

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7129112号
(P7129112)

(45)発行日 令和4年9月1日(2022.9.1)

(24)登録日 令和4年8月24日(2022.8.24)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 8 G	81/02 (2006.01)	C 0 8 G	81/02
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 K	31/80 (2006.01)	A 6 1 K	31/80

請求項の数 10 (全16頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-572698(P2020-572698)	(73)特許権者	512000569 華南理工大学 中華人民共和国広東省広州市天河区五山路381号
(86)(22)出願日	平成30年12月12日(2018.12.12)	(74)代理人	100095407 弁理士 木村 満
(65)公表番号	特表2021-529237(P2021-529237 A)	(74)代理人	100132883 弁理士 森川 泰司
(43)公表日	令和3年10月28日(2021.10.28)	(74)代理人	100148633 弁理士 桜田 圭
(86)国際出願番号	PCT/CN2018/120505	(74)代理人	100147924 弁理士 美恵 英樹
(87)国際公開番号	WO2020/000916	(72)発明者	任 力 中華人民共和国 510640 広東省広州市天河区五山路381号
(87)国際公開日	令和2年1月2日(2020.1.2)		
審査請求日	令和3年1月19日(2021.1.19)		
(31)優先権主張番号	201810687134.3		
(32)優先日	平成30年6月28日(2018.6.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒアルロン酸に基づく両性イオンポリマーブラシ、その製造方法並びにそれを含む骨関節炎を治療するための薬物、軟骨修復材料のバイオニック潤滑剤及び軟骨修復材料の摩擦性

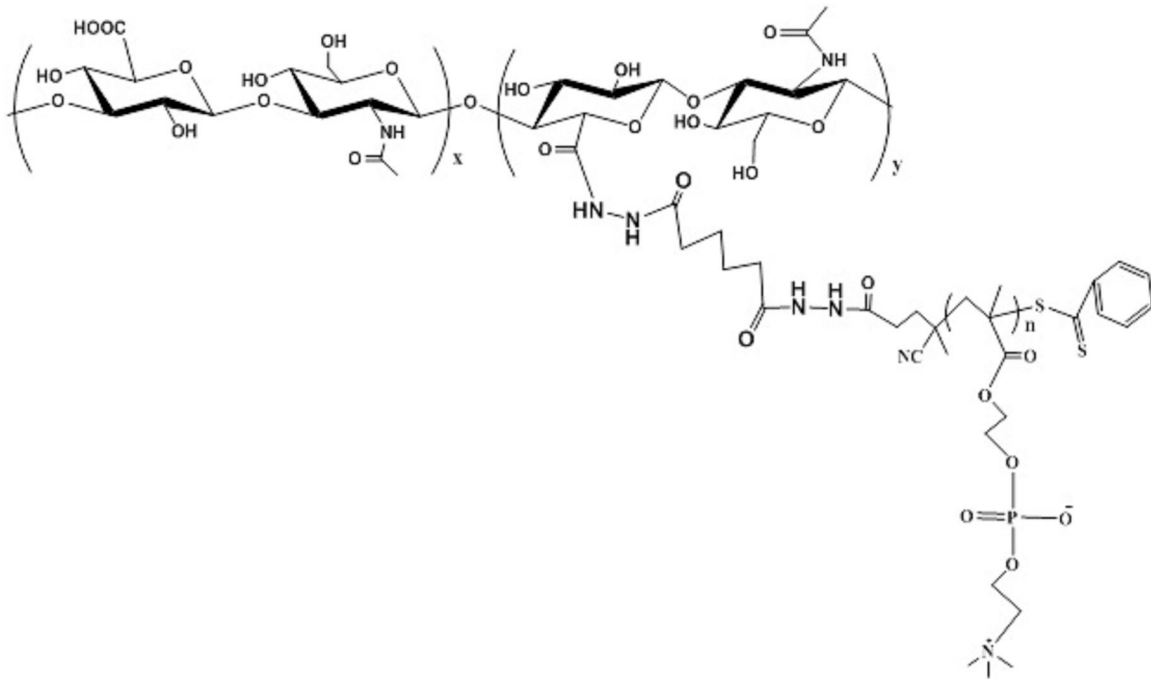
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式1の構造を有し、

ここで、nは60～150の整数であり、ここで、xは589～686の整数であり、yは125～230の整数であることを特徴とするヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシ。

【化 1】



式 1

【請求項 2】

下記のステップ(1)～(3)を含むことを特徴とする請求項1に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

ステップ(1)ヒアルロン酸とアジピン酸ジヒドラジドを反応させ、アミノ修飾ヒアルロン酸を得る。

ステップ(2)2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンは重合モノマーとし、開始剤と鎖転移剤の作用下で、可逆的付加開裂鎖転移ラジカル重合の後、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)を製造する。

ステップ(3)上記アミノ修飾ヒアルロン酸、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)と活性剤を混合し、水溶液体系中で反応させ、ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシを得る。

【請求項 3】

ステップ(1)の前記反応は、1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩の作用下で行い、反応系のpHは4.7～4.85であり、ステップ(3)の反応系のpH値は5～7であることを特徴とする請求項2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

【請求項 4】

ステップ(1)の前記ヒアルロン酸とアジピン酸ジヒドラジドの質量比は1:4～1:18であり、

ステップ(3)のアミノ修飾ヒアルロン酸と末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)の用量は、アミノ基とカルボキシル基のモル比は1:(1.1～2)である条件を満足させることを特徴とする請求項2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

【請求項 5】

ステップ(2)の前記鎖転移剤は、4-シアノ-4-(フェニルチオホルミルチオ)ペンタン酸であり、

10

20

30

40

50

ステップ(2)の前記開始剤は、4,4'-アゾ(4-シアノ吉草酸)であり、ステップ(3)の前記活性剤は、1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミドEDCおよびN-ヒドロキシスルホスクシンイミドNHSであることを特徴とする、請求項2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

【請求項6】

前記鎖転移剤と前記2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンのモル比は、1:(100~200)であり、前記開始剤と鎖転移剤のモル比は1:(2~10)であり、使用する活性剤EDCとNHSの質量比は1:1~1:2であることを特徴とする請求項5に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

10

【請求項7】

ステップ(2)の前記重合温度は60~70であり、重合時間は6~24時間であり、ステップ(2)の前記重合に使用される溶媒は、エタノール、水、メタノールのうちの一種以上であり、

ステップ(3)の前記反応温度は25~35であり、反応時間は18~36時間であり、

ステップ(1)の前記反応温度は25~35であることを特徴とする請求項2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

20

【請求項8】

請求項1に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシを含む骨関節炎を治療するための薬物。

【請求項9】

請求項1に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシを含む軟骨修復材料のバイオニック潤滑剤。

【請求項10】

請求項1に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシを含む軟骨修復材料の摩擦性能を改善するための修飾材料。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は生物医学の技術分野に属し、特に、ヒアルロン酸に基づく両性イオンポリマーブラシおよびその製造方法と生物医学分野での応用に関する。本発明のポリマーブラシは、骨関節炎の進行を遅らせることと、骨関節炎を治療するための薬物を製造することに特に適し、関節などのインプラントからの摩擦粉の生成や引き起こされる関連疾患の状況を改善する潤滑剤であり、そして軟骨修復材料と結合し、そしてその摩擦力学的特性を改善し、より良い修復効果を達成することができる。

【背景技術】

【0002】

関節軟骨は、可動関節の骨の末端を包む特殊な結合組織の層であり、その主な機能には、衝撃吸収と潤滑の提供を含む。しかし、無血管、無神経、無免疫細胞などの特徴により、一旦外部の機械的刺激などの要素で損傷すると、自然に修復することが難しく、軟骨機能の低下、さらには喪失することにより、さまざまな関節疾患を引き起こす。天然関節滑膜液の主成分には、ヒアルロン酸、タンパク質(主にアルブミンとγ-グロブリン)、ルブリシン、アグリカン、リン脂質が含まれる。剪断作用下で、天然関節滑膜液の主成分は自己組織化を起こし、ヒアルロン酸を主鎖とし、ルブリシンとアグリカンを側鎖とするポトルブラシのような構造の高分子に組み合わせられ、この高分子はコネキシンを介して軟骨表面に結合し、さらにリン脂質と組み合わせられ、関節の可動中に境界潤滑剤として作用して、軟骨間の摩擦を効果的に低減し、人間の健康的な生活を保証する。骨関節炎は、摩擦

40

50

変性関節炎とも呼ばれ、軟骨変性による軟骨潤滑性の低下によって引き起こされる典型的な関節疾患であり、非常に高い発病率を示し、関連する調査によると、55歳以上の場合、発病率は80%まで達する。骨関節炎の主な臨床症状は、関節の痛み、こわばり、軟骨の局所の変質、摩耗、可動制限、さらには重度の機能障害である。摩耗によって生成された摩耗粉は、軟骨分解に関連する経路を活性化し、たとえば、軟骨マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテイナーゼ13の分泌が上昇し、軟骨の破壊と劣化がさらに加速し、軟骨の摩耗が激しくなり、さらに多くの摩耗粉が発生し、悪循環を引き起こす。

【0003】

軟骨の潤滑性を改善し、軟骨摩耗粉の発生を減らし、骨関節炎の病理進行を遅らせ、さらに骨関節炎の治療目的を達成するために、国内外の多くの研究グループがバイオニック潤滑に関する研究を行ってきた。しかし、現在の研究の多くは、関節滑膜液中の単一成分、例えば、ルブリシン、アグリカンなどのバイオニック構造上に対して焦点を合わせ、一方で、前記で形成されたヒアルロン酸を主鎖とし、ルブリシンまたはアグリカンを側鎖とするボトルブラシ状の高分子が、優れた軟骨潤滑性を実現する作用があることを十分に理解されておらず、また一方、製造されたバイオニック潤滑剤は、軟骨表面に効果的に結合できないか、あるいは結合方法が破壊的または不安定である。この背景のもと、このボトルブラシ状の高分子に基づくバイオニック潤滑剤を設計合成する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記従来技術の欠点と欠陥を克服するため、本発明の主な目的は、ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン(MPC)に基づく両性イオンポリマーブラシを提供することである。

20

【0005】

本発明の別の目的は、上記のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法を提供することである。

【0006】

本発明のさらに別の目的は、上記のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの生物医学分野での応用を提供することであり、骨関節炎を治療するための薬物および、またはプロテアーゼの潤滑摩擦性能を改善するための潤滑剤の製造に特に適し、あるいは、軟骨修復材料を変更するために使用し、摩擦力学的特性を改善する。

30

【課題を解決するための手段】

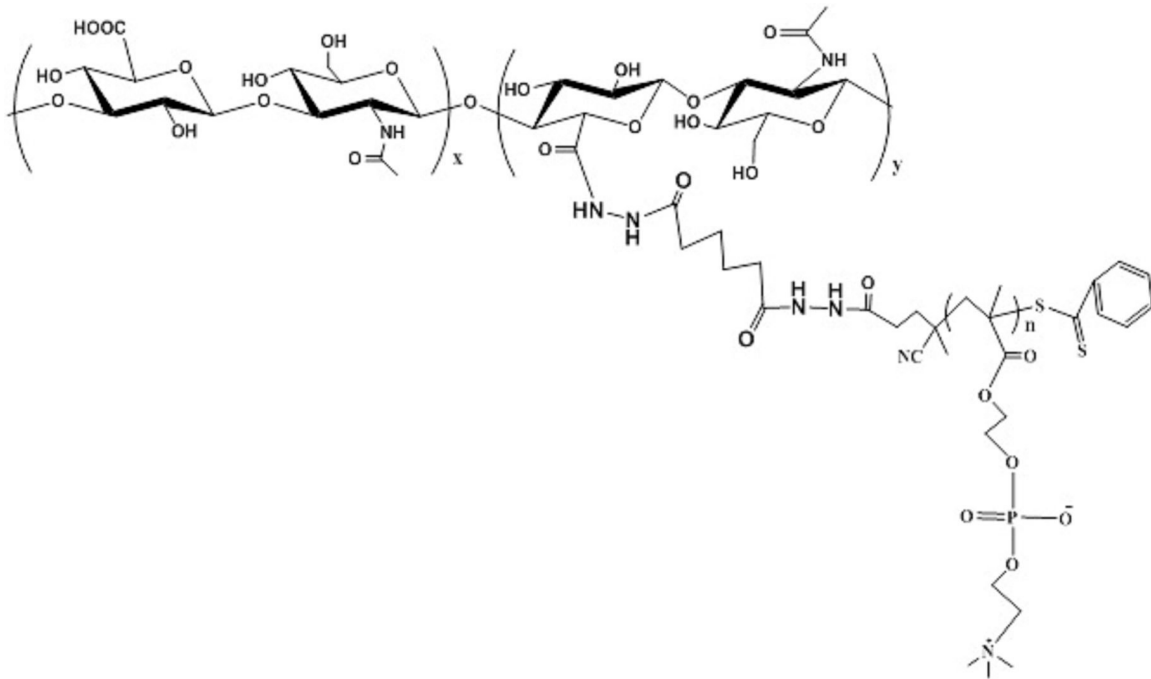
【0007】

本発明の目的は、以下の手段を通じて実現し、
ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシは、以下の式1に示す構造を有し、

40

50

【化 1】



式 1

ここで、 n は60～150の整数であり、ここで、 x は589～686の整数であり、 y は125～230の整数である。

【0008】

前記ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法は、以下のステップを含む。

ステップ(1)ヒアルロン酸とアジピン酸ジヒドラジドを反応させ、アミノ修飾ヒアルロン酸(HA-ADH)を得る。

ステップ(2)2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンは重合モノマーとし、開始剤と鎖転移剤の作用下で、可逆的付加開裂鎖転移ラジカル重合の後、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)(PMPC)を製造する。

ステップ(3)上記アミノ修飾ヒアルロン酸HA-ADH、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)PMPCと活性剤を混合し、水溶液体系中で反応させ、ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシを得る。

【0009】

ステップ(1)の前記反応は、1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩の作用下で行われ、

ステップ(1)の前記反応の温度は25～35であり、反応系のpHは好ましくは4.7～4.85である。前記反応は、反応系のpH値が変化しなくなるまで反応することが好ましい。

【0010】

ステップ(1)の前記ヒアルロン酸とアジピン酸ジヒドラジドの用量は任意の比率であり得、質量比は好ましくは1:4～1:18である。

【0011】

ステップ(2)の前記鎖転移剤は、好ましくは、4-シアノ-4-(フェニルチオホルミルチオ)ペンタン酸(CTP)であり、前記2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンPMPCとCTPのモル比は、好ましくは100:1～200:1である。

【0012】

ステップ(2)の前記開始剤は、好ましくは4,4'-アゾ(4-シアノ吉草酸)(AC

10

20

30

40

50

V A) であり、前記 A C V A と C T P のモル比は 1 : (2 ~ 1 0) であり、好ましくは 1 : 2 である。

【 0 0 1 3 】

ステップ (2) の前記重合温度は 6 0 ~ 7 0 であり、重合時間は 6 ~ 2 4 時間である。

【 0 0 1 4 】

ステップ (2) の前記重合に使用される溶媒は、エタノール、水、メタノールなどであり、好ましくはメタノールを溶媒として使用する。

【 0 0 1 5 】

ステップ (3) で使用されるアミノ修飾ヒアルロン酸と末端にカルボキシル基を有する P M P C の量は、任意の比率にすることができ、または、構造設計の要件に基づき調整することができ、アミノ基とカルボキシル基のモル比は、好ましくは 1 : (1 . 1 ~ 2) である。

10

【 0 0 1 6 】

ステップ (3) の前記活性剤は、好ましくは 1 - エチル - 3 - [3 - (ジメチルアミノ) プロピル] カルボジイミド (E D C) と N - ヒドロキシルホスホスチンイミド (N H S) であり、使用する活性剤 E D C と N H S の質量比は、好ましくは 1 : 1 ~ 1 : 2 であり、ステップ (3) の前記反応温度は 2 5 ~ 3 5 であり、反応時間は 1 8 ~ 3 6 時間であり、反応条件は、より好ましくは、 3 0 のもとで 2 4 時間の反応である。

【 0 0 1 7 】

ステップ (3) の反応系の p H 値は 5 ~ 7 であり、好ましくは p H 値 5 . 5 ~ 6 である。

20

【 発明の効果 】

【 0 0 1 8 】

本発明のヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシは、天然の関節髄膜液の成分に基づき剪断作用下で組み合わせ形成されたボトルブラシ状高分子のバイオンック潤滑剤であり、潤滑を改善する効果があり、ヒアルロン酸と単一の滑膜液成分に対するバイオンック潤滑剤の欠点を克服するだけでなく、また、自然の軟骨で重要な役割を果たすボトルブラシ状高分子構造および成分におけるバイオンクスを実現し、より優れた潤滑効果を達成し、したがって、生物医学の分野で応用でき、骨関節炎を治療するための薬物を製造するのに特に適し、関節などのインプラントの潤滑および摩擦特性を改善する潤滑剤であり、そして軟骨修復材料と結合し、その摩擦力学的特性を改善できる。

30

【 0 0 1 9 】

本発明の両性イオンポリマーブラシは、バイオンック潤滑剤として使用する。

【 0 0 2 0 】

本発明は従来技術と比較して、以下の利点および有益な効果を有する。

【 0 0 2 1 】

(1) 本発明は、ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法で、簡単なルート、便利な操作、簡単な精製、高収率などの利点がある。

【 0 0 2 2 】

(2) 本発明は、ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシが、自然の関節に形成された主鎖としてヒアルロン酸を用いたボトルブラシ状の複合構造高分子のバイオンクスであり、単一成分のバイオンクスではなく、さらに優れた潤滑効果を有する。

40

【 0 0 2 3 】

(3) 本発明は、ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシは、選択的に軟骨のタンパク質と結合し、軟骨と結合の方法は自然で無害である。

【 0 0 2 4 】

(4) 本発明は、ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両

50

性イオンポリマーブラシは、骨関節炎の病理進行を緩和するために現在臨床的に使用されているヒアルロン酸よりも、さらに優れた治療効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1-(1)】両性イオンポリマーブラシの合成経路模式図であり、アジピン酸ジヒドラジド修飾ヒアルロン酸の反応模式図である。

【図1-(2)】両性イオンポリマーブラシの合成経路模式図であり、2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンの重合反応図である。

【図1-(3)】両性イオンポリマーブラシの合成経路模式図であり、両性イオンポリマーブラシの製造反応図である。

10

【図2-(1)】実施形態1で得られた両性イオンポリマーブラシのNMRスペクトルであり、図のHPMは、両性イオンポリマーブラシで、PMP Cは、末端にカルボキシル基を持つポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)で、HA-ADHは、アミノ修飾ヒアルロン酸である。

【図2-(2)】実施形態1で得られた両性イオンポリマーブラシの赤外線スペクトルであり、図のHPMは、両性イオンポリマーブラシで、PMP Cは、末端にカルボキシル基を持つポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)で、HA-ADHは、アミノ修飾ヒアルロン酸である。

【図3】実施形態1で得られた両性イオンポリマーブラシの潤滑効果であり、HPMは両性イオンポリマーブラシであり、HAはヒアルロン酸である。

20

【図4】実施形態1で得られた骨関節炎の緩和に対する両性イオンポリマーブラシの効果図である(スケールバーは500 μ m)。

【発明を実施するための形態】

【0026】

以下、実施形態と図面と併せて本発明に対しさらに詳細に説明されるが、本発明の実施方式はこれらに限定されない。以下の実施形態の試薬はすべて市販されている。

【0027】

本発明のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの合成路線模式図は図1に示し、ここで、図1-(1)は、アジピン酸ジヒドラジド修飾ヒアルロン酸の反応模式図であり、1-(2)は2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンの重合反応模式図であり、1-(3)は、両性イオンポリマーブラシの製造反応模式図である。

30

【0028】

[実施例1：ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法]

(1)分子量100~150万のヒアルロン酸100mgを脱イオン水20mLに溶かし、攪拌して溶解し、ヒアルロン酸溶液を得、1.736gのアジピン酸ジヒドラジドをヒアルロン酸溶液と混合し、アジピン酸ジヒドラジドとヒアルロン酸の質量比は17.36:1で、1M塩酸で溶液のpHを4.75に調整し、0.191gの1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド(EDC)を固体として加え、溶液のpHを4.75に調整し続け、30でpH値が変わらなくなるまで反応させ、透析凍結乾燥し、アミノ修飾ヒアルロン酸を得る。

40

【0029】

(2)10gの2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン(MPC)を30mLの無水メタノールに溶解し、37.5mgの4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)(ACVA)を計量し開始剤とし、75mgの4-シアノ-4(フェニルチオホルミルチオ)ペンタン酸(CTP)を鎖転移剤とし、開始剤と鎖転移剤をMPCの無水メタノール溶液に加え、攪拌後溶解後に密封し、氷浴下で、窒素で40分間脱酸する。

【0030】

(3)脱酸素化されたMPC溶液を60に予熱したオイルバスで12時間反応させ、液

50

体窒素クエンチング反応させ、室温に戻った後、1 L アセトンで沈殿させ、上澄みを流し込んだ後、30 で真空乾燥し、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)(PMP C) 7.981 g を得る。

【0031】

(4) ステップ(1)の製品100 mg とステップ(3)の製品2 g を脱イオン水に溶解し、溶液のpHを5.5に調整し、30 で、pH = 5.5で24時間反応させたEDC/NHS 60 mg (1:1、モル比)を加え、前記アミノ修飾ヒアルロン酸と末端にカルボキシル基を有するPMP Cのアミノ基とカルボキシル基のモル比は1:1.5であり、反応終了後、透析凍結乾燥し、ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシ154.1 mg を得る。

10

【0032】

図2は実施形態1で得られた両性イオンポリマーブラシのNMRスペクトル2-(1)と赤外線スペクトル2-(2)である。

【0033】

[実施例2:ヒアルロン酸と2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸に基づくアニオン性ポリマーブラシの製造]

(1) 分子量100~150万のヒアルロン酸100 mg を脱イオン水20 mL に溶かし、攪拌して溶解し、ヒアルロン酸溶液を得、435.4 mg のアジピン酸ジヒドラジドをヒアルロン酸溶液と混合し、アジピン酸ジヒドラジドとヒアルロン酸の質量比は4.35:1で、1 M 塩酸で溶液のpHを4.8に調整し、30 mg の1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド(EDC)を固体として加え、溶液のpHを4.8に調整し続け、30 でpH値が変わらなくなるまで反応させ、透析凍結乾燥し、アミノ修飾ヒアルロン酸を得る。

20

【0034】

(2) 2 g の2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン(MPC)を6 mL の無水メタノールに溶解し、7.5 mg の4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)(ACVA)を計量し開始剤とし、15 mg の4-シアノ-4(フェニルチオホルミルチオ)ペンタン酸(CTP)を鎖転移剤とし、開始剤と鎖転移剤をMPCの無水メタノール溶液に加え、攪拌後溶解後に密封し、氷浴下で、窒素で30分間脱酸する。

【0035】

(3) 脱酸素化されたMPC溶液を60 に予熱したオイルバスで12時間反応させ、液体窒素クエンチング反応させ、室温に戻った後、300 mL アセトンで沈殿させ、上澄みを流し込んだ後、30 で真空乾燥し、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)(PMP C) 1.535 g を得る。

30

【0036】

(4) ステップ(1)の製品50 mg とステップ(3)の製品1 g を脱イオン水に溶解し、溶液のpHを5.5に調整し、30 で、pH = 5.5で24時間反応させたEDC/NHS 60 mg (1:1、モル比)を加え、前記アミノ修飾ヒアルロン酸と末端にカルボキシル基を有するPMP Cのアミノ基とカルボキシル基のモル比は1:1.5とし、反応終了後、透析凍結乾燥し、ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシ83.5 mg を得る。

40

【0037】

[実施例3:ヒアルロン酸と2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸に基づくアニオン性ポリマーブラシの製造]

(1) 分子量100~150万のヒアルロン酸100 mg を脱イオン水20 mL に溶かし、攪拌して溶解し、ヒアルロン酸溶液を得、868 mg のアジピン酸ジヒドラジドをヒアルロン酸溶液と混合し、アジピン酸ジヒドラジドとヒアルロン酸の質量比は8.68:1で、1 M 塩酸で溶液のpHを4.8に調整し、60 mg の1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミド(EDC)を固体として加え、溶液のpHを4.8に調整し続け、30 でpH値が変わらなくなるまで反応させ、透析凍結乾燥し、アミ

50

ノ修飾ヒアルロン酸を得る。

【0038】

(2) 5 g の 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリン (MPC) を 15 mL の無水メタノールに溶解し、19 mg の 4, 4' - アゾビス (4 - シアノ吉草酸) (ACVA) を計量し開始剤とし、38 mg の 4 - シアノ - 4 (フェニルチオホルミルチオ) ペンタン酸 (CTP) を鎖転移剤とし、開始剤と鎖転移剤を MPC の無水メタノール溶液に加え、攪拌後溶解後に密封し、氷浴下で、窒素で 30 分間脱酸する。

【0039】

(3) 脱酸素化された MPC 溶液を 60 に予熱したオイルバスで 12 時間反応させ、液体窒素クエンチング反応させ、室温に戻った後、600 mL アセトンで沈殿させ、上澄みを流し込んだ後、30 で真空乾燥し、末端にカルボキシル基を有するポリ (2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリン) (PMP C) 3.643 g を得る。

10

【0040】

(4) ステップ (1) の製品 150 mg とステップ (3) の製品 3 g を脱イオン水に溶解し、溶液の pH を 5.5 に調整し、30 で、pH = 5.5 で 24 時間反応させた EDC / NHS 60 mg (1 : 1、モル比) を加え、前記アミノ修飾ヒアルロン酸と末端にカルボキシル基を有する PMP C のアミノ基とカルボキシル基のモル比は 1 : 1.5 とし、反応終了後、透析凍結乾燥し、ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシ 201 mg を得る。

【0041】

20

[実施例 4]

実施例 1 で製造されたポリマーブラシは、ブルカー (Bruker) 摩擦摩耗試験機を使用し、その潤滑性能について検査し、具体的方法は以下の通りである。

【0042】

(1) 構成濃度は 0.2 mg / mL のポリマーブラシ PBS 溶液であり、1 mg / mL のヒアルロン酸 PBS 溶液である。

【0043】

(2) 新鮮な豚の関節を取り、関節軟骨を取り除き、(軟骨に対しいかなる損傷も避ける)、軟骨を約 1.5 cm x 1 cm の大きさにカットし、同時に、リングを使用して直径 6 mm の軟骨釘をドリルし、0.5% パンクレアチンで 3 時間処理した後、骨関節炎の病変がある軟骨を模倣するために血清で洗浄し、表面が平らな軟骨シートを選び、そしてそれを病理的グレードのガラススライドに固定し、次に、固定された軟骨の病理学的グレードのガラススライドを直径 10 mm のペトリ皿に固定し、軟骨釘は摩擦摩耗試験機の固定具で固定する。次に、0.2 mg / mL のポリマーブラシ PBS 溶液、1 mg / mL のヒアルロン酸 PBS 溶液および天然ウシ関節滑膜液を添加し、異なる潤滑媒体の下で摩擦係数を測定し、測定を 3 回繰り返す。結果の要約は図 3 に示す。

30

【0044】

図 3 から、ヒアルロン酸や天然ウシ関節滑膜液と比較して、ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの潤滑効果はさらに優れ、摩擦係数が明らかに低下する。

40

【0045】

[実施例 5]

実施例 1 で製造されたポリマーブラシはラット骨関節炎モデルを使用し、骨関節炎の進行を遅らせる効果を評価し、具体的方法は以下の通りである。

【0046】

S PF グレード SD ラット、雄、月齢 4 か月、24 匹。検疫合格後、すべての動物を zoletil (40 mg / kg) と xylazine (10 mg / kg) で麻酔し、ラットの右膝関節嚢を開き、スカルペルでその前十字靭帯を切断する。モデル化に成功し、そして生き残ったラットは、ランダムに A、B、C、D の 4 グループ、1 グループごとに 6 匹に分ける。手術後、14 日目、21 日目、35 日目、42 日目に動物の右膝に関節腔注

50

射を行い、グループAのラットは、何も処理せずにブランクコントロールグループとし、グループBのラットはPBS 100 μ Lを関節腔に注射し、グループCのラットには、100 μ Lのヒアルロン酸溶液を関節腔に注射し、グループDのラットに、ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシ(HPM)溶液100 μ Lを関節腔に注射する。

【0047】

[検査測定]

(1)動物の一般的な臨床状態を毎日観察と記録し、毎週1回動物の体重を測定する。

(2)手術後49日目にラットを殺し、そしてその関節軟骨を取得し、すべての動物の左側の未手術関節から関節軟骨を取り、3匹の動物の左関節軟骨を参照グループとして取り、

(3)得られたラットの関節を脱灰脱水処理し、15 μ m \times 15 μ mに軟骨サンプルをカットし、パラフィン包埋をし、次にトルイジンブルー染色をし、サフラニンO染色をし、anti-col 2A1 monoclonal antibodyで二型コラーゲンに対し染色し、

結果の要約は図4に示す。

【0048】

図4から、SDラットの前十字靭帯を切除して飼育した後、関節軟骨が明らかに薄くなり、軟骨の表面は粗く不均一、不連続で、局部軟骨は脱落し、骨関節炎の明らかな症状があり、骨関節炎のモデル造型が成功し、そして健康なラットの関節軟骨の表面が平らで滑らかであることを示している。ヒアルロン酸とPBS治療グループと比較して、HPM治療グループの軟骨表面の粗く不均一な状況は明らかに改善し、OARSIスコアも明らかに低下し、HPMの作用により、軟骨の摩耗および劣化の状況が効果的に改善され、そして、骨関節炎の病理学的進行を効果的に緩和することを示している。

【0049】

[実施例6]

実施例1で製造されたポリマーブラシ(HPM)に対し、VP-ITC等温熱量計(MICROCAL、米国)を使用し、滑液と軟骨タンパク質との相互作用を研究する。具体的方法は以下の通りである。

【0050】

(1)0.2 mg/mLのHPMPBS溶液と0.2 mg/mLの酢酸溶液(酢酸濃度5 mg/mL)、7 mg/mLと11 mg/mLのアルブミンと - グロブリンPBS溶液、0.5 mg/mLの二型コラーゲン溶液(溶媒として5 mg/mLの酢酸)、0.5 フィブロネクチン溶液(溶媒としてPBS)を準備する。

【0051】

(2)VP-ITC等温熱量計滴定溶媒PBSと5 mg/mLの酢酸のブランク曲線を、実験的背景とする。

【0052】

(3)HPMと各種タンパク質の相互作用曲線を別々に滴定し、前のステップに対応する実験的背景を差し引いた後、HPMと各種タンパク質との相互作用の結合定数を得る。

【0053】

結果は表1に要約する。表1に示すように、HPMとアルブミン、グロブリン、フィブロネクチン、二型コラーゲンの結合定数は大きく異なり、二型コラーゲンとフィブロネクチンの結合定数は、アルブミンとグロブリンの結合定数とは桁違いに異なり、タンパク質選択の相互作用を示し、したがって軟骨のタンパク質に選択的に結合することができ、軟骨と結合する方法は自然で無害である。そしてヒアルロン酸はこの選択性を示さない。(HAはヒアルロン酸である)

【0054】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

両性イオンポリマーブラシと滑液および軟骨中の主要タンパク質との結合定数

	フィブロネクチン	二型コラーゲン	γ -グロブリン	アルブミン
HA	0.072	1.17	3220	9040
HPM	8.15×10^6	4.46×10^6	265	70.3

【0055】

10

上記の実施形態は、本発明の好ましい実施方式であるが、本発明の実施形態は、上記の実施形態によって限定されず、その他の本発明の精神および原理から逸脱しない他の変更、修正、置換、組み合わせ、および簡略化は、同等の置換方法であり、すべて本発明の保護範囲に含まれる。

【0056】

(付記)

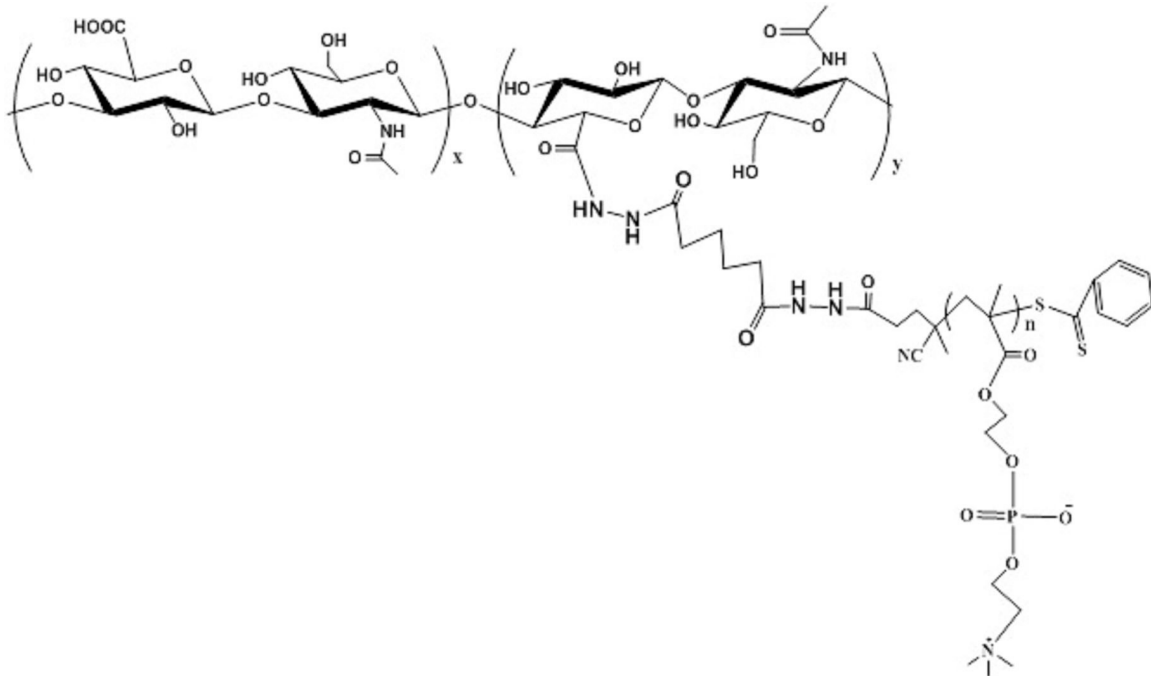
(付記1)

式1の構造を有し、

ここで、 n は60～150の整数であり、ここで、 x は589～686の整数であり、 y は125～230の整数であることを特徴とするヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシ。

20

【化2】



30

40

式 1

【0057】

(付記2)

下記のステップ(1)～(3)を含むことを特徴とする付記1に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

ステップ(1)ヒアルロン酸とアジピン酸ジヒドラジドを反応させ、アミノ修飾ヒアルロン酸を得る。

ステップ(2)2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンは重合モノマーとし、開始

50

剤と鎖転移剤の作用下で、可逆的付加開裂鎖転移ラジカル重合の後、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)を製造する。

ステップ(3)上記アミノ修飾ヒアルロン酸、末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)と活性剤を混合し、水溶液系中で反応させ、ヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシを得る。

【0058】

(付記3)

ステップ(1)の前記反応は、1-エチル-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩の作用下で行い、反応系のpHは4.7~4.85であり、ステップ(3)の反応系のpH値は5~7であることを特徴とする付記2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

10

【0059】

(付記4)

ステップ(1)の前記ヒアルロン酸とアジピン酸ジヒドラジドの質量比は1:4~1:18であり、

ステップ(3)のアミノ修飾ヒアルロン酸と末端にカルボキシル基を有するポリ(2-メタクリロキシエチルホスホリルコリン)の用量は、アミノ基とカルボキシル基のモル比は1:(1.1~2)である条件を満足させることを特徴とする付記2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

20

【0060】

(付記5)

ステップ(2)の前記鎖転移剤は、4-シアノ-4-(フェニルチオホルミルチオ)ペンタン酸であり、

ステップ(2)の前記開始剤は、4,4'-アゾ(4-シアノ吉草酸)であり、ステップ(3)の前記活性剤は、1-エチル-3-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]カルボジイミドEDCおよびN-ヒドロキシスルホスクシンイミドNHSであることを特徴とする、付記2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

30

【0061】

(付記6)

前記鎖転移剤と前記2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンのモル比は、1:(100~200)であり、前記開始剤と鎖転移剤のモル比は1:(2~10)であり、使用する活性剤EDCとNHSの質量比は1:1~1:2であることを特徴とする付記5に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

【0062】

(付記7)

ステップ(2)の前記重合温度は60~70℃であり、重合時間は6~24時間であり、ステップ(2)の前記重合に使用される溶媒は、エタノール、水、メタノールのうちの一種以上であり、

40

ステップ(3)の前記反応温度は25~35℃であり、反応時間は18~36時間であり、

ステップ(1)の前記反応温度は25~35℃であることを特徴とする付記2に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシの製造方法。

【0063】

(付記8)

付記1に記載のヒアルロン酸と2-メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両

50

性イオンポリマーブラシの生物医学分野における使用。

【 0 0 6 4 】

(付記 9)

前記ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシは、骨関節炎を治療するための薬物、プロテアーゼの潤滑摩擦性能を改善するための潤滑剤の製造に特に適し、且つ、軟骨修復材料と結合して摩擦力学的特性を改善することを特徴とする付記 8 に記載の使用。

【 0 0 6 5 】

(付記 1 0)

前記ヒアルロン酸と 2 - メタクリロキシエチルホスホリルコリンに基づく両性イオンポリマーブラシは、軟骨修復材料のバイオニック潤滑剤または軟骨修復材料の摩擦性能を改善するための修飾材料として特に使用することを特徴とする付記 8 に記載の使用。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 - (1)】

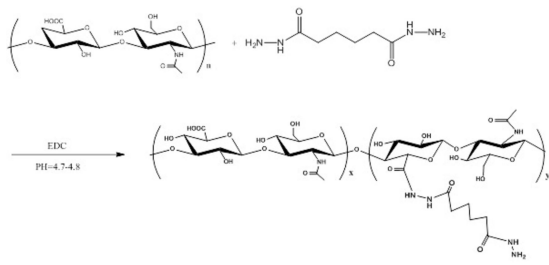


図 1 - (1)

【図 1 - (2)】

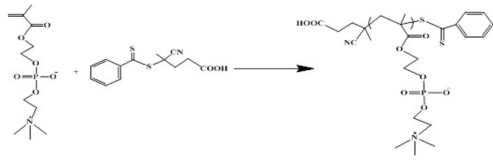


図 1 - (2)

【図 1 - (3)】

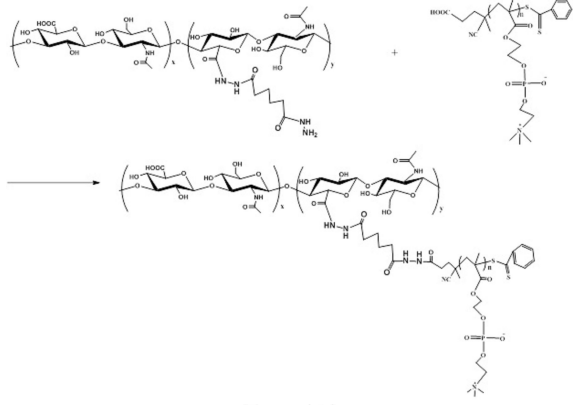


図 1 - (3)

【図 2 - (1)】

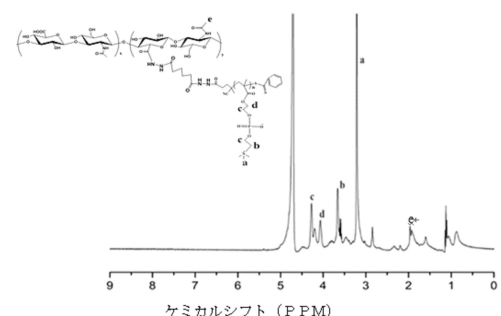


図 2 - (1)

【図 2 - (2)】

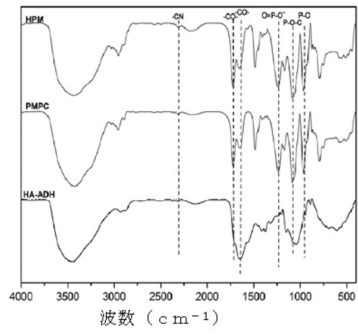


図 2 - (2)

【図 3】

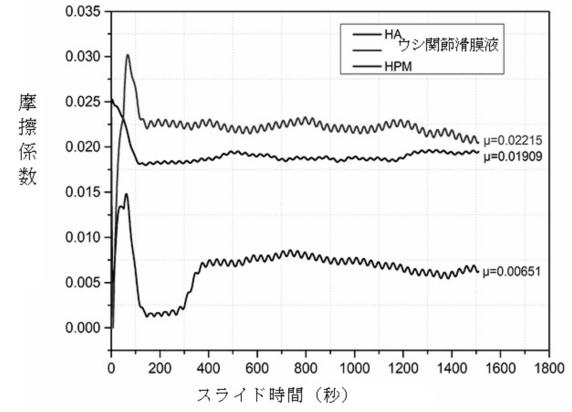


図 3

10

20

30

40

50

【 図 4 】

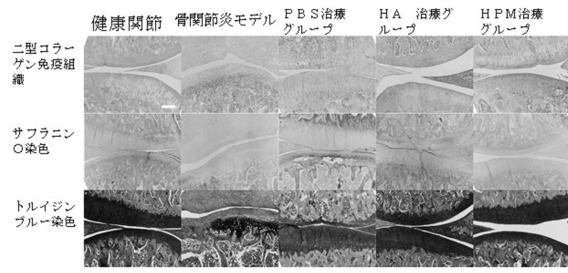


図 4

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I
A 6 1 K 31/728(2006.01) A 6 1 K 31/728

(54)【発明の名称】 能を改善するための修飾材料

(72)発明者 劉 卅

中華人民共和国 5 1 0 6 4 0 広東省広州市天河区五山路381号

(72)発明者 謝 仁箭

中華人民共和国 5 1 0 6 4 0 広東省広州市天河区五山路381号

審査官 岡部 佐知子

(56)参考文献 中国特許出願公開第105085817(CN, A)

特開2016-059447(JP, A)

特表2015-508425(JP, A)

特表2013-514841(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 8 G 8 1 / 0 2

A 6 1 P 1 9 / 0 2

A 6 1 P 1 9 / 0 8

A 6 1 P 2 9 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 8 0

A 6 1 K 3 1 / 7 2 8