



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 27 158 T2** 2004.11.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 954 323 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 27 158.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP97/03238**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 930 376.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/49412**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.06.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.12.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.11.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.11.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 31/715**
A61P 19/02

(30) Unionspriorität:

PD960163 21.06.1996 IT

(73) Patentinhaber:

Fidia S.p.A., Abano Terme, Padua/Padova, IT

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**BELINI, Davide, I-35036 Montegrotto Terme, IT;
PAPARELLA, Annamaria, I-70100 Bari, IT;
O'REGAN, Michael, I-35037 Teolo, IT;
CALLEGARO, Lanfranco, I-36016 Thiene, IT**

(54) Bezeichnung: **Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend eine Mischung von selbstvernetzter und nicht-selbstvernetzter Hyaluronsäure zur Behandlung von Arthropathien**

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

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die eine selbstvernetzte Form der Hyaluronsäure als eine erste Komponente im Gemisch mit einer zweiten Komponente nichtselbstvernetzter Hyaluronsäure und möglicherweise auch in Kombination mit anderen pharmakologisch wirksamen Stoffen enthalten. Diese Zusammensetzungen können aufgrund ihrer einzigartigen viskoelastischen Eigenschaften bei der Behandlung von Gelenkerkrankungen verwendet werden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Hyaluronsäure (HA) ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid aus der Familie der Glykosaminoglykane, die in besonders hoher Konzentration in dem Knorpelgewebe und der Synovialflüssigkeit von Gelenkverbindungen vorkommt. Es ist gezeigt worden, dass die Synovialflüssigkeit als viskose Flüssigkeit unter niedriger Scherung (einem sich langsam bewegenden Gelenk entsprechend) wirkt, jedoch ein elastisches Verhalten unter hoher Scherung (einem sich schnell bewegendem Gelenk entsprechend) zeigt (Balazs, E. A., Univ. of Michigan, Med. Ctr. J. (Special Arthritis Issue), Dezember 1968, 255). Bei Patienten mit Gelenkerkrankungen wie Osteoarthritis und Rheumatoidarthritis sind die viskoelastischen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit beeinträchtigt, und es wurde dargelegt, dass dies eine Abnahme des viskoelastischen Beitrags, der durch die HA-Komponente gegeben ist, zeigt (Kobayashi, Y. et al., Biorheology, 1994, 31, 235–244). Dies ist aus **Fig. 1**, die die rheologischen Profile der Synovialflüssigkeit aus den Gelenken von gesunden Freiwilligen und osteoarthritischen Spendern zeigt, klar ersichtlich ("The Rheological and Biological Function of Hyaluronic Acid", E. A. Balazs, D. A. Gibbs, in: Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, hrsg. von E. A. Balazs, Academic Press, 1970). In normaler Synovialflüssigkeit sind, anders als im Fall von Osteoarthritis, die viskoelastischen Werte hoch, und G' und G'' kreuzen sich. Das Vorhandensein dieses Überkreuzungspunktes steht nicht nur mit der Konzentration von HA (2–4 mg/ml) in Zusammenhang, sondern auch und vor allem mit ihrem hohen Molekulargewicht (etwa 4–5 Millionen). Andererseits kommt bei Probanden mit Osteoarthritis sowohl der Abbau der Hyaluronsäure mit daraus folgender Verminderung ihres Molekulargewichts als auch eine Abnahme ihrer Konzentration (1–2 mg/ml) vor.

[0003] Die Verabreichung von hoch reiner, exogener HA durch intraartikuläre Injektion erwies sich in der Behandlung von Osteoarthritis als wirksam. Dies ist nicht nur den einzigartigen viskoelastischen Eigenschaften der HA, sondern auch ihren potenziellen pharmakologischen Eigenschaften zuzuschreiben. Tatsächlich spiegeln die im Handel erhältlichen Produkte auf HA-Basis, die gegenwärtig zur Behandlung der Osteoarthritis durch intraartikuläre Injektion vertrieben werden, zwei Denkschulen die Wirkungsweise der HA in der Behandlung dieser Pathologien betreffend wieder. Es gibt starke Anzeichen dafür, dass nicht modifizierte HA eine pharmakologische Wirksamkeit zusätzlich zu dem Hervorrufen einer vorübergehenden Wiederherstellung der viskoelastischen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit zeigt (G. Abatangelo und M. O'Regan, Eur. J. Rheumatol. Inflamm., 1995, 15, 1: 9–16; P. Ghosh, Clin. Exp. Rheumatol., 1993, 12, 1–8; R. K. Strachan et al., An. Rheum. Dis., 1990, 49: 949–952). Andererseits unterstützen die Hersteller chemisch vernetzter HA-Derivate die Hypothese, dass diese Derivate allein auf mechanische Weise wirken (E. A. Balazs und J. L. Denlinger, J. Rheumatology, 1993, Bd. 20, Supplement 39: 3–9).

[0004] WO 89 10941 offenbart nur selbstvernetzte Hyaluronsäure.

[0005] Adams et al. (Osteoarthritis and Cartilage (1995) 3, 213–226) offenbaren eine klinische Studie zur Verwendung von G-F 20, einer Zubereitung aus vernetztem Hyaluronan, allein oder in Kombination mit einer kontinuierlichen, nicht steroidalen Antirheumatikum(NSAR)-Therapie zur Behandlung von Osteoarthritis des Knies. D2 lehrt weder die Verwendung eines Gemischs aus vernetzter und nichtselbstvernetzter HA, noch schlägt sie dies vor.

[0006] Andere Formen von Arthropathie neben der Osteoarthritis können aus Modifikationen der viskoelastischen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit der gelenkartigen Verbindungen herrühren, die als Ergebnis von besonderen mechanischen oder chirurgischen Eingriffen, die an dem Gelenk durchgeführt wurden, vorkommen können, wie die Immobilisierung nach einer Gelenkdistorsion oder nach einer Bruchbehandlung und einer Gelenk-Arthroskopie. Bei der Behandlung der funktionellen Folgen dieser Eingriffe kann das Gleitpotential der HA oder der Derivate davon stärker einschlägig sein als die langfristigen pharmakologischen Wirkungen der Verbindungen. Zusätzlich ist HA dafür bekannt, einen schnellen Turnover im Gelenk aufzuweisen (Brown T. J. et al., Exp. Physiol., 1991, 76, 125–134; Fraser, J. R. E. et al., Semin. Arthritis Rheum., 1993, 22 (Suppl. 1),

9–17; Laurent, U. B. G. et al., Matrix, 1992, 12, 130–6). Deshalb ist es ein weiteres Ziel der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Formulierungen, die Verweildauer von exogener HA, die in die Gelenke zur Behandlung von Arthropathien injiziert wird, zu erhöhen.

GEGENSTÄNDE DER ERFINDUNG

[0007] Es ist deshalb ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, neue Zusammensetzungen, die auf Hyaluronsäure (HA) und selbstvernetztem Polysaccharid (ACP) basieren, möglicherweise zusammen mit einem geeigneten pharmazeutischen Exzipienten oder Träger und/oder einem Arzneistoff für die intraartikuläre Verwendung bereitzustellen, wobei die Zusammensetzungen angemessene viskoelastische Eigenschaften zur Behandlung von Arthropathien zeigen.

[0008] Es ist ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, Zusammensetzungen bereitzustellen, die als Reservoirs für native HA wirken.

[0009] Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, eine auf HA und ACP basierende Zusammensetzung zu verwenden, die angemessene viskoelastische Eigenschaften und eine angemessene Verweildauer innerhalb des Gelenks zur Behandlung von Arthropathien zeigt.

[0010] Die vorstehenden Gegenstände der Erfindung und weitere werden in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung bewerkstelligt, indem eine selbstvernetzte Form der Hyaluronsäure als eine erste Komponente in Gemischen, die als eine zweite Komponente nichtselbstvernetzte Hyaluronsäure enthalten, bereitgestellt wird, wobei die relativen Verhältnisse der selbstvernetzten und der nichtselbstvernetzten Hyaluronsäure 95 : 05 bis 05 : 95 betragen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0011] Die Erfindung wird weiter in den beiliegenden Zeichnungen veranschaulicht, in denen:

[0012] Fig. 1 ein viskoelastisches Spektrum humaner Synovialflüssigkeit von jungen gesunden Spendern, älteren gesunden Spendern und osteoarthritischen Spendern zeigt;

[0013] die Fig. 2A–2D die viskoelastischen Spektren für verschiedene relative Verhältnisse von ACP/HA-Gemischen in Phosphatpuffer zeigen, $C_p = 1\%$ Gew./Gew., $T = 25^\circ\text{C}$ ($G'(^{\circ})$; G'' , (\bullet); η^* , (∇);

[0014] Fig. 3 das Speichermodul ($G'(^{\circ})$) und das Verlustmodul (G'')(\bullet) als eine Funktion des ACP-Gehalts (%) zeigt. Frequenz = $0,72\text{ rad/s}$ (entsprechend der Bewegung des Gelenks bei normaler Gehgeschwindigkeit), $T = 25^\circ\text{C}$;

[0015] Fig. 4 einen Vergleich der dynamischen Viskositäten der Formulierungen aus ACP/HA in verschiedenen Verhältnissen zeigt;

[0016] Fig. 5 das viskoelastische Spektrum einer Formulierung aus ACP/HA 100/0, ACP 20%, 0,5% H_2O zeigt;

[0017] Fig. 6 das viskoelastische Spektrum einer Formulierung aus ACP/HA 75/25, ACP 20%, 0,5% H_2O zeigt;

[0018] Fig. 7 das viskoelastische Spektrum einer Formulierung aus ACP/HA 50/50, ACP 5%, 0,5% H_2O zeigt;

[0019] Fig. 8 das viskoelastische Spektrum einer Formulierung aus ACP/HA 50/50, ACP 20%, 0,5% H_2O zeigt;

[0020] Fig. 9 einen Vergleich der dynamischen Viskositäten der Formulierungen aus ACP/HA 100/0, ACP 20%, 10% und 5%, 0,5% H_2O zeigt;

[0021] Fig. 10 einen Vergleich der dynamischen Viskositäten der Formulierungen aus ACP/HA 50/50, ACP 20%, 10% und 5%, 0,5% H_2O zeigt;

[0022] Fig. 11 einen Vergleich der dynamischen Viskositäten der Formulierungen aus ACP/HA 40/60, ACP

20% und 5%, 0,5% H₂O zeigt;

[0023] Fig. 12 das viskoelastische Spektrum von Synovialflüssigkeit von einem nicht-osteoarthritischen Pferd zeigt;

[0024] Fig. 13 das viskoelastische Spektrum von ACP/HA 100/0, ACP 10%, 0,5% H₂O zeigt;

[0025] Fig. 14 das viskoelastische Spektrum von Synovialflüssigkeit von einem nicht-osteoarthritischen Pferd mit der Zugabe von ACP 100/0, 10%, 0,5% H₂O, 3,3 mg/ml zeigt;

[0026] Fig. 15 das viskoelastische Spektrum von Synovialflüssigkeit von einem nicht-osteoarthritischen Pferd mit der Zugabe von ACP 100/0, 10%, 0,5% H₂O, 5,5 mg/ml zeigt;

[0027] Fig. 16 einen Vergleich der dynamischen Viskositäten von ACP, Synvisc, Fermentech, Artz und Hyalgan zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0028] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine neue Formulierung bereitzustellen, die fähig ist, die Viskoelastizität und die synoviale Verweildauer von exogener HA, die in die Gelenke zur Behandlung von Arthropathien injiziert wurde, zu verbessern.

[0029] Die Formulierung besteht aus selbstvernetzter HA als einer ersten Komponente in Gemischen, die als eine zweite Komponente nichtselbstvernetzte Hyaluronsäure enthalten, wobei die relativen Verhältnisse von selbstvernetzter Hyaluronsäure und nichtselbstvernetzter Hyaluronsäure 95 : 05 bis 05 : 95 betragen.

[0030] In diesen Formulierungen wird das selbstvernetzte Polysaccharid (ACP) durch einen Selbstvernetzungsprozess erhalten, der zur Bildung von Esterbindungen in und zwischen den Ketten ohne Einführung einer fremden Brücke zwischen den Polymerketten führt, wie in EP 0341745 B1 beschrieben.

[0031] Die ACP-Komponente kann aus HA mit einem Molekulargewicht im Bereich von 50 kDa bis 5000 kDa synthetisiert werden und muss einen pharmazeutischen Reinheitsgrad und einen Grad an Vernetzung aufweisen, der im Bereich von 1% bis 30% liegt bezüglich der Carbonsäuregruppen des Polymers.

[0032] Bevorzugte Beispiele von ACP-Komponenten schließen ein: ACP 5, ACP 10, ACP 15 und ACP 20, wobei die Ziffern 5, 10, 15 und 20 den nominalen Grad der Vernetzung wiedergeben, bezogen auf die Stöchiometrie der chemischen Umsetzung.

[0033] Deshalb können diese selbstvernetzten HA-Derivate zum Vorteil bei der Herstellung von Suspensionen zur Behandlung von Arthropathien verwendet werden aufgrund ihrer verbesserten Viskoelastizität bezüglich der nativen HA, die während des Abbaus dieser selbstvernetzten Derivate freigesetzt wird. ACP/HA-Derivate bilden deshalb ideale viskoelastische Materialien, zusätzlich dazu, dass sie ein Reservoir für native HA sind, die während des Abbaus langsam freigesetzt wird, was zu einer Verlängerung der Kontaktzeit der nativen HA mit den Gelenkgeweben führt. Die Sicherheit dieser selbstvernetzten HA-Derivate ist auch potentiell besser als die der HA-Derivate, die durch alternative Vernetzungsreaktionen hergestellt werden, da die native HA, die durch den Abbau von ACP freigesetzt wird, auf physiologischen, metabolischen Stoffwechselwegen metabolisiert wird.

[0034] Darüber hinaus ist es möglich, wenn man das gelartige Verhalten von ACPs in wässrigen Medien in Betracht zieht (Mensitieri et al., Abstract, "12th European Conference on Biomaterials" Porto Portugal, Sept. 10–13, 1995), durch Mischen von HA mit ihren ACP-Derivaten einen breiten Bereich von Systemen zu erhalten, die Viskoelastizität mit Reservoir-Eigenschaften vereinigen können.

[0035] Die nicht idealen rheologischen Eigenschaften von ACP allein können durch die Herstellung von Arzneimitteln, die aus Gemischen von ACP und nicht modifizierter HA in wechselnden Verhältnissen der beiden Komponenten zusammengesetzt sind, entsprechend dem Zustand des Patienten und dem zu behandelnden Gelenk, ausgeglichen werden.

[0036] Die relativen Verhältnisse von ACP und HA, die in den Formulierungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, schließen im Allgemeinen ACP/HA in relativen Mengen von etwa 95 : 05 bis etwa 05 : 95 ein.

Bevorzugte Verhältnisse für die ACP/HA-Formulierungen schließen ACP/HA in Verhältnissen von etwa 75 : 25 bis etwa 25 : 75 ein.

[0037] Die ACP/HA-Formulierungen der vorliegenden Erfindung können zu Arzneimitteln verarbeitet werden und können mit geeigneten pharmazeutisch wirksamen Arzneistoffen wie Anästhetika, Antibiotika, steroidal und nicht steroidal entzündungshemmenden Arzneistoffen, entzündungshemmenden Stoffen vom Typ eines Hormons, wie Somatostatinen, epitheliotrophen Vitaminen, Zytokinen wie IL-1 und IL-6, Zytokinrezeptoren, Wachstumsfaktoren wie FGF und verträglichen Exzipienten vereinigt werden. Darüber hinaus ist es möglich, Arzneimittel zu verwenden, ausgehend von Gemischen aus ACP und HA, wobei die HA mit Silber-, Kupfer-, Zink- und Calciumsalzen Salze bildet. Diese Arzneimittel können zu Zubereitungen von halbfesten oder flüssigen Formen für die intraartikuläre Anwendung formuliert werden.

[0038] Die Gesamtmenge von HA, entweder in Form von ACP oder HA, liegt im Bereich von 3–50 mg. Eine geeignete Dosierung ist eine solche, die eine in dem Arzneimittel enthaltene Gesamtmenge an HA, entweder in Form von ACP oder HA, von 20 mg in einem Endvolumen von 2 ml eines geeigneten pharmazeutischen Exzipienten enthält.

1. Produkt aus selbstvernetztem Polysaccharid (ACP)

[0039] Die ACP-Derivate, die in der vorliegenden Zusammensetzung verwendet werden, sind selbstvernetzte Derivate der Hyaluronsäure. In diesen Derivaten sind alle oder ein Teil der Carbonsäuregruppen der Hyaluronsäure mit den Hydroxylgruppen des gleichen Moleküls und/oder von anderen Hyaluronsäure(HA)-molekülen verestert, auf diese Weise Lacton- oder intermolekulare Esterbindungen bildend. Diese "internen" Ester der HA, bei denen es keine Beteiligung von OH-Gruppen anderer Alkohole gibt, können auch als "selbstvernetzte Polysaccharide" definiert werden, da die Bildung einer mono- oder polymolekularen Vernetzung die Folge der vorstehend erwähnten inneren Veresterung ist. Das Adjektiv "vernetzt" bezieht sich auf die Querverbindungen zwischen den Carbonsäuregruppen und den Hydroxylgruppen der Polysaccharidmoleküle.

[0040] Die inneren Ester können vollständig oder partiell sein, abhängig davon, ob alle oder nur ein Teil der Carbonsäure-Funktionen in der vorstehenden Weise verestert ist. In den partiellen inneren Estern können weitere Carbonsäure-Funktionen entweder vollständig oder partiell mit einwertigen oder mehrwertigen Alkoholen verestert sein, auf diese Weise "externe" Estergruppen bildend, und in den partiellen Estern dieser beiden Estergruppen können die nicht veresterten Carbonsäure-Funktionen frei sein oder mit Metallen oder organischen Basen Salze bilden.

[0041] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten inneren Ester können durch das in EP 0 341 745 B1 beschriebene Verfahren hergestellt werden, das die Aktivierung der Carbonsäuregruppen durch die Zugabe von Stoffen, die zum Einleiten einer derartigen Aktivierung fähig sind, einschließt. Die instabilen Zwischenprodukte, die aus der Aktivierungsreaktion erhalten werden, scheiden sich spontan ab, entweder nach der Zugabe von Katalysatoren und/oder nach einem Anheben der Temperatur, wobei die vorstehend erwähnten inneren Esterbindungen mit den Hydroxylgruppen desselben oder eines anderen HA-Moleküls gebildet werden. Gemäß dem gewünschten Grad der inneren Veresterung werden entweder alle oder ein aliquoter Teil der Carbonsäure-Funktionen aktiviert (wobei der aliquote Teil durch einen Überschuss der aktivierenden Stoffe oder durch geeignete Dosierungsverfahren erhalten wird).

[0042] Die Carbonsäuregruppen, die in innere Estergruppen umgewandelt werden sollen, können aktiviert werden ausgehend von Polysacchariden, die freie Carbonsäuregruppen enthalten oder bevorzugt von Polysacchariden, die in ein Salz überführte Carbonsäuregruppen enthalten, zum Beispiel Metallsalze, bevorzugt Alkali- oder Erdalkalimetalle, und vor allem mit quartären Ammoniumsalzen wie den hier nachstehend beschriebenen. Salze mit organischen Basen wie Aminen können jedoch auch als Ausgangsstoffe verwendet werden.

[0043] Die Anzahl der Carbonsäure-Funktionen, die in innere Ester umgewandelt werden sollen, steht im Verhältnis zu der Anzahl der aktivierten Carbonsäure-Funktionen, und diese Anzahl hängt von der Qualität des verwendeten Aktivierungsmittels ab. Um alle inneren Ester zu erhalten, sollte deshalb ein Überschuss des Aktivierungsmittels verwendet werden, während im Fall von partiellen Estern die Menge dieses Mittels gemäß dem Grad der gewünschten Veresterung dosiert werden sollte.

[0044] Die Carbonsäuregruppen, die nach der Vernetzungsreaktion noch frei sind oder in ein Salz überführt worden sind, können ausgetauscht werden, um passende Salze zu erhalten, oder sie können mit einwertigen

oder mehrwertigen Alkoholen verestert werden, wobei auf diese Weise gemischte Ester erhalten werden, die teilweise vernetzt und teilweise extern verestert sind. Natürlich kann die partielle Veresterung mit Alkoholen vor der Aktivierung eines Teils der Carbonsäuregruppen und der nachfolgenden Umwandlung in innere Ester bewirkt werden.

[0045] In den so hergestellten, vernetzten Produkten können die restlichen freien Carbonsäuregruppen oder solche in Form von Salzen teilweise oder vollständig mit ein- oder mehrwertigen Alkoholen verestert werden, wobei auf diese Weise gemischte Ester mit Bindungen, die teilweise innere und teilweise externe sind, erhalten werden. Die Alkohole, die für diese Veresterung verwendet werden, entsprechen den hier nachstehend beschriebenen und denen, von denen gemischte Ester abgeleitet sind.

[0046] Gemäß EP 0 216 453 A1 können die externen Ester vorteilhafterweise ausgehend von quartären Ammoniumsalzen mit einem Veretherungsmittel in einem aprotischen Lösungsmittel wie Dialkylsulfoxiden, Dialkylcarbonsäureamiden wie im Besonderen Niederalkyldialkylsulfoxiden mit maximal 6 Kohlenstoffatomen, insbesondere Dimethylsulfoxid, und den Niederalkyldialkylamiden der niedrigeren aliphatischen Säuren wie Dimethyl- oder Diethylformamid oder Dimethyl- oder Diethylacetamid hergestellt werden. Die Umsetzung sollte vorzugsweise innerhalb eines Temperaturbereichs von etwa 25° bis 75°, zum Beispiel bei etwa 30°, bewirkt werden. Die Veresterung wird vorzugsweise durch allmähliches Zugabe des Veretherungsmittels zu dem vorgenannten Ammoniumsalz, das in einem der erwähnten Lösungsmittel, zum Beispiel in Dimethylsulfoxid, gelöst ist, bewirkt.

[0047] In den inneren Estern, in denen die Carbonsäuregruppen noch intakt sind, können diese mit organischen oder anorganischen Basen Salze bilden. Die Wahl der Base zur Bildung eines derartigen Salzes ist durch die beabsichtigte Verwendung des Produkts begründet. Die anorganischen Salze sind bevorzugt solche der Alkalimetalle wie Natrium- oder Kaliumsalze oder Ammoniumsalze, Cäsiumsalze, Salze von Erdalkalimetallen wie Calcium, Magnesium oder Aluminium.

[0048] Die Salze der organischen Basen sind insbesondere solche von aliphatischen, araliphatischen, cycloaliphatischen oder heterocyclischen Aminen. Die Ammoniumsalze dieses Typs können von therapeutisch verträglichen, aber inaktiven Aminen oder von Aminen mit einer therapeutischen Wirkung abgeleitet werden. Von ersteren sollte besonderes Augenmerk auf die aliphatischen Amine gelegt werden, z. B. auf die Mono-, Di- und Trialkylamine mit Alkylgruppen mit einem Maximum von 18 Kohlenstoffatomen, oder auf Arylalkylamine mit der gleichen Anzahl von Kohlenstoffatomen in dem aliphatischen Teil, und, wobei Aryl für eine Benzolgruppe steht, die möglicherweise mit 1 bis 3 Hydroxygruppen substituiert sein kann. Als therapeutisch verträgliche, jedoch nicht an sich wirksame Amine sind cyclische Amine sehr geeignet, wie Alkylamine mit Ringen zwischen 4 und 6 Kohlenstoffatomen, die möglicherweise im Ring durch Heteroatome wie Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff unterbrochen sind wie Piperidin, Morpholin oder Piperazin, oder die zum Beispiel durch Amino- oder Hydroxyfunktionen wie im Fall von Aminoethanol, Ethylendiamin oder Cholin substituiert sein können.

[0049] In den ACP-Derivaten, die auch mit einwertigen oder mehrwertigen Alkoholen veresterte Carbonsäure-Funktionen aufweisen, ob diese Funktionen in den Ausgangsmaterialien des vorstehend erwähnten Verfahrens vorkommen oder ob sie am Ende des Verfahrens eingeführt werden, können die Alkohole zu den aliphatischen, araliphatischen, alicyclischen oder heterocyclischen Reihen gehören.

[0050] Alkohole der aliphatischen Reihen zur Verwendung als veresternde Komponenten sind zum Beispiel solche mit maximal 34 Kohlenstoffatomen, die gesättigt oder ungesättigt sein können und die möglicherweise auch durch andere freie funktionelle oder funktionell modifizierte Gruppen substituiert sein können wie Amino-, Hydroxyl-, Aldehyd-, Keto-, Mercapto-, Carbonsäuregruppen oder durch Gruppen, die von diesen abgeleitet sind, wie Hydrocarbyl- oder Dihydrocarbylaminogruppen (hier und im folgenden bedeutet der Begriff "Hydrocarbyl" nicht nur einwertige Reste von Kohlenwasserstoffen zum Beispiel des Typs C_nH_{2n+1} , sondern auch zweiwertige oder dreiwertige Reste, wie "Alkylene" C_nH_{2n} oder „Alkylidene“ C_nH_{2n}), Ether- oder Estergruppen, Acetal- oder Ketalgruppen, Thioether- oder Thioestergruppen und veresterte Carbonsäuregruppen oder Carbamidgruppen und Carbamidgruppen, die durch eine oder zwei Hydrocarbylgruppen, durch Nitritgruppen oder Halogenatome substituiert sind. Von den vorstehenden Gruppen, die Hydrocarbylreste enthalten, sollten diese bevorzugt niederaliphatische Reste sein, wie Alkylgruppen mit maximal 6 Kohlenstoffatomen. Derartige Alkohole können dann in der Kohlenstoffkette durch Heteroatome wie Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelatome unterbrochen sein.

[0051] Es ist bevorzugt, Alkohole zu wählen, die mit einer oder zwei der vorstehend genannten funktionellen Gruppen substituiert sind. Alkohole der vorstehenden Gruppen, die für die Zwecke der vorliegenden Erfindung

bevorzugt sind, sind solche mit maximal 12 und insbesondere 6 Kohlenstoffatomen und in denen die Hydrocarbylreste in den vorstehend genannten Amino-, Ether-, Ester-, Thioether-, Thioester-, Acetal-, Ketalgruppen für Alkylgruppen mit maximal 4 Kohlenstoffatomen stehen, und auch in den veresterten Carbonsäuregruppen oder den substituierten Carbamidgruppen oder den Hydrocarbylgruppen mit Alkylen sind der gleichen Anzahl von Kohlenstoffatomen und in denen die Amino- oder Carbamidgruppen Alkylenamin- oder Alkylen carbamidgruppen mit maximal 8 Kohlenstoffatomen sein können. Von diesen Alkoholen sind solche von besonderem Interesse, die gesättigt und unsubstituiert sind wie Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropylalkohole, n-Butylalkohol, Isobutylalkohol, tert.-Butylalkohol, Amylalkohole, Pentyl-, Hexyl-, Octyl-, Nonyl- und Dodecylalkohole und vor allem solche mit einer linearen Kette wie n-Octyl- und n-Dodecylalkohol. Von den substituierten Alkoholen dieser Gruppe sind die Folgenden bevorzugt: zweiwertige Alkohole wie Ethylenglykol, Propylenglykol, Butylenglykol, dreiwertige Alkohole wie Glycerin, Aldehydalkohole wie Tartronalkohol, Carbonsäurealkohole wie Milchsäuren, zum Beispiel Glykolsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Aminoalkohole wie Aminoethanol, Aminopropanol, n-Aminopropanol, n-Aminobutanol und ihre Dimethyl- und Diethyl-derivate in der Aminfunktion, Cholin, Pyrrolidinyloethanol, Piperidinyloethanol, Piperazinylethanol und die entsprechenden Derivate der n-Propyl- oder n-Butylalkohole, Monothioethylenglykol und seine Alkylderivate, zum Beispiel das Ethyl-derivat in der Mercaptofunktion.

[0052] Beispiele für die aliphatischen gesättigten höheren Alkoholen sind: Cetylalkohol und Myricylalkohol, jedoch sind für die Zwecke der vorliegenden Erfindung die ungesättigten höheren Alkohole mit einer oder zwei Doppelbindungen von besonderer Wichtigkeit, wie insbesondere solche, die in vielen essentiellen Ölen enthalten sind und mit Terpenen verwandt sind, wie Citronellol, Geraniol, Nerol, Nerolidol, Linalool, Farnesol oder Phytol. Von den ungesättigten niedrigeren Alkoholen sind die in Betracht kommenden Allylalkohol und Propargylalkohol.

[0053] Von den araliphatischen Alkoholen sind solche mit nur einem Benzolrest bevorzugt, und in denen die aliphatische Kette maximal 4 Kohlenstoffatome aufweist, und in denen der Benzolrest mit zwischen 1 und 3 Methyl- oder Hydroxygruppen oder mit Halogenatomen, insbesondere Chlor, Brom oder Iod substituiert sein kann, und in denen die aliphatische Kette durch eine oder mehrere Funktionen, ausgewählt aus den Gruppen, die freie Aminogruppen oder Mono- oder Dimethylgruppen umfassen, oder durch Pyrrolidin- oder Piperidingruppen substituiert sein kann. Von diesen Alkoholen sind Benzylalkohol und Phenethylalkohol am stärksten bevorzugt.

[0054] Alkohole der cycloaliphatischen oder aliphatischen cycloaliphatischen Reihe können sich von mono- oder polycyclischen Kohlenhydraten ableiten, können bevorzugt maximal 34 Kohlenstoffatome aufweisen, können unsubstituiert sein und können einen oder mehrere Substituenten enthalten, wie die für die aliphatischen Alkohole vorstehend erwähnten. Von den Alkoholen, die sich von cyclischen Kohlenhydraten mit einem Ring ableiten, sind die mit maximal 12 Kohlenstoffatomen bevorzugt, wobei die Ringe vorzugsweise zwischen 5 und 7 Kohlenstoffatome aufweisen, die zum Beispiel mit einer bis drei Niederalkylgruppen substituiert sein können, wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Isopropylgruppen. Als Alkohole, die für diese Gruppe typisch sind, sollten Cyclohexanol, Cyclohexandiol, 1,2,3-Cyclohexantriol und 1,3,5-Cyclohexantriol (Phloroglucitol) oder Inosit erwähnt werden, ebenso wie die Alkohole, die sich von p-Menthan ableiten, wie Carvomenthol, Menthol, α - und γ -Terpineol, 1-Terpinenol, 4-Terpinenol und Piperitol oder das Gemisch dieser Alkohole als "Terpineol", 1,4- und 1,8-Terpin.

[0055] Von den Alkoholen, die sich von Kohlenhydraten mit kondensierten Ringen ableiten, zum Beispiel die der Thujan-, Pinan- oder Camphangruppe, sind auch Thujanol, Sabinol, Pinolhydrat, D- und L-Borneol und D- und L-Isoborneol nützlich.

[0056] Aliphatisch-cycloaliphatische polycyclische Alkohole, die für die Ester der vorliegenden Erfindung verwendet werden sollen, sind Sterine, Cholsäuren und Steroide, wie die Sexualhormone und ihre synthetischen Analoga und insbesondere Corticosteroide und ihre Derivate. So ist es möglich, zum Beispiel zu verwenden: Cholesterin, Dihydrocholesterin, Epidihydrocholesterin, Coprostanol, Epicoprostanol, Sitosterin, Stigmasterin, Ergosterin, Cholsäure, Desoxycholsäure, Lithocholsäure, Estriol, Estradiol, Equilenin, Equilin und deren Alkylderivate, ebenso wie Ethinyl- oder Propinyl-derivate in Position 17, zum Beispiel 17- α -Ethinylestradiol oder 7- α -Methyl-17- α -Ethinylestradiol, Pregnenolon, Pregnandiol, Testosteron und seine Derivate, wie 17- α -Methyltestosteron, 1,2-Dehydrotestosteron und 17- α -Methyl-1,2-dehydrotestosteron, Alkinylderivate in Position 17 von Testosteron und 1,2-Dehydrotestosteron, wie 17- α -Ethinyltestosteron, 17- α -Propinyltestosteron, Norgestrel, Hydroxyprogesteron, Corticosteron, Desoxycorticosteron, 19-Nortestosteron, 19-Nor-17- α -methyltestosteron und 19-Nor-17- α -Ethinyltestosteron, Cortison, Hydrocortison, Prednison, Prednisolon, Fludrocortison, Dexamethason, Betamethason, Paramethason, Flumethason, Fluocinolon, Fluprednylidin, Clobetasol, Beclome-

tason, Aldosteron, Desoxycorticosteron, Alfaxalon, Alfadolon, Bolasteron.

[0057] Nützliche veresternde Komponenten für die Ester der vorliegenden Erfindung sind Genine (Aglykone) von herzwirksamen Glycosiden, wie Digitoxigenin, Gitoxigenin, Digoxigenin, Strophanthidin, Tigogenin oder Saponine.

[0058] Andere Alkohole, die gemäß der Erfindung verwendet werden können, sind Vitaminalkohole wie Axerophthol, Vitamin D₂ und D₃, Aneurin, Lactoflavin, Ascorbinsäure, Riboflavin, Thiamin oder Panthothensäure.

[0059] Heterocyclische Alkohole können als Derivate von den vorgenannten cycloaliphatischen oder aliphatisch-cycloaliphatischen Alkoholen betrachtet werden, wenn ihre linearen oder cyclischen Ketten durch ein oder mehrere, zum Beispiel zwischen einem und drei, Heteroatome unterbrochen werden, ausgewählt aus -O-, -S-, -N und -NH, und in diesen kann es eine oder mehrere ungesättigte Bindungen, zum Beispiel Doppelbindungen, geben, insbesondere zwischen einer und drei, wobei somit auch heterocyclische Verbindungen mit aromatischen Strukturen eingeschlossen sind. Die folgenden Beispiele sind besonders nützlich: Furfurylalkohol, Alkaloide und Derivate wie Atropin, Scopolamin, Cinchonin, Cinchonidina, Chinin, Morphin, Codein, Nalorphin, N-Butylscopolammoniumbromid, Ajmalin; Phenylethylamine wie Ephedrin, Isoproterenol, Epinephrin; Phenothiazin-Wirkstoffe wie Perphenazin, Pipothiiazin, Carphenazin, Homofenazin, Acetophenazin, Fluphenazin, N-Hydroxyethylpromethazinchlorid; Thioxanthen-Wirkstoffe wie Flupenthizol und Clopenthizol; Antikonvulsiva wie Meprophenidol; Antipsychotika wie Opipramol; Antiemetika wie Oxypendil; Analgetika wie Carbetidin und Phenoperidin und Methadol; Hypnotika wie Etodroxizin; Anorektika wie Benzhydrol und Diphemethoxidin; milde Tranquilizer wie Hydroxyzin; Muskelrelaxantien wie Cinnamedrin, Diphyllin, Mephenesin, Methocarbamol, Chlorphenesin, 2,2-Diethyl-1,3-propandiol, Guaifenesin, Idrocilamid; koronargefäßweiternde Mittel wie Dipyridamol und Oxyfedrin; Adrenolytika wie Propanolol, Timolol, Pindolol, Bupranolol, Atenolol, Metoprolol, Practolol; Antineoplastika wie 6-Azauridin, Cytarabin, Floxuridin; Antibiotika wie Chloramphenicol, Thiamphe-nicol, Erythromycin, Oleandomycin, Lincomycin; antivirale Mittel wie Idoxuridin; periphere Vasodilatoren wie Isonicotinylalkohol; Carboanhydraseinhibitoren wie Sulocarbilat; antiasthmatische und entzündungshemmende Mittel wie Tiaramid; Sulfamide wie 2-p-Sulfanylanilinoethanol.

2. Die Hyaluronsäure

[0060] In der vorliegenden Erfindung dient die Hyaluronsäure (HA) als Ausgangsmaterial zur Herstellung der ACP-Derivate oder als eine zweite Komponente in Verbindung mit den ACP-Derivaten. Die vernetzte HA kann als Ausgangssubstrat jede natürliche oder synthetische HA verwenden.

[0061] Das Substrat der Hyaluronsäure kann von jeglicher Herkunft sein, wie Säuren, die aus den vorstehenden natürlichen Ausgangsmaterialien extrahiert wurden, zum Beispiel aus Hahnenkämmen. Die ACP/HA-Formulierungen der vorliegenden Erfindung verwenden Hyaluronsäure, die entweder aus bakteriellen (WO 95/04132) oder tierischen Quellen (EP 0138572; WO 92/18543) isoliert wurde oder Hyaluronsäure, die durch in vitro enzymatische Synthese (WO 95/24497) hergestellt wurde. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, Hyaluronsäuren zu verwenden, die sich aus molekularen Fraktionen der integralen Säuren konstituieren, die direkt durch Extraktion der organischen Materialien in einem breiten Bereich von Molekulargewichten erhalten werden, zum Beispiel zwischen 90%–80% und 0,2% des Molekulargewichts der integralen Säure, bevorzugt zwischen 5% und 0,2%. Diese Fraktionen können durch verschiedene, in der Literatur beschriebene Verfahren erhalten werden, und das geschieht mittels Hydrolisieren, Oxidieren oder durch enzymatische chemische Mittel oder physikalische Verfahren, zum Beispiel mechanische oder Strahlungsverfahren, und häufig können während des Reinigungsverfahrens selbst Urextrakte erzeugt werden. Die Trennung und Reinigung der so erhaltenen Molekularfraktionen geschieht mittels bekannter Verfahren, wie durch Molekularfiltration. Eine gereinigte HY-Fraktion, die geeignet ist, erfindungsgemäß verwendet zu werden, ist zum Beispiel das als "entzündungshemmendes NIF-NaHA Natriumhyaluronat" bekannte, beschrieben von Balazs in der Abhandlung "Healon" – A guide to its use in Ophthalmic Surgery – D. Miller & R. Stegmann, Hrsg. John Wiley & Sons N. Y. 81983: S. 5.

[0062] Ebenfalls besonders wichtig als Ausgangsmaterialien für die ACP-Ester sind zwei gereinigte Fraktionen, die aus Hyaluronsäure erhalten werden können, zum Beispiel diejenigen, die aus Hahnenkämmen extrahiert sind, bekannt unter den Namen "Hyalastin" und "Hyalectin". Die Fraktion Hyalastin weist ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 50000 bis 100000 auf, während die Fraktion Hyalectin ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 50000 bis 730000 aufweist. Es wurde auch eine vereinigte Fraktion dieser beiden Fraktionen isoliert und mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen etwa 250000 und etwa 350000 charakterisiert. Diese vereinigte Fraktion kann mit einer Ausbeute von 80% der gesamten Hyaluron-

säure, die in dem besonderen Ausgangsmaterial erhältlich ist, erhalten werden, während die Fraktion Hyalectin mit einer Ausbeute von 30% und die Fraktion Hyalastin mit einer Ausbeute von 50% der Ausgangs-HY erhalten werden kann. Die Herstellung dieser Fraktionen ist in der vorstehend erwähnten Europäischen Offenlegungsschrift Nr. 0138572 A3 beschrieben.

[0063] Die Erfindung wird durch die folgenden illustrativen Beispiele veranschaulicht.

3. Herstellung der ACP-Derivate

Beispiel 1

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0064] 1% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0065] 99% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0066] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 170000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,01 g (0,1 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0067] Eine Lösung von 0,026 g (0,1 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0068] Eine Lösung, die aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugt wurde, wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal mit 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen wird und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0069] 3,79 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 2

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0070] 5% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0071] 95% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0072] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 85000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,051 g (0,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0073] Eine Lösung von 0,128 g (0,5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0074] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal in 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0075] 3,95 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird

gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 3

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0076] 10% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0077] 90% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0078] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 620000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,101 g (1,0 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0079] Eine Lösung von 0,255 g (1,0 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0080] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal in 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0081] 3,93 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 4

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0082] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0083] 75% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0084] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 170000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0085] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0086] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal in 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0087] 3,85 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 5

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0088] 50% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0089] 50% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0090] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 85000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,506 g (5,0 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0091] Eine Lösung von 1,28 g (5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0092] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal in 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0093] 3,65 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 6

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0094] 75% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0095] 25% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0096] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 170000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,759 g (7,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0097] Eine Lösung von 1,92 g (7,5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0098] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal in 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0099] 3,54 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 7

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0100] 100% Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0101] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 70000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 1,012 g (10 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0102] Eine Lösung von 2,55 g (10 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0103] Das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und sechsmal in 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0104] 3,52 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 8

HERSTELLUNG DES PARTIELLEN ETHYLESTERS DER VERNETZTEN HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0105] 25% der Carbonsäuregruppen sind mit Ethanol verestert;

[0106] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0107] 50% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0108] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 170000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,390 g (2,5 mEq) Ethyliodid werden zugegeben und die Lösung wird für 12 Stunden bei 30°C gehalten. 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0109] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-Methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0110] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal in 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0111] 3,84 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Ethoxygruppen wird gemäß dem Verfahren von R. H. Cundiff und P. C. Markunas (Anal. Chem. 33, 1028–1930 (1961)) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 9

HERSTELLUNG DES PARTIELLEN ETHYLESTERS DER VERNETZTEN HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0112] 50% der Carbonsäuregruppen sind mit Ethanol verestert;

[0113] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0114] 25% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0115] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 85000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,780 g (5,0 mEq) Ethyliodid werden zugegeben und die Lösung wird für 12 Stunden bei 30°C gehalten. 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0116] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-Methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0117] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal in 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0118] 3,87 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Ethoxygruppen wird gemäß dem Verfahren von R. H. Cundiff und P. C. Markunas (Anal. Chem. 33, 1028–1930 (1961)) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 10

HERSTELLUNG DES PARTIELLEN ETHYLESTERS DER VERNETZTEN HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0119] 75% der Carbonsäuregruppen sind mit Ethanol verestert;

[0120] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0121] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 170000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 1,17 g (7,5 mEq) Ethyliodid werden zugegeben und die Lösung wird für 12 Stunden bei 30°C gehalten. 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0122] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-Methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0123] Das so erhaltene Gemisch wird langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der filtriert und fünfmal in 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0124] 3,91 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Ethoxygruppen wird gemäß dem Verfahren von R. H. Cundiff und P. C. Markunas (Anal. Chem. 33, 1028–1930 (1961)) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 der "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 11

HERSTELLUNG DES PARTIELLEN CORTISONESTERS (C21) DER VERNETZTEN HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0125] 20% der Carbonsäuregruppen sind mit Cortison verestert.

[0126] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0127] 55% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0128] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 70000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst. 0,85 g (2 mEq) 21-Brom-4-pregnen-17- α -ol-3,11,20-trion werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 24 Stunden bei 30°C gehalten. 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0129] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0130] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal mit 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0131] 4,5 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung des Cortisons, eine milde alkalische Hydrolyse mit einer alkoholisch-wässrigen Lösung von Na₂CO₃ und Extraktion mit Chloroform wird gemäß B. P. durchgeführt.

[0132] Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 von "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 12

HERSTELLUNG DES GEMISCHTEN PARTIELLEN ETHANOL- UND CORTISONESTERS (C21) DER VERNETZTEN HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0133] 20% der Carbonsäuregruppen sind mit Cortison (C21) verestert.

[0134] 25% der Carbonsäuregruppen sind mit Ethanol verestert.

[0135] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0136] 30% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0137] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 85000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst. 0,39 g (2,5 mEq) Ethyliodid werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 12 Stunden bei 30°C gehalten. 0,85 g (2 mEq) 21-Brom-4-pregnen-17- α -ol-3,11,20-trion werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 24 Stunden bei 30°C gehalten. 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0138] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei

30°C gehalten.

[0139] Eine aus 100 ml Wasser und 2,5 g Natriumchlorid erzeugte Lösung wird dann zugegeben und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal mit 100 ml Aceton/Wasser 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0140] 4,41 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung des Cortisons, eine milde alkalische Hydrolyse mit einer alkoholisch-wässrigen Lösung von Na_2CO_3 und Extraktion mit Chloroform wird gemäß B. P. durchgeführt.

[0141] Die quantitative Bestimmung der Ethoxygruppen wird gemäß dem Verfahren von R. H. Cundiff und P. C. Markunas (Anal. Chem. 33, 1028–1930 (1961)) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 von "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 13

HERSTELLUNG DER GEMISCHTEN ETHANOL- UND CORTISONESTER (C21) DER VERNETZTEN HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0142] 20% der Carbonsäuregruppen sind mit Cortison verestert (C21).

[0143] 70% der Carbonsäuregruppen sind mit Ethanol verestert.

[0144] 10% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0145] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 170000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst. 1,09 g (7 mEq) Ethyliodid werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 12 Stunden bei 30°C gehalten. 0,85 g (2 mEq) 21-Brom-4-pregnen-17- α -ol-3,11,20-trion werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 24 Stunden bei 30°C gehalten. 0,101 g (1,0 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0146] Eine Lösung von 0,255 g (1,0 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0147] Das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und fünfmal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0148] 4,58 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung des Cortisons, eine milde alkalische Hydrolyse mit einer alkoholisch-wässrigen Lösung von Na_2CO_3 und Extraktion mit Chloroform, wird gemäß B. P. durchgeführt.

[0149] Die quantitative Bestimmung der Ethoxygruppen wird gemäß dem Verfahren von R. H. Cundiff und P. C. Markunas (Anal. Chem. 33, 1028–1930 (1961)) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 von "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben wird, durchgeführt.

Beispiel 14

ZUBEREITUNG MIT KANAMYCIN VON DEM SALZ EINER VERNETZTEN HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0150] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0151] 75% der Carbonsäuregruppen mit Kanamycin.

[0152] 4,39 g des partiellen Tetrabutylammoniumsalzes (25%) der Hyaluronsäure, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst. 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0153] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0154] Das so erhaltene Gemisch wird langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und fünfmal mit 100 ml Diacetonalkohol gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0155] Der Niederschlag wird in 400 ml destilliertem Wasser suspendiert und auf 5°C gekühlt, wonach eine Lösung zugegeben wird, die durch Lösen von 1,1 g Kanamycinsulfat (7,5 mEq) in 25 ml destilliertem H₂O und Eluieren von einer Säule, die 15 ml quartäres Ammoniumharz (Dowex 1 × 8) in der OH-Form enthielt, erhalten wurde, während das Rühren für 30 Minuten fortgeführt wird. Das so erhaltene Gemisch wird gefriergetrocknet.

[0156] 4,6 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 von "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

[0157] Die mikrobiologische quantitative Bestimmung des Kanamycins wird durchgeführt an *B. subtilis* 6633 im Vergleich mit Standard-Kanamycin.

Beispiel 15

ZUBEREITUNG MIT AMIKACIN VON EINEM VERNETZTEN HYALURONSÄURESALZ

Produktbeschreibung

[0158] 25% der Carbonsäuregruppen sind für die interne Veresterung verwendet worden.

[0159] 75% der Carbonsäuregruppen mit Amikacin.

[0160] 4,39 g des partiellen Tetrabutylammoniumsalzes (25%) der Hyaluronsäure, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst, 0,253 g (2,5 mEq) Triethylamin werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0161] Eine Lösung von 0,639 g (2,5 mEq) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid in 60 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 15 Stunden bei 30°C gehalten.

[0162] Das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wird. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und fünfmal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0163] Der Niederschlag wird in 400 ml destilliertem Wasser suspendiert und auf 5°C gekühlt.

[0164] 1,1 g (7,5 mEq) basisches Amikacin werden unter konstantem Rühren für 30 Minuten zugegeben. Das so erhaltene Gemisch wird gefriergetrocknet.

[0165] 4,8 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 von "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben wird, durchgeführt.

[0166] Die quantitative Bestimmung des Amikacins wird mikrobiologisch an *S. aureus* 29737 durchgeführt, verglichen mit Standard-Amikacin.

Beispiel 16

HERSTELLUNG DES PARTIELLEN ETHYLESTERS VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0167] 50% der Carbonsäuregruppen sind mit Ethanol verestert.

[0168] 10% der Carbonsäuregruppen sind zur internen Veresterung verwendet worden.

[0169] 40% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0170] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 85000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst. 0,780 g (5,0 mEq) Ethyliodid werden zugegeben und die Lösung wird für 12 Stunden bei 30°C gehalten. 0,118 g (1 mEq) Pyridinchlorid werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0171] Eine Lösung von 0,16 g (1 mEq) N-Benzyl-N'-ethylcarbodiimid in 20 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 45 Stunden bei 30°C gehalten.

[0172] Eine Lösung wird dann zugegeben, die aus 100 ml Wasser und 2,5 Natriumchlorid erzeugt wurde, und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wurde. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal mit 100 ml Aceton/H₂O 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0173] 3,85 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der Ethoxygruppen wird gemäß dem Verfahren von R. H. Cundiff und P. C. Markunas (Anal. Chem. 33, 1028–1930 (1961)) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 von "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

Beispiel 17

HERSTELLUNG VON VERNETZTER HYALURONSÄURE (HY)

Produktbeschreibung

[0174] 10% der Carbonsäuregruppen sind zur internen Veresterung verwendet worden.

[0175] 90% der Carbonsäuregruppen bilden mit Natrium ein Salz.

[0176] 6,21 g HY-Tetrabutylammoniumsalz mit einem Molekulargewicht von 170000, entsprechend 10 mEq einer monomeren Einheit, werden in 248 ml DMSO bei 25°C gelöst. 0,118 g (1 mEq) Pyridinchlorid werden zugegeben und die so erhaltene Lösung wird für 30 Minuten gerührt.

[0177] Eine Lösung von 0,16 g (1 mEq) N-Benzyl-N'-ethylcarbodiimid in 20 ml DMSO wird langsam Tropfen für Tropfen über einen Zeitraum von 1 Stunde zugegeben und das Gemisch wird für 45 Stunden bei 30°C gehalten.

[0178] Eine Lösung wird zugegeben, die aus 100 ml Wasser und 2,5 Natriumchlorid erzeugt wurde, und das so erhaltene Gemisch wird dann langsam in 750 ml Aceton gegossen, wobei kontinuierlich weitergerührt wurde. Es bildet sich ein Niederschlag, der dann filtriert und dreimal mit 100 ml Aceton/H₂O 5 : 1 und dreimal mit 100 ml Aceton gewaschen und zum Schluss für 24 Stunden bei 30°C vakuumgetrocknet wird.

[0179] 3,9 g der Titelverbindung sind erhalten worden. Die quantitative Bestimmung der gesamten Estergruppen wird gemäß dem Verseifungsverfahren, das auf S. 169–172 von "Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups", 4. Ausgabe, John Wiley and Sons Publication, beschrieben ist, durchgeführt.

4. Erfindungsgemäße Formulierung

Beispiel 18

HERSTELLUNG EINER INJIZIERBAREN SUSPENSION, DIE EINEN WIRKSAMEN GRUNDBESTANDTEIL ENTHÄLT, DER AUF VERNETZTER HYALURONSÄURE (ACP) BASIERT

[0180] Ein 2 ml-Fläschchen enthält:

selbstvernetzte Hyaluronsäure (ACP)	20 mg
Natriumchlorid	17 mg
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0,1 mg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	1,2 mg
Wasser zur Injektion	2 ml

Beispiel 19

HERSTELLUNG EINER INJIZIERBAREN SUSPENSION, DIE EINEN AKTIVEN GRUNDSTOFF ENTHÄLT, DER EIN 75 : 25 GEMISCH IST, BASIEREND AUF SELBSTVERNETZTER HYALURONSÄURE UND HYALURONSÄURE-NATRIUMSALZ

[0181] Eine vorgefüllte 2 ml-Spritze enthält:

selbstvernetzte Hyaluronsäure (ACP)	15 mg
Hyaluronsäure-Natriumsalz (Hyalectin)	5 mg
Natriumchlorid	17 mg
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0,1 mg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	1,2 mg
Wasser zur Injektion	2 ml

Beispiel 20

HERSTELLUNG EINER INJIZIERBAREN SUSPENSION, DIE EINEN WIRKSAMEN GRUNDSTOFF ENTHÄLT, BASIEREND AUF SELBSTVERNETZTER HYALURONSÄURE ALS VEHIKEL FÜR EIN ENTZÜNDUNGSHEMMENDES MITTEL WIE METHYLPREDNISOLON-21-SUCCINAT-NATRIUMSALZ

[0182] Eine vorgefüllte 2 ml-Spritze enthält:

selbstvernetzte Hyaluronsäure (ACP)	20 mg
Methylprednisolon-21-Succinat-Natriumsalz	10 mg
Natriumchlorid	18 mg
Wasser zur Injektion	2 ml

Beispiel 21

HERSTELLUNG EINER INJIZIERBAREN SUSPENSION, DIE EINEN WIRKSAMEN GRUNDSTOFF ENTHÄLT, DER EIN 75 : 25 GEMISCH BASIEREND AUF SELBSTVERNETZTER HYALURONSÄURE UND HYALURONSÄURE-NATRIUMSALZ IST ALS VEHIKEL FÜR EIN ENTZÜNDUNGSHEMMENDES MITTEL WIE TRIAMCINOLONPHOSPHAT-NATRIUMSALZ

[0183] Ein 2 ml-Fläschchen enthält:

selbstvernetzte Hyaluronsäure (ACP)	15 mg
Hyaluronsäure-Natriumsalz (Hyalectin)	5 mg
Triamcinolonphosphat-Natriumsalz	20 mg
Natriumchlorid	18 mg
Wasser zur Injektion	2 ml

5. Tests an erfindungsgemäßen Formulierungen

Beispiel 22

HERSTELLUNG EINER ACP/HA-FORMULIERUNG, IN DER DIE ACP-KOMPONENTE BIS ZU EINEM NOMINALEN GRAD VON 5% SELBSTVERNETZT IST

[0184] HA mit einem Molekulargewicht im Bereich von 500–730 kDa wurde auf einen nominalen Grad von 5% vernetzt.

[0185] Die ACP/HA-Formulierungen wurden in einer Endkonzentration von 1% Gew./Gew. in Phosphatpuffer (NaCl 0,15 M, Phosphatsalze 0,002 M) mit einem pH-Wert = 6,5 durch Mischen der verschiedenen verhältnismäßigen Anteile von ACP/HA, die im Bereich von 0/100 bis 100/0% liegen, hergestellt. Man ließ die Suspensionen für 24 Stunden quellen.

[0186] Die rheologischen Eigenschaften der ACP/HA-Gemische wurden auf einem Rheometrics Fluid Spectrometer (RFS-8500), das mit mehreren Geometrien (parallele Platten von 50 mm Durchmesser: 1 mm oder 2 mm Abstand und Couette: Messbecherdurchmesser 34 mm, Messkörperdurchmesser beziehungsweise Länge 32) ausgestattet ist, bei der festgelegten Temperatur von 25°C gemessen. Aus oszillatorischen Schermessungen (typischerweise bei einem Dehnungswert von 10%) wurden die viskoelastischen Parameter G' (Speichermodul) und G'' (Verlustmodul) und η^* (komplexe Viskosität) über den Frequenzbereich von 0,01–100 rad/s erhalten.

[0187] Die Messungen zeigten an, dass ACPs, dispergiert in ausreichend hoher Polymerkonzentration und in einem wässrigen Medium gequollen, viskoelastische und transparente feststoffartige Systeme herstellen. Das in **Fig. 2A** (ACP/HA 100/0) dargestellte viskoelastische Spektrum zeigt klar ein gelartiges Verhalten. Insbesondere sind sowohl G' und G'' , wobei $G'(\omega) > G''(\omega)$ im gesamten untersuchten Frequenzbereich, leicht frequenzabhängig. Das Verhältnis von $G'/G''(\tan)$ erreicht einen konstanten Wert (0,3) für Frequenzen, die niedriger als 2 rad/s sind und er erhöht sich bei zunehmender Frequenz leicht (auf bis zu 4,0). Die komplexe Viskosität, η^* , ist einem Potenzgesetz im gesamten untersuchten Frequenzbereich folgend stark frequenzabhängig. Der scheinbare Exponent des Potenzgesetzes ist = -0,82.

[0188] Unter Verwendung der gleichen angelegten Dehnung (0,1 Dehnungseinheiten) sind die gemessenen absoluten Werte sowohl der Module als auch der komplexen Viskosität, nicht jedoch des viskoelastischen Verhaltens, durch die verwendete Geometrie merklich betroffen. Dieser Befund spiegelt den nicht-homogenen Charakter des Systems wieder. Die gelartige Reaktion von ACP (100/0) unterscheidet sich sehr von dem Verhalten eines verwickelten Geflechts, das für das HA-Ausgangsmaterial typisch ist (Kobayashi Y. et al., *Biorheology*, 1994, 31, 235–244).

[0189] Wie in **Fig. 2D** (ACP/HA 0/100) gezeigt, zeigt das mechanische Spektrum $G''(\omega) > G'(\omega)$ und in der terminalen Region $G' \propto \omega^2$ und $G'' \propto \omega$. Darüberhinaus ist $\eta^*(\omega)$ im Wesentlichen von der Frequenz unabhängig. Durch Mischen der beiden Polymere in verschiedenen Verhältnissen, während die Gesamtpolymerkonzentration (1% Gew./Gew.) konstant gehalten wird, ist es möglich, einen breiten Bereich von 2-Komponenten-Systemen zu erhalten. Insbesondere kann ein an HA reiches Gemisch (ACP/HA 30/70) als eine Suspension angesehen werden, in der sich die disperse Komponente aus einzelnen Partikeln gequollener ACP zusammensetzt und die kontinuierliche Komponente die wässrige HA-Lösung ist. Umgekehrt kann das an ACP reiche Gemisch (ACP/HA 75/25) als ein "Verbund" gesehen werden, in dem die kontinuierliche Komponente viel starrer als die disperse Komponente ist, die sich aus der wässrigen HA-Lösung zusammensetzt.

[0190] Es wird erwartet, dass die mechanische Reaktion eines derartigen Systems durch die viskoelastischen Eigenschaften der kontinuierlichen Komponente dominiert wird. Tatsächlich zeigt das viskoelastische Spektrum des an HA reichen Gemischs (**Fig. 2C**, 30/70) im gesamten untersuchten Frequenzbereich ein flüssigkeitsartiges Verhalten. Jedoch sind G' und G'' im Vergleich mit HA allein (**Fig. 2D**) erhöht (eine bemerkenswerte Zunahme im Fall von G'), insbesondere in der terminalen Region, wo die Frequenzen, die den Gelenkbewegungen bei gewöhnlicher Gehgeschwindigkeit entsprechen, eingeschlossen sind. Andererseits zeigt das viskoelastische Spektrum des an ACP reichen Gemischs (**Fig. 2B**, 75/25) ein gelartiges Verhalten ähnlich dem von ACP allein, jedoch mit einer Abnahme beider Module, insbesondere bei niedriger Frequenz. In diesem Fall zeigen G' und G'' eine höhere Frequenzabhängigkeit. Die bei niedriger Frequenz für beide Gemische beobachteten Veränderungen spiegeln die enormen Unterschiede zwischen den Modulen der zwei Komponenten in dem Medium wider.

[0191] Wie in **Fig. 3** klar gezeigt, kreuzen sich G' und G'' bei einer Frequenz, die annähernd der Bewegung des Gelenks beim Gehen entspricht (0,72 rad/s) (Kobayashi et al., Biorheology, 1994, supra), und bei $T = 25^\circ\text{C}$ als eine Funktion des ACP-Gehalts in den Gemischen. Insbesondere ist ein "Übergang" von flüssigkeitsartigem zu feststoffartigem Verhalten, der sich etwa in Entsprechung von 50% Gew./Gew. ACP-Gehalt in dem Gemisch ereignet, offensichtlich.

[0192] **Fig. 4** zeigt einen Vergleich der dynamischen Viskosität der ACP/HA-Formulierungen mit ACP/HA-Verhältnissen im Bereich von 100/0 bis 0/100. Die Verbesserung in den viskoelastischen Eigenschaften von Zusammensetzungen mit zunehmendem Gehalt an ACP ist klar ersichtlich.

Beispiel 23

HERSTELLEN UND TESTEN VON ACP/HA-FORMULIERUNGEN, IN DENEN DIE ACP-KOMPONENTE IN VERSCHIEDENEN GRADEN SELBSTVERNETZT IST

[0193] Selbstvernetzte Carboxypolysaccharide (ACP), die aus Hyaluronsäure (HA) (640000 Da) synthetisiert wurden und verwendet wurden, um Gemische aus ACP/HA herzustellen, schlossen das Folgende ein:

ACP 20%	0,5% H ₂ O
ACP 10%	0,5% H ₂ O
ACP 5%	0,5% H ₂ O

[0194] Die Werte 20, 10 und 5% beziehen sich auf den nominalen Prozentsatz der Veresterung, während 0,5% die Menge des während der Synthese zugegebenen Wassers anzeigt.

[0195] Die Formulierungen wurden durch Mischen der verschiedenen Mengen von ACP und HA (640000 Da) in Phosphatpuffer (NaCl 0,15 M und Phosphatsalze 0,002 M) bei einem pH-Wert = 6,5 hergestellt. Die Gemische hatten alle eine Endkonzentration von 10 mg/ml und wurden in einem Bereich der ACP/HA-Verhältnisse von 100/0–0/100% hergestellt. Man ließ die Suspensionen für 24 Stunden aufquellen und filtrierte dann auf Glasfiltern mit einer Porengröße von 100–40 µm.

[0196] Es wurden rheologische Messungen mit einem "Fluid Spectrometer RFS 8500" Rheometer (Rheometrics) durchgeführt. Die Geometrien wurden gemäß der Viskosität der Lösung ausgewählt: Parallele Platten (2 mm Abstand) für deutlich viskose Lösungen und Couette (1 mm Abstand) für nur leicht viskose Lösungen. Die Studien wurden in einem dynamischen Frequenz-Sweep (Bereich = 100 – 0,05 rad/s, Dehnung = 10%, $T = 25^\circ\text{C}$) durchgeführt. Die Formulierungen, die sich aus ACP/HA mit 100/0 zusammensetzten werden im Allgemeinen dadurch gekennzeichnet, dass G' für den gesamten Bereich der betrachteten Frequenzen höher als G'' ist (**Fig. 5**). Während der Grad der Vernetzung konstant gehalten wird, führt die Zugabe von größeren Mengen an HA in das Gemisch zu niedrigeren Viskositätswerten, während G' und G'' dazu neigen, sich einander anzunähern (**Fig. 6**).

[0197] Insbesondere können sich, im Fall von Formulierungen mit einem ACP-Gehalt von 50%, G' und G'' gemäß dem Typ des untersuchten ACPs überlappen oder überkreuzen in Übereinstimmung in Entsprechung zu einer oder zwei verschiedenen Frequenzen (**Fig. 7, 8**).

[0198] Die **Fig. 9, 10** und **11** zeigen die Wirkung des prozentualen Anteils der Veresterung auf die Viskosität der ACP/HA-Formulierungen mit wechselnden ACP/HA-Verhältnissen.

[0199] Es ist möglich, aus den viskoelastischen Spektren den Schluss zu ziehen, dass für ACP/HA-Formulierungen mit einem hohen ACP-Gehalt (z. B. 100/0) das Viskositätsmuster vom Typ 20% > 10% > 5% (**Fig. 9**) ist, während für 50/50 Gemische das Ergebnis 20% > 5% > 10% (**Fig. 10**) ist. Zuletzt weisen Gemische von ACP/HA 40/60, ausgehend von ACP 20% und ACP 5%, nur leichte Unterschiede in der Viskosität auf (**Fig. 11**).

[0200] Wenn es das Ziel ist, hohe Viskoelastizitätswerte zu erreichen, sollte ACP mit einem hohen Grad an Vernetzung (ACP 20%) allein (100/0) oder gemischt mit geringen Mengen Hyaluronsäure (z. B. 75/25) verwendet werden. Wenn andererseits die gewünschten Viskoelastizitätswerte nicht hoch sind (ACP/HA 40/60, 30/70), dann ist der prozentuale Anteil der Vernetzung ein wenig maßgebender Faktor.

[0201] Die vorstehend beschriebenen Ergebnisse zeigen an, dass die Vernetzung der HA, um ACP zu erzeugen, ein HA-Derivat mit viskoelastischen Eigenschaften ergibt, die denen der nicht modifizierten HA überlegen

sind. Zusätzlich können die rheologischen Eigenschaften von ACP abgestimmt werden durch Herstellen von Zusammensetzungen, die aus ACP/HA-Gemischen mit wechselnden Gewicht/Gewicht-Verhältnissen bestehen.

[0202] Auch wenn in pharmazeutische Exzipienten formuliertes ACP gelartige rheologische Profile zeigt, wurden interessante Ergebnisse durch Mischen verschiedener Mengen von ACP 10% 100/0 mit Synovialflüssigkeit von nichtosteoarthritischen Pferden erhalten.

[0203] Die Fig. 12 beziehungsweise 13 zeigen die rheologischen Profile von equiner Synovialflüssigkeit und ACP 10% 100/0, formuliert in pharmazeutische Exzipienten mit einer Konzentration von 10 mg/ml.

[0204] Die Gemische von ACP 10% mit Synovialflüssigkeit bei Endkonzentrationen von 3,3 und 5 mg/ml ACP-Gel (Fig. 14 und 15) zeigen nicht nur eine entscheidende Steigerung in allen viskoelastischen Parametern verglichen mit der Synovialflüssigkeit allein, sondern auch ein theoretisch ideales rheologisches Profil verglichen mit dem von ACP allein. Tatsächlich überkreuzen sich in Anwesenheit der Synovialflüssigkeit G' und G'' , die in ACP-basierten Formulierungen parallel laufen, oder neigen dazu, zu überkreuzen, entsprechend der Menge des zugegebenen ACPs.

[0205] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von ACP zur Synovialflüssigkeit in einer Konzentration, die erwartungsgemäß nach einer Injektion von ACP-Arzneimitteln in Gelenkverbindungen vorkommt, überraschenderweise die typischen rheologischen Profile der ACPs modifizieren könnte.

Beispiel 24

VERGLEICH DER VISKOELASTISCHEN EIGENSCHAFTEN VON ACP UND DEN VORHANDENEN HANDELSÜBLICHEN PRODUKTEN AUF HA-BASIS FÜR DIE BEHANDLUNG VON OSTEOARTHRITIS DURCH INTRA-ARTIKULÄRE INJEKTION

[0206] Die zur Zeit handelsüblichen und zur Behandlung von Arthropathien durch intra-artikuläre Injektion verwendeten Produkte auf HA-Basis schließen ein:

- ARTZ (Seikagaku, Japan), eine Formulierung auf HA-Basis mit einem Molekulargewicht zwischen 600000 und 1200000 Da;
- SYNVISIC (Biomatrix, USA), ein Zwei-Komponenten-System zusammengesetzt aus einem Gemisch von zwei vernetzten HA-Derivaten, Hylan-Fluid und Hylan-Gel (US 4,713,448).
- HYALGAN (Fidia), eine Formulierung auf HA-Basis mit einem Molekulargewicht zwischen 500000 und 730000 (EP 0138572 B1).

[0207] Die dynamische Viskosität von ACP 20%, 0,5% Wasser wurde mit der der vorstehenden pharmazeutischen Produkte verglichen. Die vier Formulierungen wiesen alle ähnliche Kennzeichen auf in Hinsicht auf die Endkonzentration von HA und die vorhandenen pharmazeutischen Exzipienten. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Fig. 16 gezeigt und zeigen an, dass die ACP-Formulierung eine überlegenere dynamische Viskosität aufweist, wenn man sie mit den drei handelsüblichen Produkten vergleicht.

[0208] Die Entwicklung von ACP/HA-Arzneimitteln war dafür bestimmt, Zusammensetzungen mit verbesserten viskoelastischen Eigenschaften und daraus folgend einer erhöhten Verweildauer im Gelenk bereitzustellen im Hinblick auf die gegenwärtig erhältlichen handelsüblichen Produkte auf HA-Basis zur Behandlung von Arthropathien. Die Änderung des Verhältnisses von ACP und HA, die in diesen Zusammensetzungen enthalten sind, gestattet auch die Herstellung von Arzneimitteln, die die optimalen rheologischen Eigenschaften für die Behandlung von Arthropathien verschiedenen Ursprungs aufweisen.

Patentansprüche

1. Arzneimittel zur Behandlung von Gelenkerkrankungen, das umfasst:

- (1) ein Gemisch aus selbstvernetzter Hyaluronsäure und nichtselbstvernetzter Hyaluronsäure, wobei die relativen Verhältnisse der selbstvernetzten Hyaluronsäure und der nichtselbstvernetzten Hyaluronsäure 95 : 05 bis 05 : 95 betragen, und
- (2) ein pharmazeutisch verträgliches Exzipient, Verdünnungsmittel oder einen Träger.

2. Arzneimittel gemäß Anspruch 1, das ferner mindestens einen pharmakologischen Wirkstoff umfasst.

3. Arzneimittel gemäß Anspruch 2, wobei die Hyaluronsäure ein Molekulargewicht von zwischen 500,000 und 1,230,000 D hat.
4. Arzneimittel gemäß Anspruch 3, wobei das Molekulargewicht zwischen 500,000 und 730,000 D liegt.
5. Arzneimittel gemäß Anspruch 2, wobei der pharmakologische Wirkstoff ein Antibiotikum ist.
6. Arzneimittel gemäß Anspruch 2, wobei der pharmakologische Wirkstoff ein steroider entzündungshemmender Stoff ist.
7. Arzneimittel gemäß Anspruch 2, wobei der pharmakologische Wirkstoff ein nicht-steroider entzündungshemmender Stoff ist.
8. Arzneimittel gemäß Anspruch 2, wobei der pharmakologische Wirkstoff ein Anästhetikum, epitheliotropes Vitamin, ein hormonartiger entzündungshemmender/analgetischer Stoff, ein Zytokin, ein Zytokinrezeptor oder ein Wachstumsfaktor ist.
9. Arzneimittel gemäß Anspruch 2, wobei der pharmakologische Wirkstoff Hyaluronsäure in Salzform ist.
10. Arzneimittel gemäß Anspruch 9, wobei die Hyaluronsäure mit einem Silber-, Kupfer-, Zink- oder Calciumsalz in ein Salz umgewandelt worden ist.
11. Verwendung eines Gemisches aus selbstvernetzter Hyaluronsäure und nichtselbstvernetzter Hyaluronsäure, wobei die relativen Verhältnisse der selbstvernetzten Hyaluronsäure und der nichtselbstvernetzten Hyaluronsäure 95 : 05 bis 05 : 95 sind, zur Herstellung eines Medikaments, das in der Behandlung von Gelenkerkrankungen verwendet wird.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

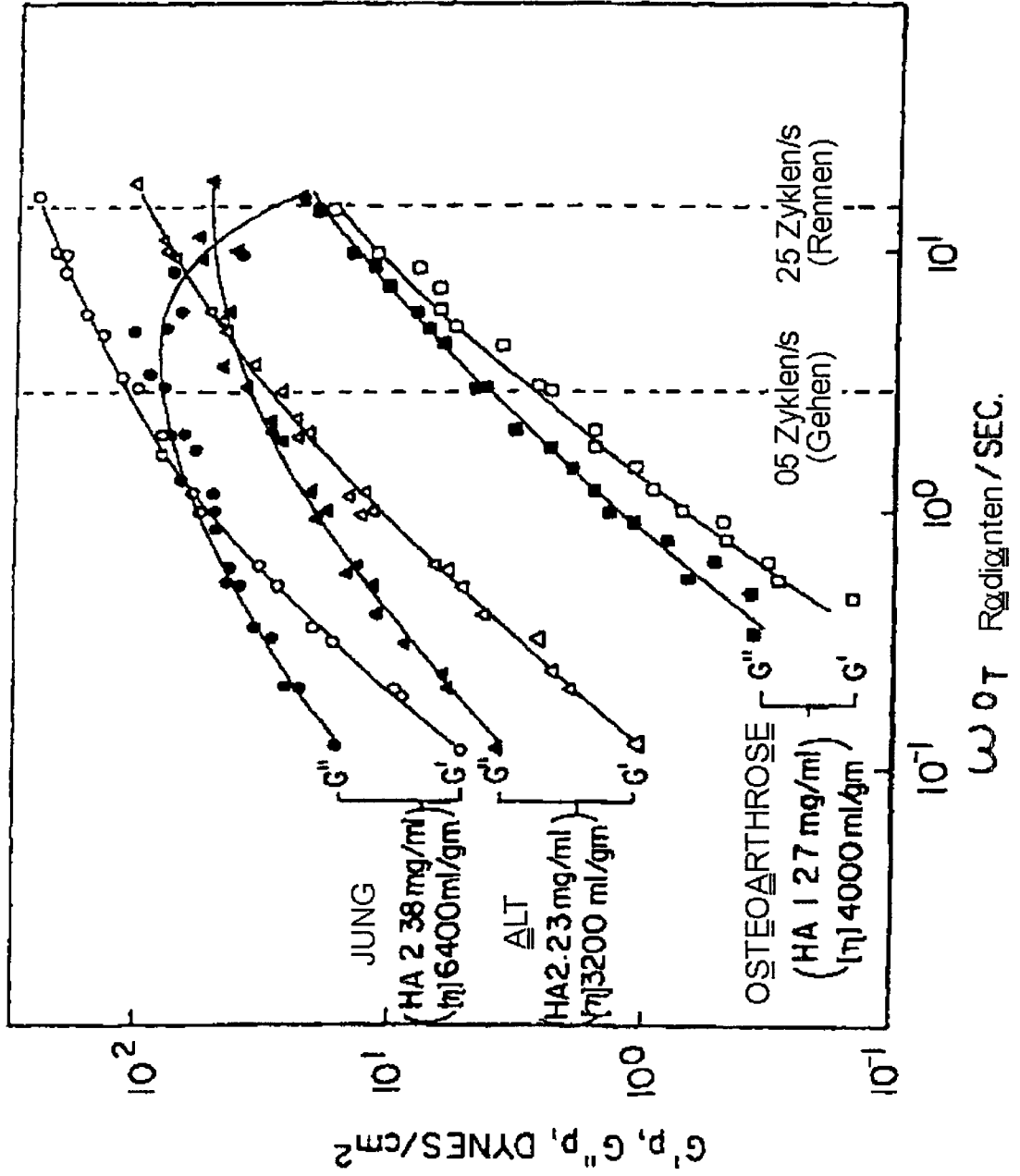


FIG. 2A

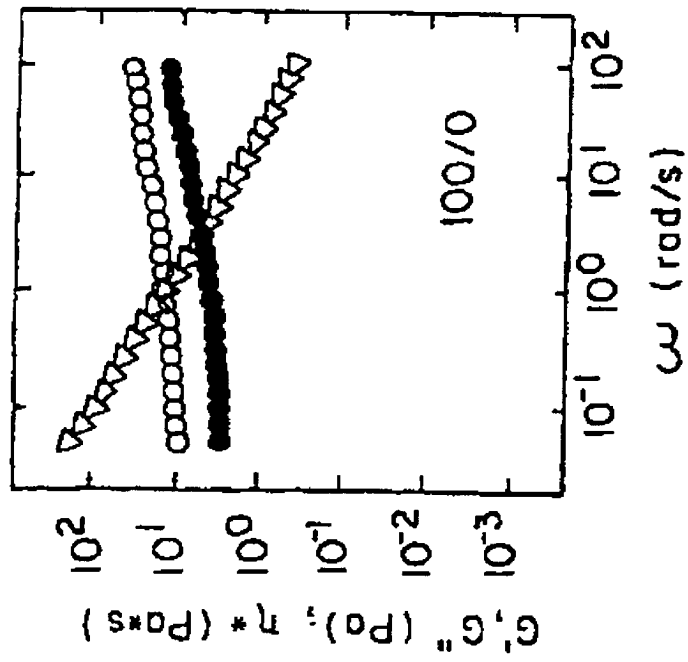


FIG. 2B

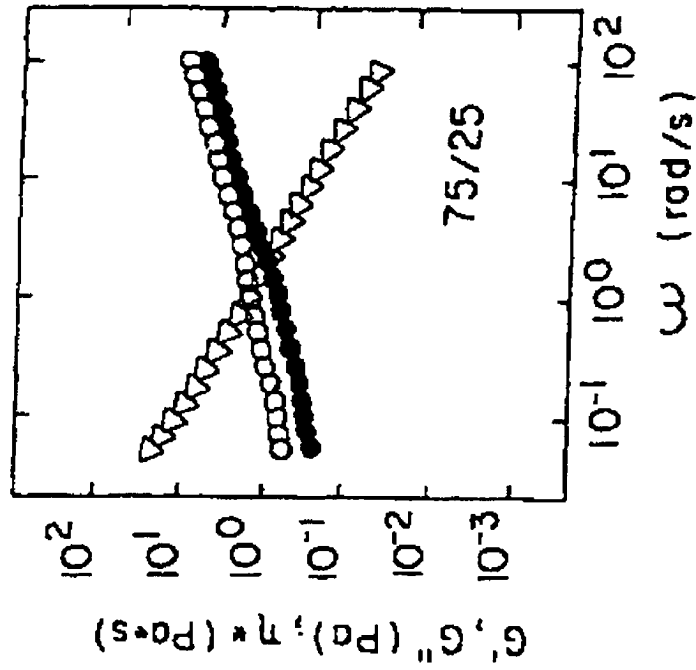


FIG. 2C

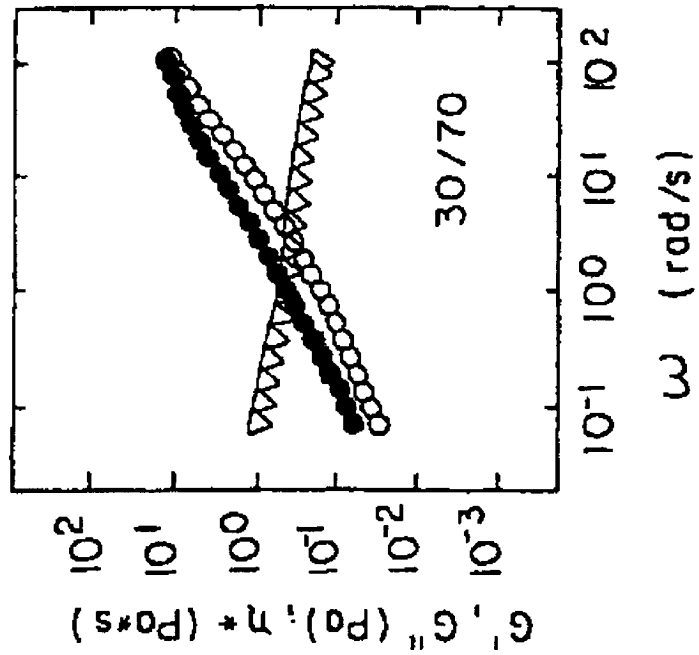
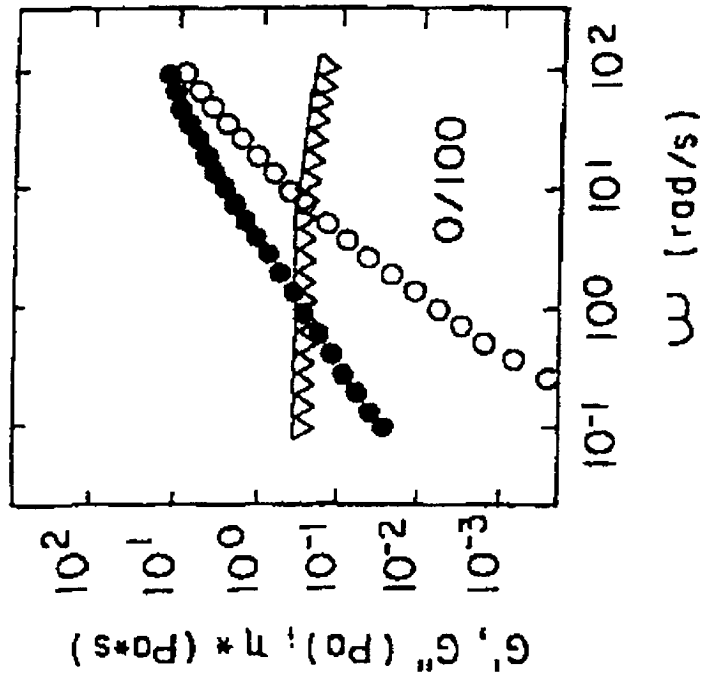


FIG. 2D



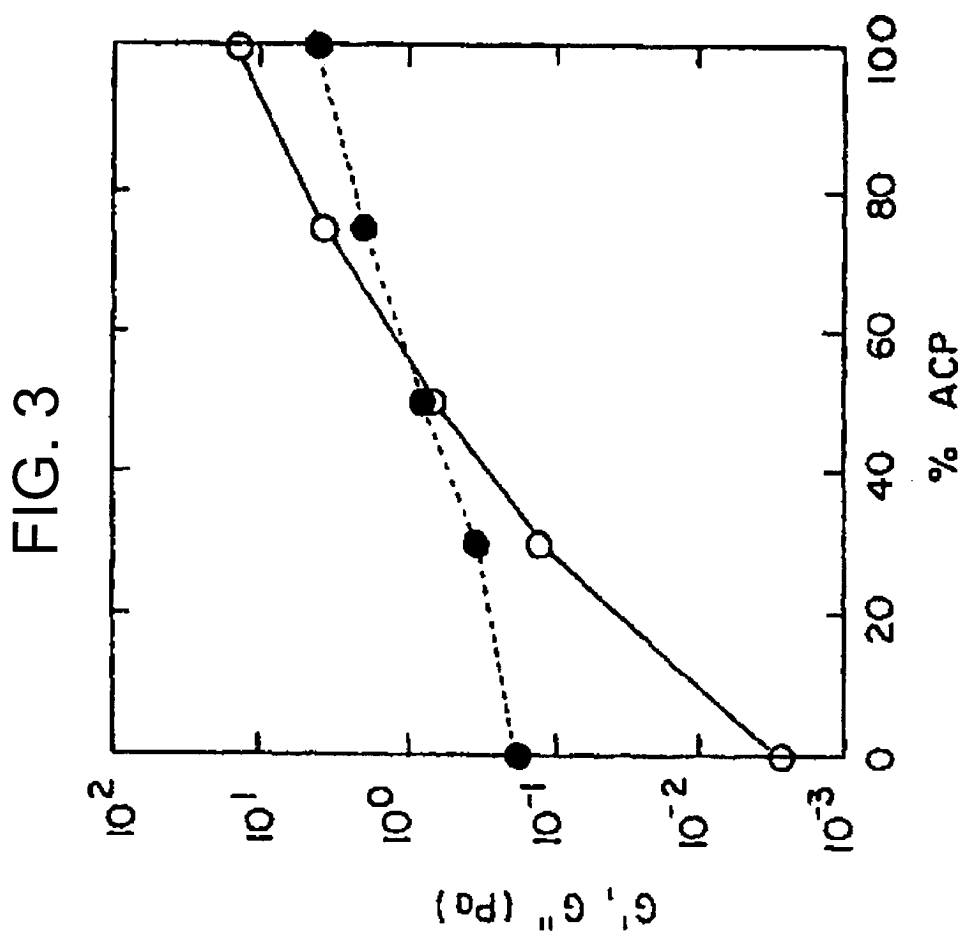
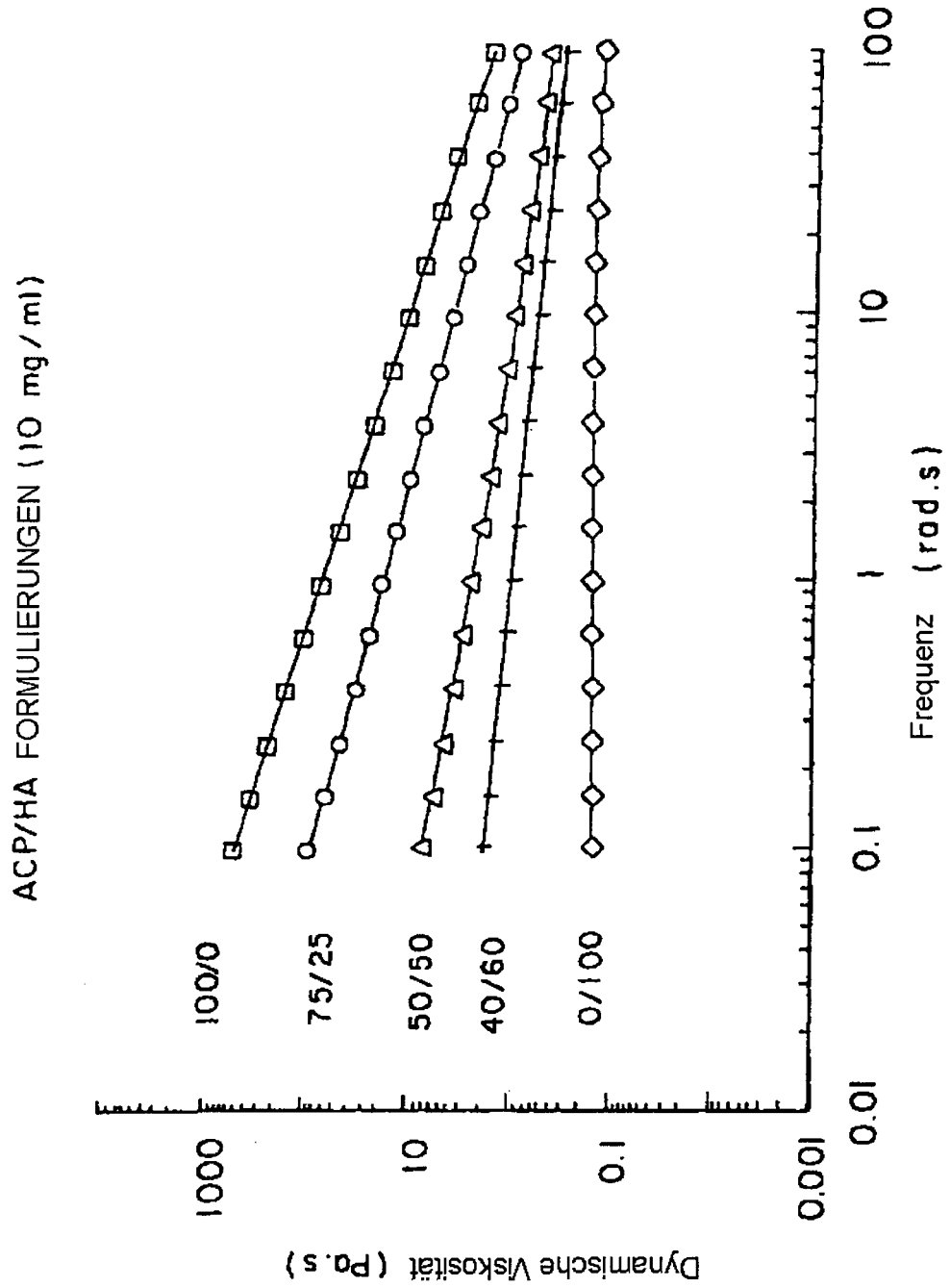


FIG. 4



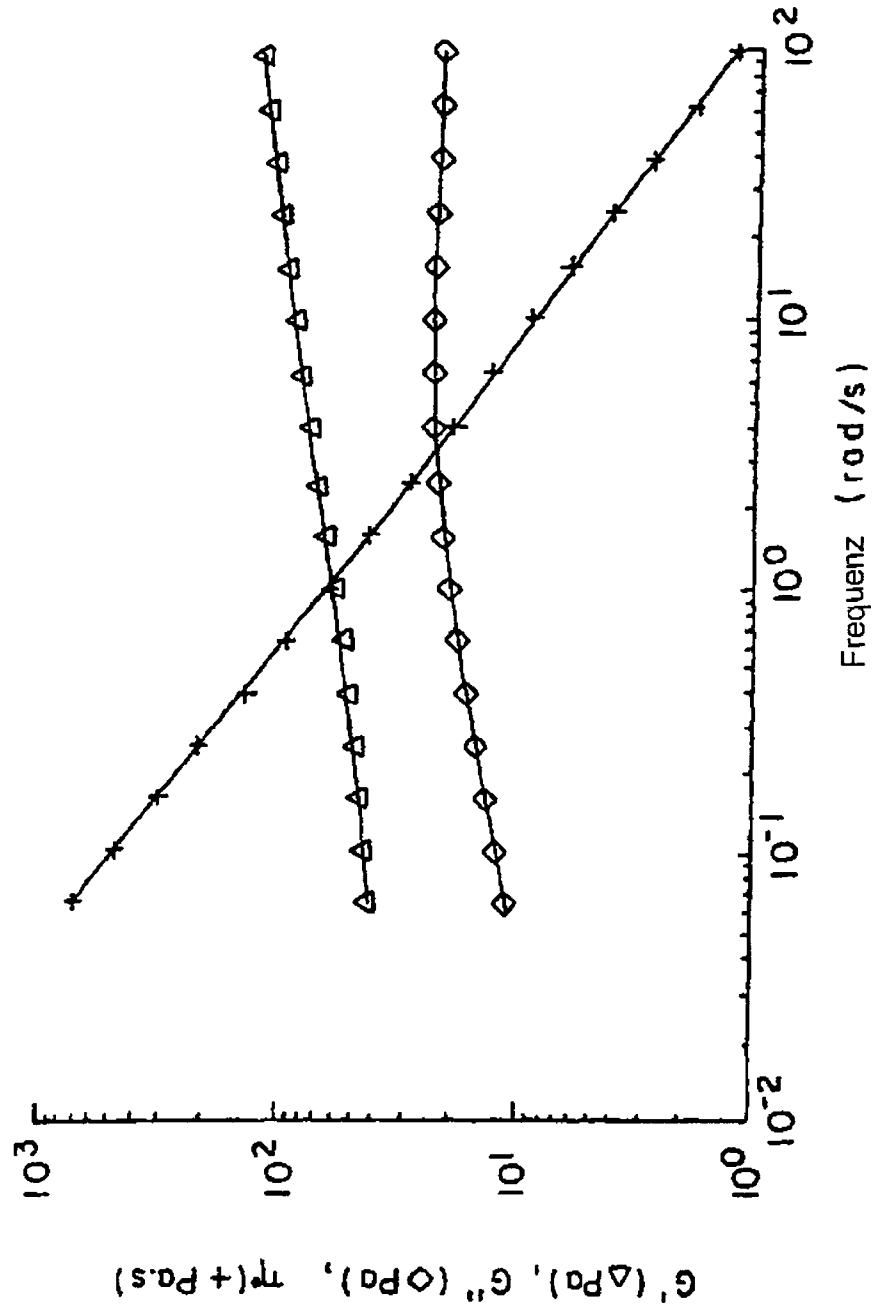
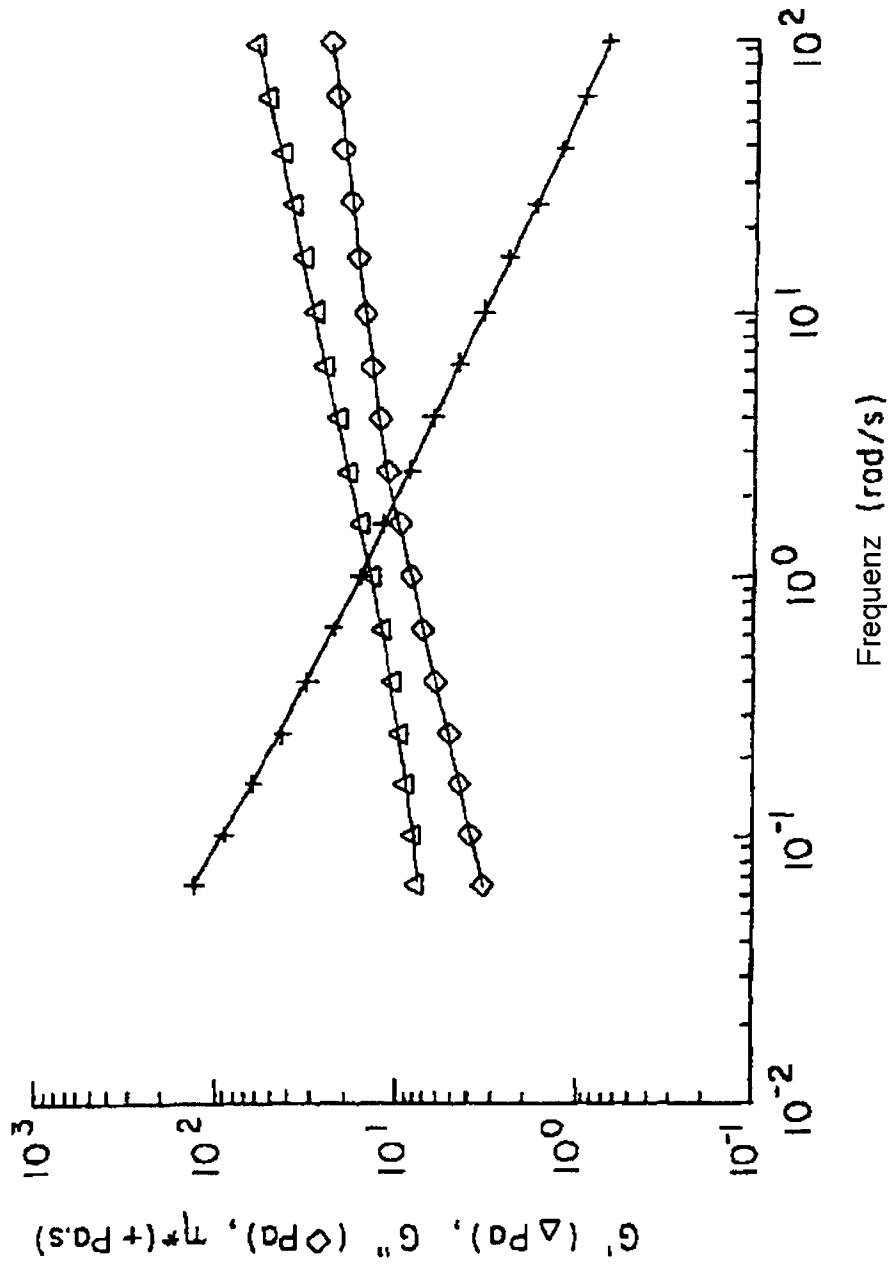


Fig. 5

Fig. 6



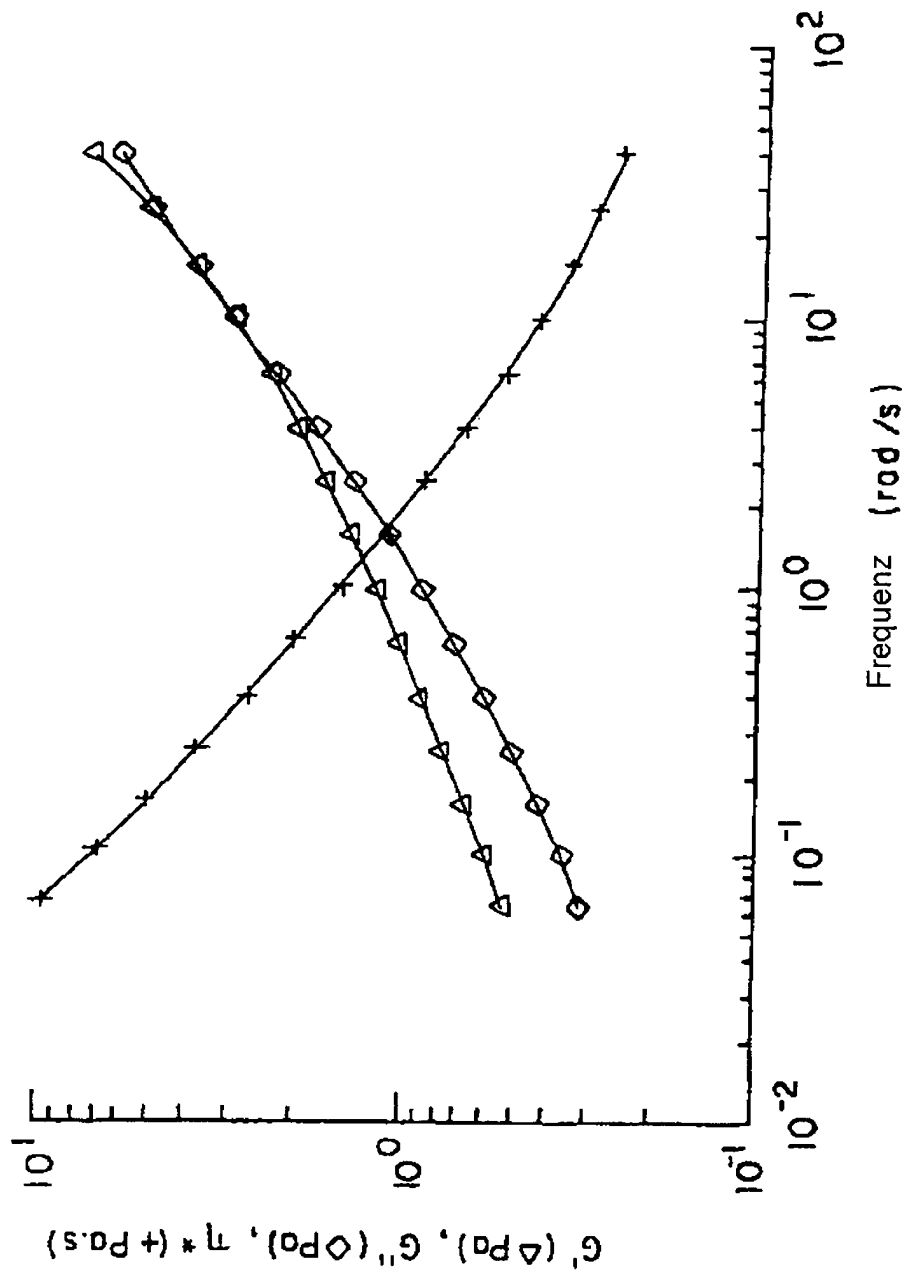


Fig. 7

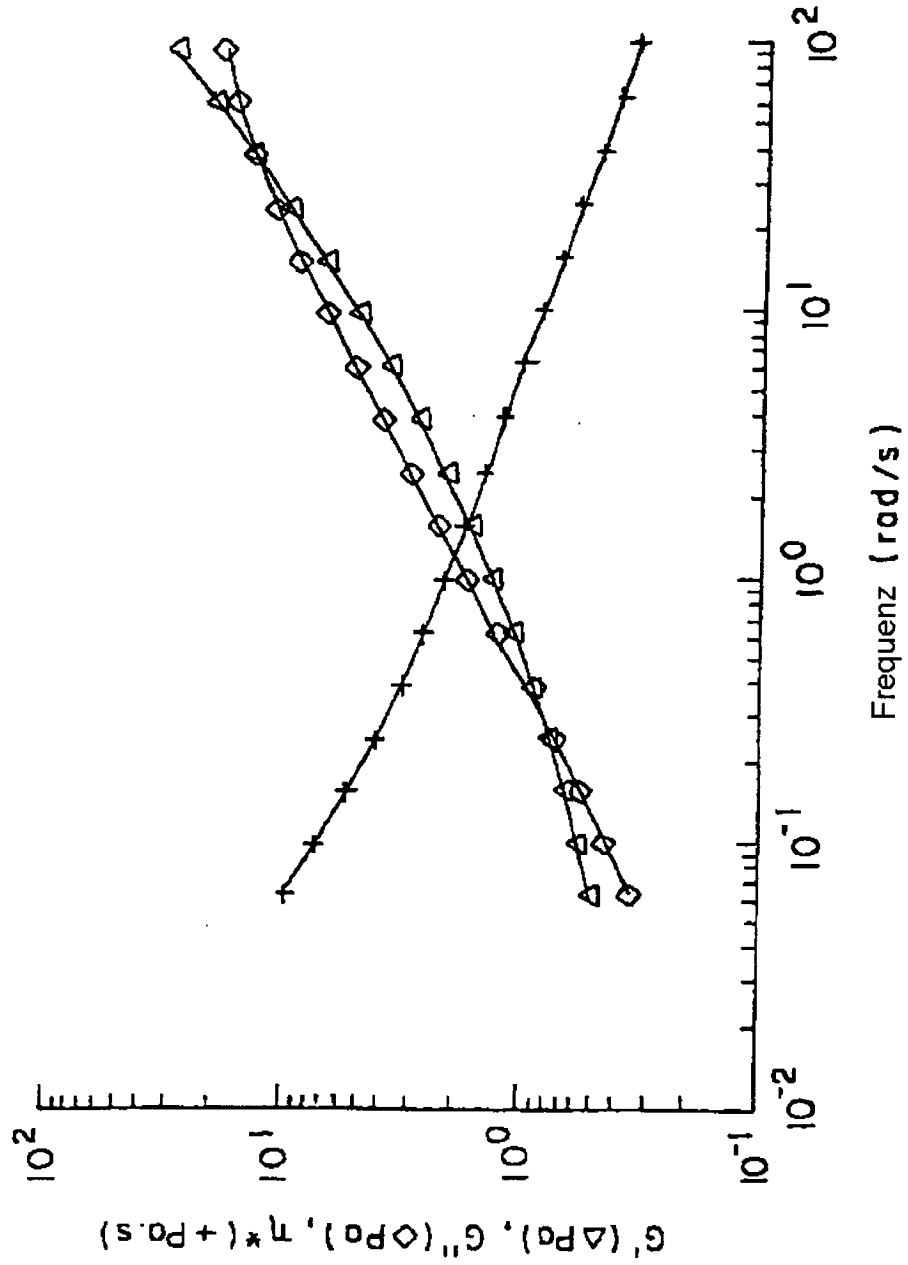


Fig. 8

Fig. 9

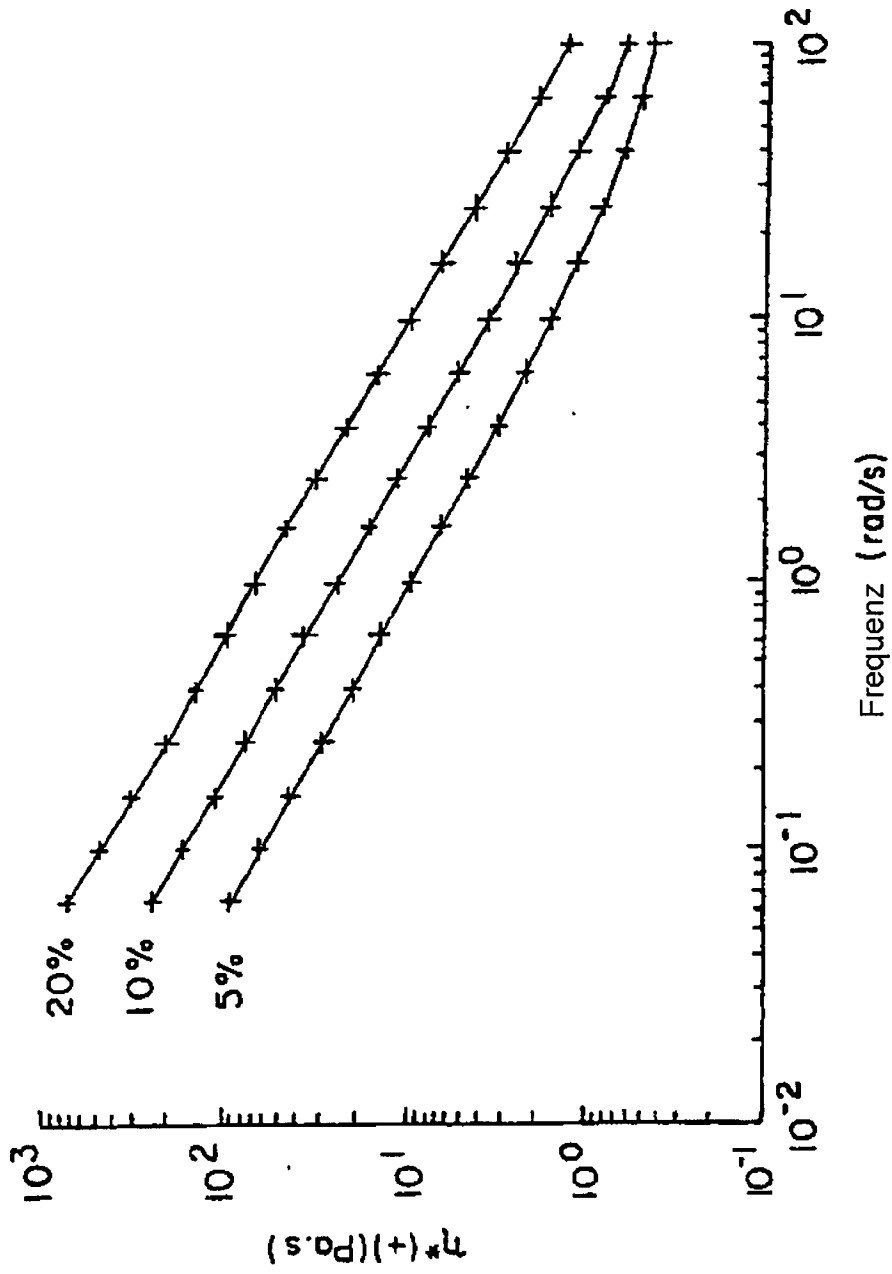
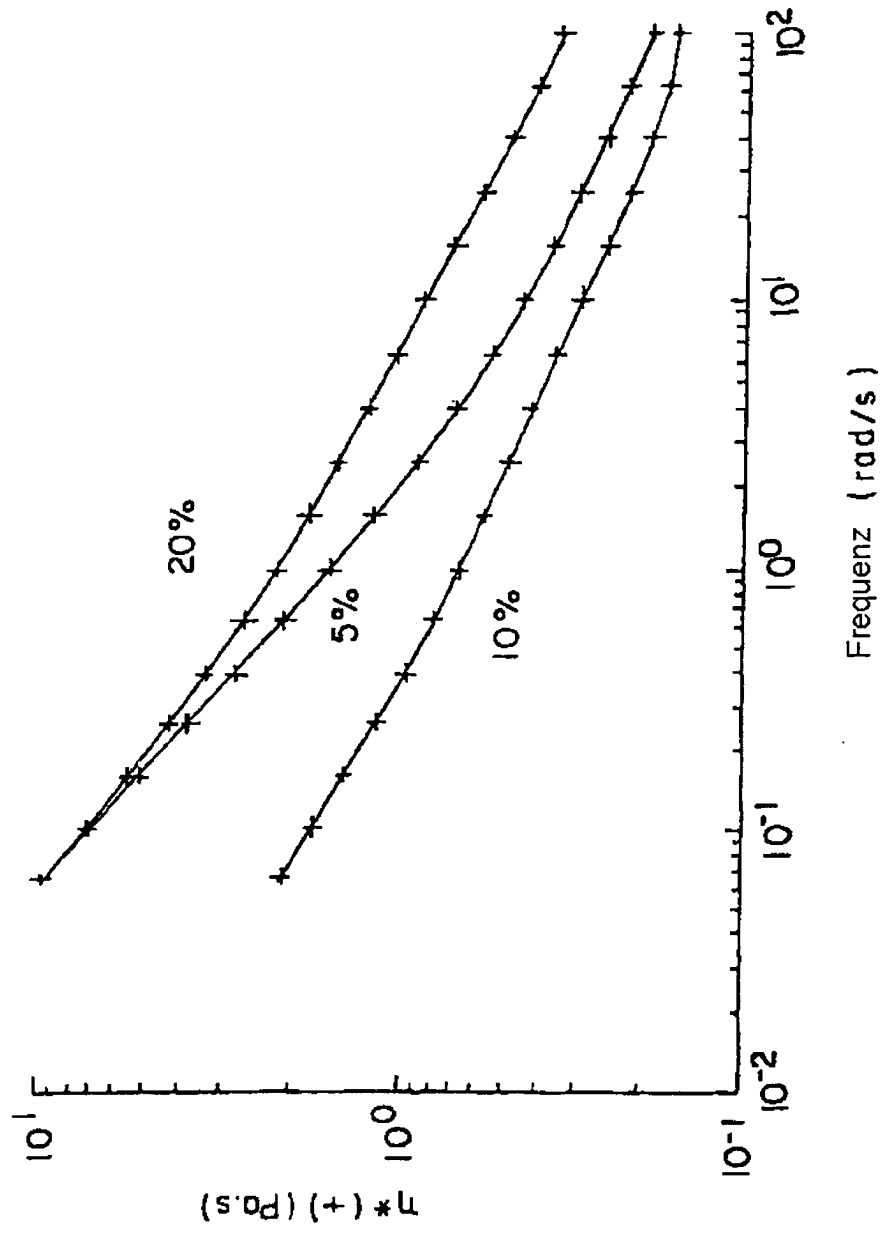


Fig. 10



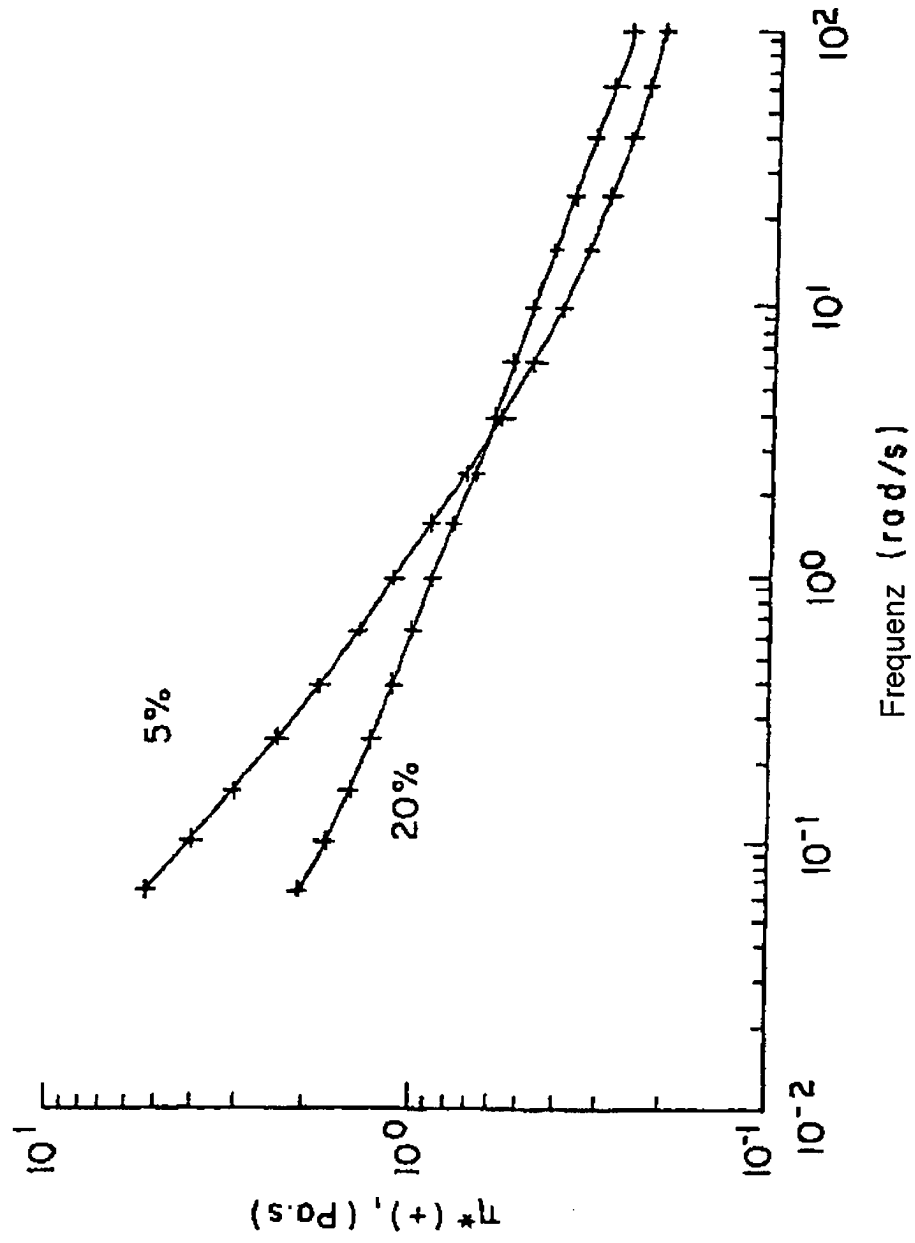
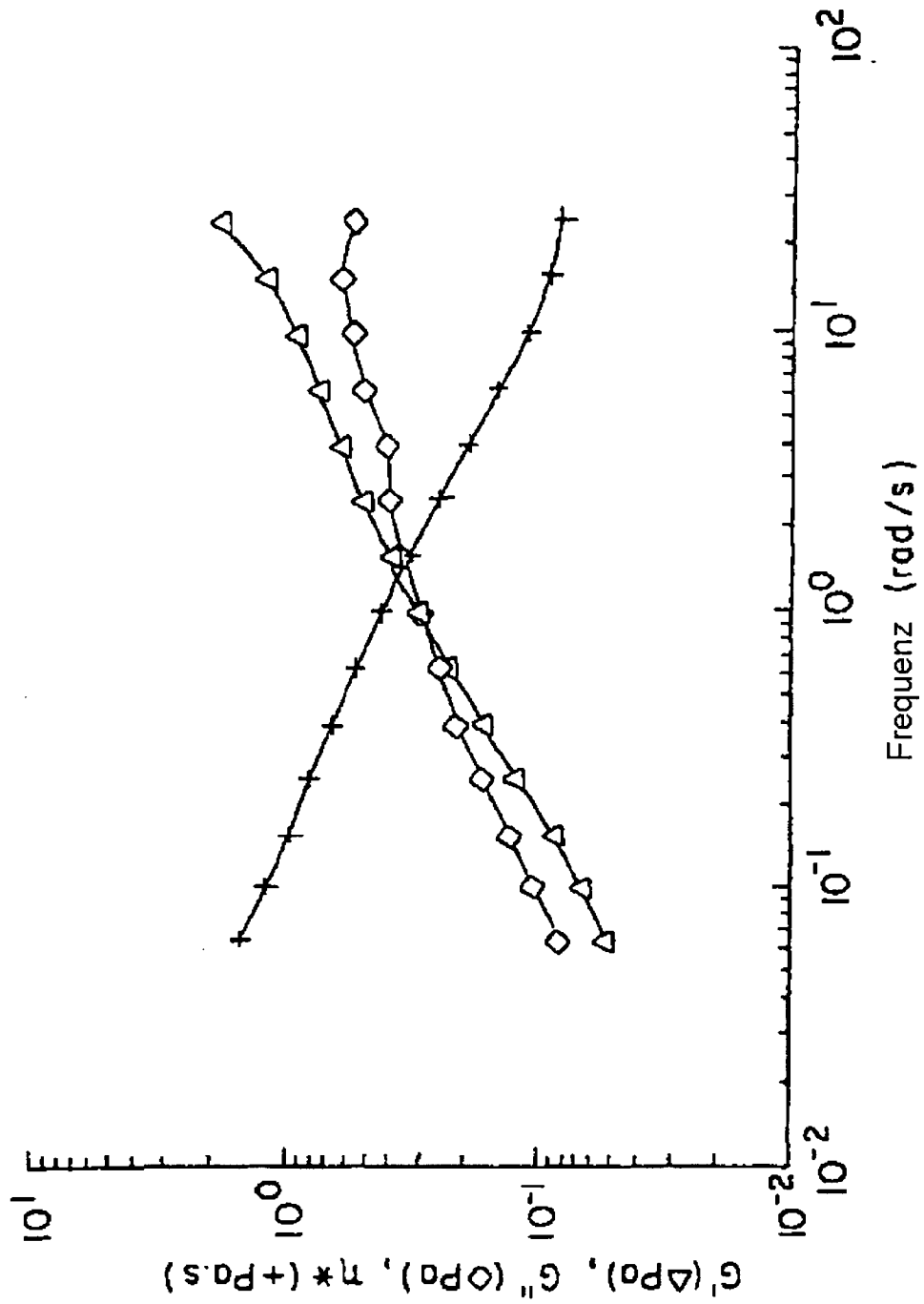


Fig. 11

Fig. 12



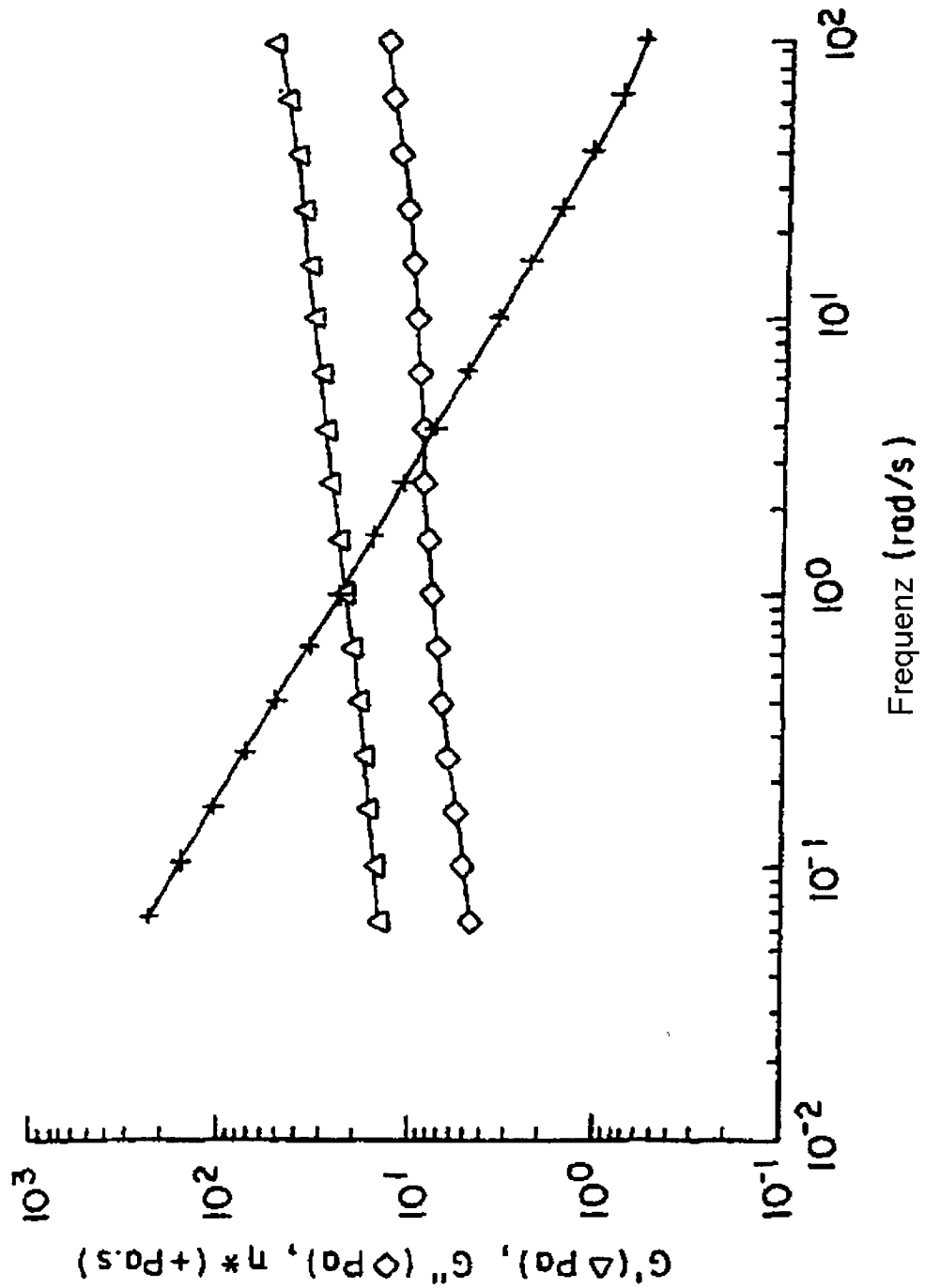
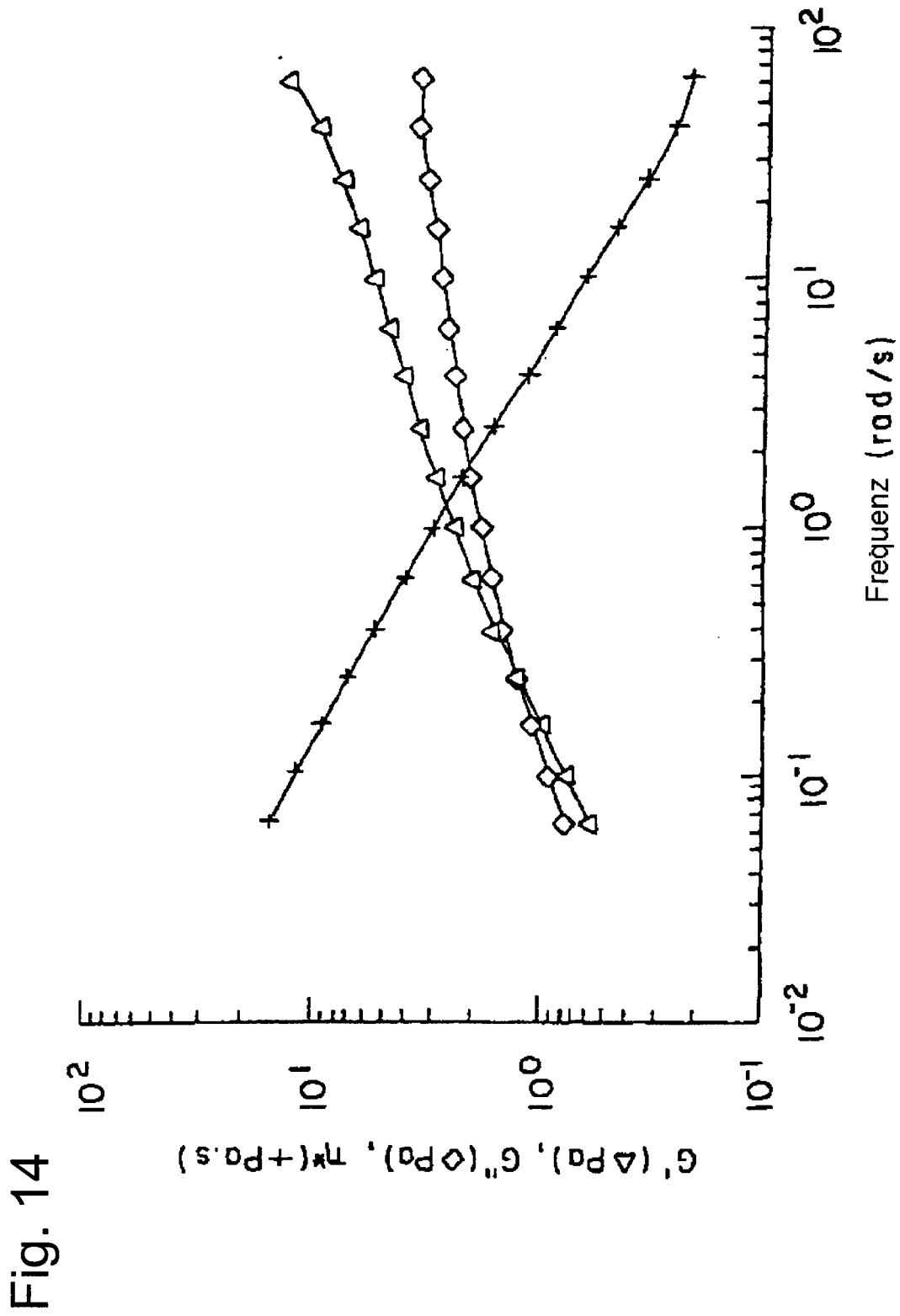


Fig. 13



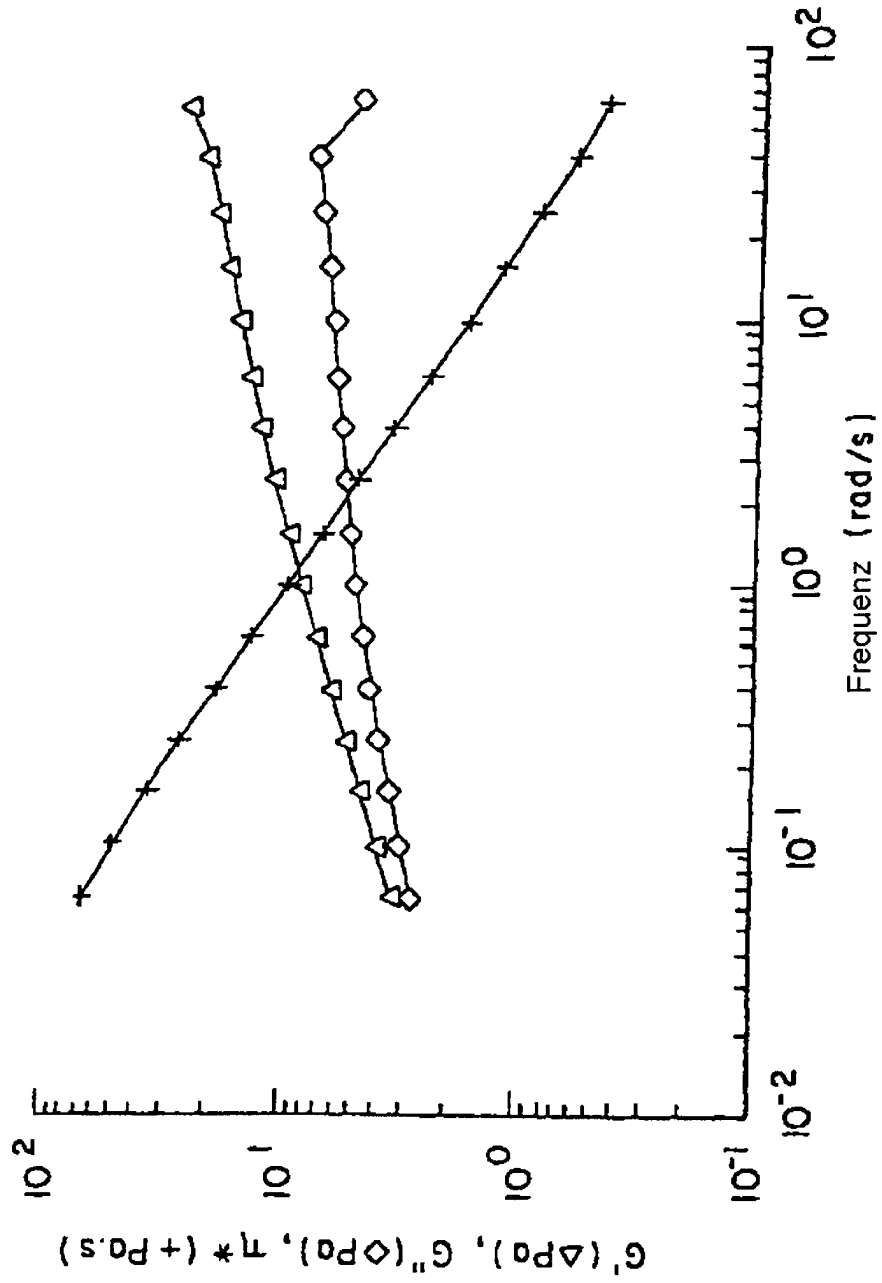


Fig. 15

Fig. 16

