開始1、2、3週間後のスコアの平均値を用いて、PBSと各試験物質との平均値の差をt検定で解析し、有意水準は両側5%とした。

【0127】

< 試験結果 >

点眼開始1、2、3週後のスコアの推移及び平均値を表12及び図4に示した。2%CS-NC2N架橋体、2%CS-NC4N架橋体、及び2%CS-OrnEt架橋体は、PBSに対して有意な角膜上皮障害治癒促進作用を示した。また、2%CS-NC2N架橋体、及び2%CS-NC4N架橋体は、2%CSに対して有意な角膜上皮障害治癒促進作用を示した。

20

【0128】

【表12】

	PBS	2% CS	2%CS-NC2N	2%CS-NC4N	2%CS-OrnEt
点眼前	6.8 \pm 0.5	6.2 \pm 0.4	6.6 \pm 0.5	6.4 \pm 0.4	6.6 \pm 0.4
1週後	5.0 \pm 0.7	5.1 \pm 0.5	4.0 \pm 0.9	4.8 \pm 0.4	5.1 \pm 0.7
2週後	5.6 \pm 0.5	4.7 \pm 0.5	3.1 \pm 0.7	3.2 \pm 0.4	4.0 \pm 0.6
3週後	5.5 \pm 0.5	5.2 \pm 0.4	3.2 \pm 0.5	3.6 \pm 0.6	3.2 \pm 0.4
n数	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10

30

平均値 \pm 標準誤差

【0129】

実施例17

CS架橋体の角膜上皮障害治癒促進作用の検証(2)

実施例16の方法に準じ、角膜上皮障害治癒促進作用を検証した。

< 試験物質 >

化合物49、又は化合物52を、CS架橋体の濃度が2%になるようにPBSと混合し、終夜振盪機で振盪することにより、試験物質を調製した。試験物質として、2%CS-triAmine架橋体、及び2%CS-NC3(OH)N架橋体を使用し、対照としてPBSを使用した(実施例17A)。

40

また、化合物55、又は化合物60についても同様にPBSと混合し、試験物質を調製した。試験物質として、2%CS-NC4(=)N架橋体、及び2%CS-Cyclohex架橋体を使用し、対照としてPBSを使用した(実施例17B)。

【0130】

< 試験結果 >

点眼開始1、2、3週後のスコアの推移及び平均値を表13及び図5(実施例17A)、並びに表14及び図6(実施例17B)に示した。2%CS-triAmine架橋体

50

、2%CS-NC3(OH)N架橋体、2%CS-NC4(=)N架橋体、及び2%CS-Cyclohex架橋体は、PBSに対して有意な角膜上皮障害治癒促進作用を示した。

【0131】

【表13】

	PBS	2% CS-triAmine	2% CS-NC3(OH)N
点眼前	7.0±0.8	6.9±0.6	7.4±0.8
1週後	6.0±0.8	4.0±0.6	6.3±0.6
2週後	5.4±0.3	4.1±0.8	3.8±0.8
3週後	5.2±0.5	3.6±0.8	2.5±0.3
n数	n=10	n=10	n=10

平均値±標準誤差

【0132】

【表14】

	PBS	2% CS-NC4(=)N	2% CS-Cyclohex
点眼前	6.7±0.5	6.7±0.4	6.7±0.5
1週後	5.9±0.6	4.0±0.4	4.1±0.3
2週後	5.7±0.8	4.6±0.8	4.1±0.4
3週後	6.4±0.8	3.4±0.7	4.5±0.6
n数	n=10	n=10	n=10

平均値±標準誤差

【0133】

実施例18

CS架橋体の角膜上皮障害治癒促進作用の検証(3)

実施例16の方法に準じ、角膜上皮障害治癒促進作用を検証した。

<試験物質>

化合物26、化合物62、化合物64、化合物66、又は化合物67を、CS架橋体の濃度が2%になるようにPBSと混合し、終夜振盪機で振盪することにより、試験物質を調製した。試験物質として2%CS-NC6N架橋体、2%CS-NC5(S)N架橋体、2%CS-Glycol(C5)架橋体、2%CS-Glycol(C11)架橋体、及び2%CS-Spermidine架橋体を使用し、対照としてPBSを使用した(実施例18A~D)。

【0134】

<試験結果>

点眼開始1、2、3週後のスコアの推移及び平均値を表15及び図7(実施例18A)、表16及び図8(実施例18B)、表17及び図9(実施例18C)、並びに表18及び図10(実施例18D)に示した。2%CS-NC6N架橋体、2%CS-NC5(S)N架橋体、2%CS-Glycol(C5)架橋体、2%CS-Glycol(C11)架橋体、及び2%CS-Spermidine架橋体は、PBSに対して有意な角膜上皮障害治癒促進作用を示した。2%CS-Glycol(C11)架橋体の点眼開始1、2、3週後のスコア平均値は、2%CS-Glycol(C5)架橋体に比べ低い値を示し、主鎖の酸素原子の数が多いほど、強い角膜上皮障害治癒促進作用を有することが示された。

【0135】

10

20

30

40

【表 1 5】

	PBS	2% CS-NC6N
点眼前	5.7±0.3	5.8±0.3
1 週後	4.9±0.4	3.8±0.5
2 週後	5.2±0.3	3.9±0.4
3 週後	5.1±0.3	4.4±0.3
n 数	n=10	n=10

平均値±標準誤差

【 0 1 3 6 】

10

【表 1 6】

	PBS	2% CS-Glycol(C5)	2% CS-Glycol(C11)
点眼前	5.8±0.2	5.7±0.2	5.3±0.3
1 週後	5.6±0.2	5.0±0.3	4.7±0.4
2 週後	5.4±0.2	4.8±0.3	4.3±0.4
3 週後	5.6±0.2	5.0±0.2	4.3±0.2
n 数	n=10	n=10	n=6

平均値±標準誤差

20

【 0 1 3 7 】

【表 1 7】

	PBS	2% CS-NC5(S)N
点眼前	6.1±0.3	6.1±0.3
1 週後	5.5±0.3	4.7±0.3
2 週後	4.8±0.2	4.0±0.3
3 週後	5.3±0.4	4.1±0.2
n 数	n=10	n=10

平均値±標準誤差

30

【 0 1 3 8 】

【表 1 8】

	PBS	2% CS-Spermidine
点眼前	6.7±0.2	6.8±0.3
1 週後	5.8±0.2	5.5±0.3
2 週後	6.4±0.3	5.3±0.3
3 週後	6.0±0.4	5.1±0.4
n 数	n=10	n=10

平均値±標準誤差

40

【 0 1 3 9 】

< 結論 >

以上より、本発明のCS架橋体が、眼疾患処置剤、特に、角膜上皮障害治療剤、及び/又はドライアイ治療剤として使用できることが示された。

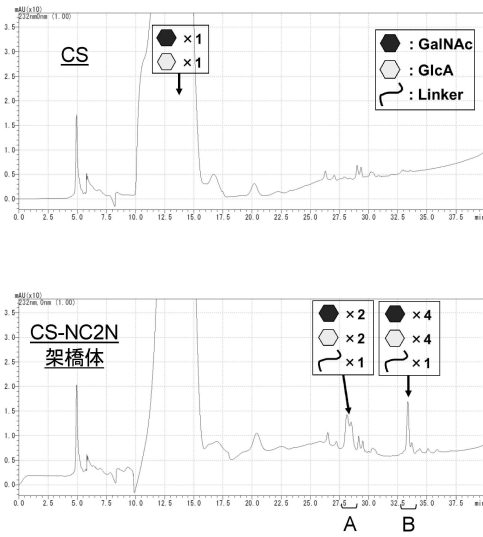
【産業上の利用可能性】

【 0 1 4 0 】

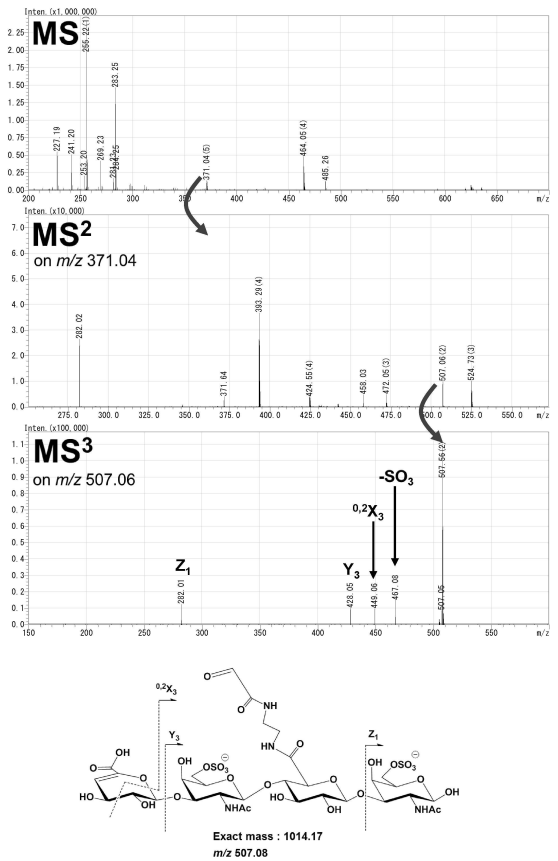
本発明のCS架橋体、及びこれを含む組成物は眼疾患処置剤として、また、本発明の方法は眼疾患の処置方法として、産業上利用することができる。

50

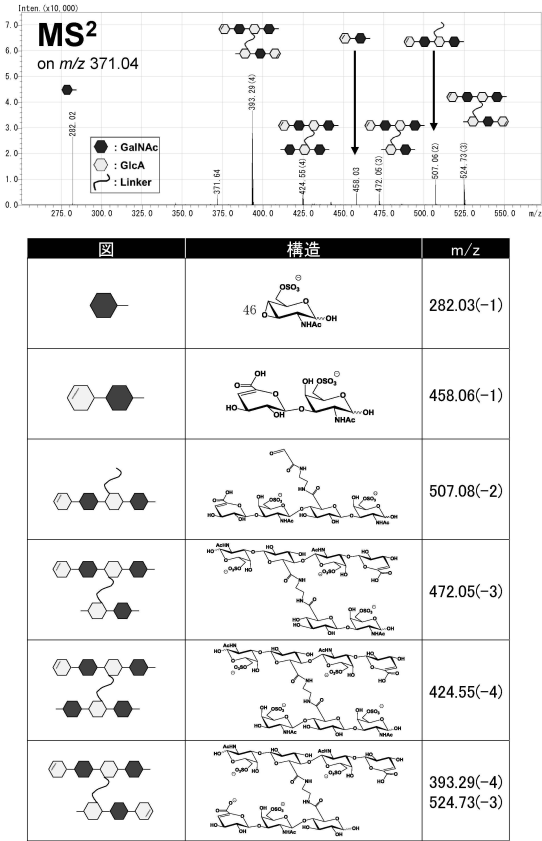
【図1】



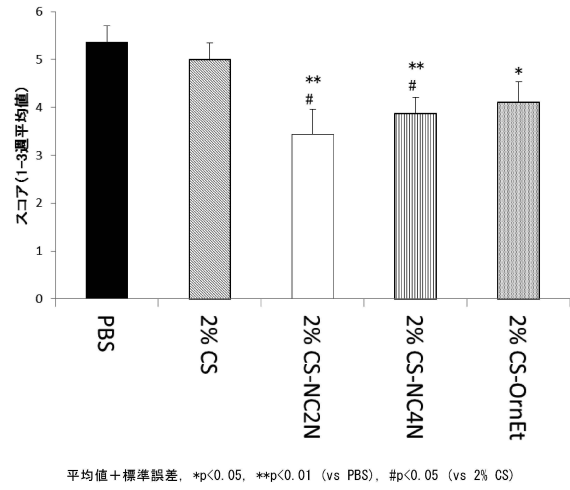
【図2】



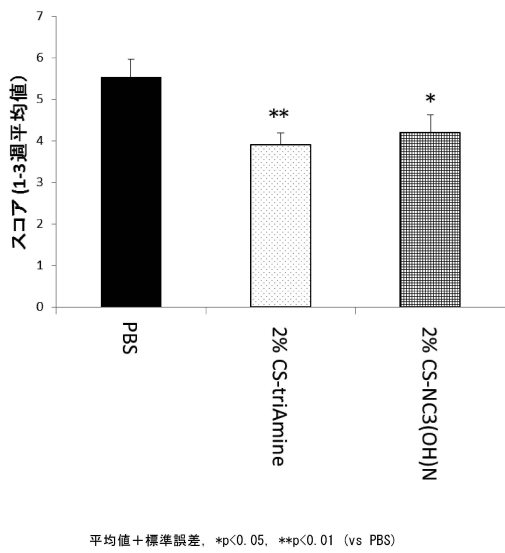
【 図 3 】



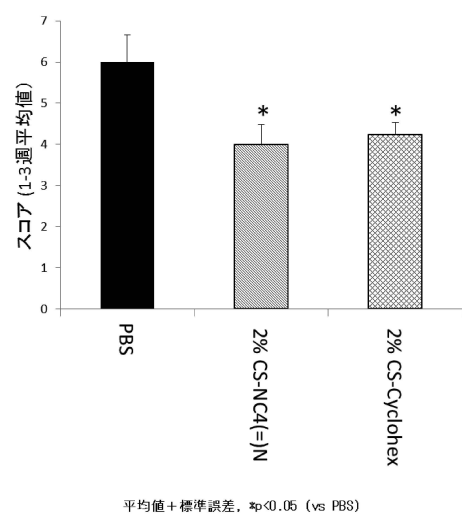
【 図 4 】



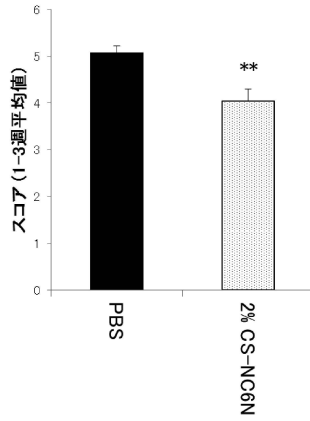
【 図 5 】



【 図 6 】

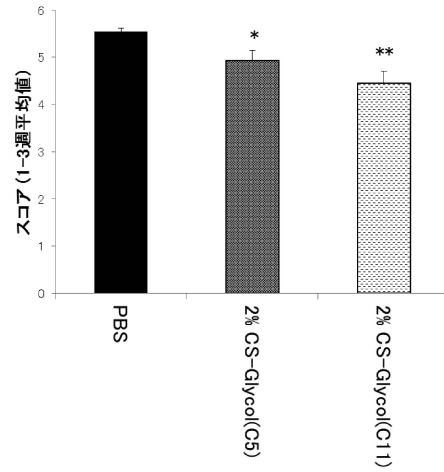


【図7】



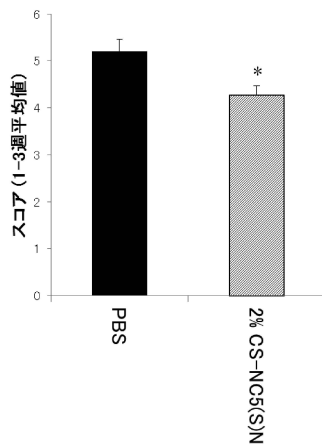
平均値+標準誤差, **p<0.01 (vs PBS)

【図8】



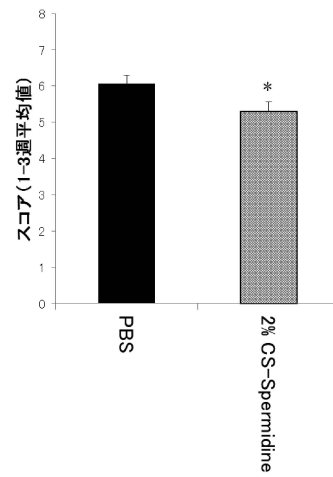
平均値+標準誤差, *p<0.05, **p<0.01 (vs PBS)

【図9】



平均値+標準誤差, *p<0.05 (vs PBS)

【図10】



平均値+標準誤差, *p<0.05 (vs PBS)

フロントページの続き

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 国際公開第91/016881(WO, A1)

特開2000-319194(JP, A)

特開平9-136832(JP, A)

特開平7-223966(JP, A)

SINTOV, A. et al., "Cross-linked chondroitin sulphate: characterization for drug delivery purposes", *Biomaterials*, 1995年 4月, Vol.16, No.6, P.473-478, ISSN 0142-9612

RUBINSTEIN, A. et al., "Chondroitin sulfate: A potential biodegradable carrier for colon-specific drug delivery", *Int. J. Pharm.*, 1992年 7月31日, Vol.84, No.2, P.141-150, ISSN 0378-5173

LIMBERG, M.B. et al., "Topical Application of Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate in the Treatment of Dry Eyes", *Am. J. Ophthalmol.*, 1987年 2月, Vol.103, No.2, P.194-197, ISSN 0002-9394

岡野裕, "特集 シェーグレン症候群の新しい話題 V. 治療", *Prog. Med.*, 2002年 1月, Vol.22, No.1, P.57-62, ISSN 0287-3648

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/737

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)