

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6847091号
(P6847091)

(45) 発行日 令和3年3月24日(2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月4日(2021.3.4)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 8 B 37/08 (2006.01)	C O 8 B 37/08	Z
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 31/726 (2006.01)	A 6 1 K 31/726	

請求項の数 8 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-503836 (P2018-503836)	(73) 特許権者	517350724
(86) (22) 出願日	平成28年4月7日(2016.4.7)		ヒヤルブルー エス. アール. エル.
(65) 公表番号	特表2018-510962 (P2018-510962A)		イタリア国 26900 ローディ ヴィ
(43) 公表日	平成30年4月19日(2018.4.19)		ア エー. エインステイン エス. エヌ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2016/051960		. パルコ テクノロジーコ パダーノ内
(87) 国際公開番号	W02016/162809	(74) 代理人	100166338
(87) 国際公開日	平成28年10月13日(2016.10.13)		弁理士 関口 正夫
審査請求日	平成31年4月4日(2019.4.4)	(74) 代理人	100152054
(31) 優先権主張番号	F12015A000102		弁理士 仲野 孝雅
(32) 優先日	平成27年4月7日(2015.4.7)	(72) 発明者	バリコルディ ニクラ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	イタリア(IT)		イタリア国 45030 オッキオベッロ
			ヴィア エー. ヴォルタ 3/ビー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリコサミノグリカンエステル、それらを調製する方法および眼科用途のための製剤におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコサミノグリカンエステルであって、N - アセチルグルコサミン残基に存在するヒドロキシル基の少なくとも一部がアポカロテノイドでエステル化され、前記アポカロテノイドはレチノイン酸ではない、グリコサミノグリカンエステル。

【請求項 2】

前記グリコサミノグリカンは、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸から選択される、請求項 1 に記載のエステル。

【請求項 3】

前記アポカロテノイドは、クロセチン、ピキシン、アブシジン酸から選択される、請求項 1 に記載のエステル。

【請求項 4】

前記エステルにおけるアポカロテノイドの置換度は 0 . 1 ~ 5 % であり、前記エステルの分子量は 350 , 000 ~ 2 , 000 , 000 ダルトンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のエステル。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のエステルを調製する方法であって、ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウム塩を、水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液でイオン交換樹脂を塩化することによって最初に調製し、

前記樹脂を水で洗浄し、水に溶解したヒアルロン酸ナトリウム溶液を前記樹脂に通過さ

せ、それによって溶出液を回収し、前記溶出液を凍結乾燥させ、

このように得られた塩を、選択されたアポカロテノイドと加熱下で反応させ、前記アポカロテノイドのカルボキシ官能基が、ジメチルホルムアミド中のカルボニルジイミダゾールとの室温での反応によって活性化され、

混合物を攪拌下に置いておき、次いで塩化ナトリウムおよびエタノールの添加によって生成物を沈殿させる、

方法。

【請求項 6】

N - アセチルグルコサミン残基に存在するヒドロキシル基の少なくとも一部がアポカロテノイドでエステル化されたグリコサミノグリカンエステルを含む、青色光から眼を保護するための製剤。

10

【請求項 7】

前記グリコサミノグリカンは、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸から選択され、前記アポカロテノイドは、クロセチン、ピキシン、アブシジン酸から選択される、請求項 6 に記載の製剤。

【請求項 8】

前記製剤は、場合によりポリエチレングリコール、塩化ベンザルコニウム、またはクロルヘキシジンの存在下で、精製水中の 0 . 1 ~ 1 % の化合物の溶液の形態である、請求項 6 または 7 に記載の青色光から眼を保護するための製剤。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、眼科用途のための製剤の分野、特に青色光から眼を保護するのに有用なエステル化グリコサミノグリカンに関する。

【背景技術】

【0002】

知られているように、電灯は概日リズムに対して強い影響を及ぼし、特に、夕暮れと夜明けとの間に網膜に衝突する人工光は、睡眠を促進するニューロンの作用を阻害し、視床下部においてオレキシンの産生を活性化し、メラトニンの夜間放出を抑制し、この現象により、眠気の低下、覚醒の増加および睡眠妨害が生じる。

30

【0003】

非特許文献 1 によって行われた研究により、米国人の会社員の 30 % および夜勤者の 44 % が、平均で夜間に 6 時間未満である睡眠について不満を表していることが示され、これに対して 1960 年には米国人の成人の集団の 3 % のみがこのように少ない睡眠であった。さらに、論文により、テレビ、コンピュータスクリーン、ラップトップ、タブレットおよび携帯電話などの発光ダイオード (LED) を備えた光電子デバイスが、青色光が豊富にある白色光の種類を使用していることが示されている。眼において見出される ipRGC (感光性神経節細胞) は、低波長 (青色および緑色) で目に見える光に対して、より感受性であり、したがって非特許文献 1 は、夜間の時間における LED への露出が一般に、電球からの光への夜間の露出と比較して概日リズム、メラトニン分泌および睡眠の大きな妨害を引き起こすと述べている。

40

【0004】

非特許文献 2 によって行われたさらなる研究により、350 nm の波長における光は光受容細胞に対する損傷を引き起こすのに対して、441 nm の波長における光は網膜色素上皮を損傷することが示された。非特許文献 3 において、LED の青色光への 1 日の平均 270 秒の露出は光化学網膜損傷を導く可能性があると主張している。

【0005】

網膜に対するこの種類の損傷は非特許文献 4 によって研究されており、その非特許文献 4 には、青色光への長期の露出は網膜神経細胞を永久的に損傷すると論じられている。非特許文献 5 もまた、網膜移植に対する青色光の照射が光受容細胞の壊死に關与する超微細

50

構造の変化を生じる、インビトロでの研究を報告している。

【0006】

最近、インビトロおよびインビボでの研究により、470nmにおける青色光の照射が中枢神経系に影響を及ぼし、概日リズムの完全なリセットを引き起こし得ることが示された(非特許文献6)。

【0007】

青色光に対する物理的防護(モニター用の眼鏡およびスクリーンなど)は市場で入手可能であるが、それらの解決策は通常、大きいか、または高価である。

【0008】

さらに、コンタクトレンズがこの目的のために利用可能であるが、それは従来のレンズと同じ副作用(例えば、充血、眼感染症、角膜潰瘍)に関する。

【0009】

カロテノイドは植物および他の光合成生物に存在する有機化合物のクラスであることも知られている。それらは通常、分子内の酸素原子の存在または不在に応じて2つのクラスに分類される:第1のものはキサントフィル類であり、残りはカロテン類を含む。これらの分子の色は、吸収され、反射される波長の種類に応じて淡黄色から鮮紅までに及ぶ。

【0010】

カロテノイドに基づいた食事は、フリーラジカルによって引き起こされる損傷を防ぐことが広範に実証されている。なぜなら、二重結合が豊富にあるそれらの化合物は有害な種を酸化でき、それを身体から排除できるからである。

【0011】

アポカロテノイドと呼ばれる酸化分解産物は、多くの場合、ビタミンA(レチノール、レチノイン酸、レチナール)、ピキシンおよびクロセチンの場合のようにさらなる有益な効果を有する分子である。

【0012】

アポカロテノイドは、ピキシン(非特許文献7)およびクロシン、クロセチンのエステル(非特許文献8)の場合のように青色光を吸収できる。

【0013】

今まで、青色光からの眼の効果的な保護を確実にできる化学化合物は市場に存在していない。特許文献1は、全能幹細胞の分化のための有用な製剤としてヒアルロン酸レチノイン酸エステルを記載している。他方で、点眼剤は有効成分の投与のために最適な方法ではないこともまた、知られている。なぜなら、それらは低いバイオアベイラビリティを有するので、主に眼における排水系の存在に起因して低い治療反応に供されるからである。この理由のために、この種の製剤は所望の治療効果を達成するために複合投与を必要とする。青色光放射によって引き起こされる損傷から眼を保護できる化合物の開発に関する関心が上記から明白である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開第2004/063363号

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Czeisler、「Casting light on sleep deficiency」Nature、497、S13、2013

【非特許文献2】MasudaおよびWatanabe、「Short Wavelength Light-Induced Retinal Damage in Rats」Jpn J. Ophthalmol.、44:615-619、2000

【非特許文献3】「Evaluation of Blue-Light Hazards from Various Light Sources」、2002、Progr

10

20

30

40

50

ess in lens and Cataract Research、Tsutomu Okuno

【非特許文献4】Elawady A. Ibrahim (Neuroprotective Effects of Grape Seeds against Photo-Chemical Damage-Induced Retinal Cell Death. Nature and Science 9(11):83-89、2011)

【非特許文献5】Roehleckeら、Influence of blue light on photoreceptors in a live retinal explants system. Molecular Vision 17:876-884、2011

【非特許文献6】Jones - Manipulating circadian clock neuron firing rate resets molecular circadian rhythms and behavior - Nature Neuroscience、Advance Online Publication

【非特許文献7】Food Chemistry 141;4:3906-3912、2013

【非特許文献8】Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47:3156-3163、2006

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、N - アセチルグルコサミン残基に存在するヒドロキシル基の少なくとも一部がアポカロテノイドでエステル化される、新たなグリコサミノグリカンエステルによって上述の欠点を克服することができる。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明によるグリコサミノグリカンとは、例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸を指し、ヒアルロン酸が好ましい。本発明による使用可能なアポカロテノイドには、レチノイン酸、クロセチン、ピキシン、アブシジン酸が挙げられ得る。

【0018】

ヒアルロン酸（本明細書以下でHA）は、反復単位内にD - グルクロン酸およびN - アセチル - D - グルコサミンの交互の残基からなる天然の直鎖多糖である。

【0019】

HAは、DeLuisse (Annals of Ophthalmology 16:823-824、1984)、Laflamme (Canadian Journal of Ophthalmology 23:174-176、1988)およびSand (Acta Ophthalmologica 67:181-183、1989)に記載されているように、乾性角結膜炎などのドライアイ症候群に起因する障害のための薬物として純粋な形態で使用され得る。

【0020】

本発明によれば、他の点眼剤での事象と対照的に、ヒアルロン酸は賦形剤として使用されないが、アポカロテノイドとの反応によって新たな化学生成物を形成する。

【0021】

本発明による生成物は、当該分野において公知の方法、特に米国特許出願公開第20090239822号に記載される方法に従って調製され得る。

【0022】

例えば、ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウム (HA - TBA) 塩が、クロマトグラフィークラムに配置される樹脂で濾過される水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液 (TBAl) でイオン交換樹脂 (Amberlite (登録商標) など) を塩化することによ

10

20

30

40

50

って最初に調製される。

【0023】

全ての溶液が通過すると、樹脂は水で洗浄され、次いで水に溶解したヒアルロン酸ナトリウム溶液を塩化した樹脂に通過させ、最終的に溶出液を回収し、凍結乾燥させる。

【0024】

通常、水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液は、15～45%、好ましくは30～40%、より好ましくは40%の濃度を有するのに対して、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液は、通常、1.5～4.5g/L、好ましくは3g/Lの濃度を有する。

【0025】

上記のように得られた塩(HA-TBA)は、次いで、加熱下で選択されたアポカロテノイドと反応する。アポカロテノイドのカルボキシル官能基は、室温にてカルボニルジイミダゾールとの反応によって活性化され、得られた化合物はジメチルホルムアミド中のHA-TBAゲルにゆっくり加えられる。

10

【0026】

混合物を25～35℃で12～20時間、攪拌下に置いておき、次いで塩化ナトリウムおよびエタノールの添加によって生成物を沈殿させる。

【0027】

本発明によるエステルにおけるアポカロテノイドの置換度は0.1～5%であり、「置換度」という用語は、グリコサミノグリカン1モル当たりのアポカロテノイドのモル数を示す。本発明によるエステルは、通常、350,000～2,000,000ダルトンの分子量を有するので、アポカロテノイド残基の寄与を考慮せずにグリコサミノグリカンの平均分子量を示す。

20

【0028】

本発明による化合物は、眼投与に適した薬局方において公知の形態で製剤化され得る。例えば、それらは、可能なポリエチレングリコールの添加により、粘度を増加させた、精製水中の化合物の0.1～1%溶液、および防腐剤として塩化ベンザルコニウムまたはクロルヘキシジンとして製剤化されてもよい(あるいは単回用量パッケージングが考慮されてもよい)。

【0029】

以下の実施例はより詳細に特許請求される発明を例示する。

30

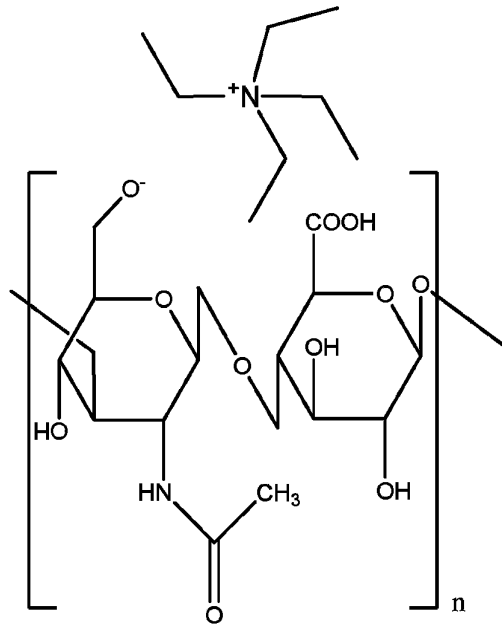
【実施例】

【0030】

実施例1

ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウム(HA-TBA)塩の調製

【化 1】



10

式中、 n は250～5000である。

【0031】

20

1.9 eq/Lの処理能力を有するイオン交換樹脂（酸性型のAmberlite（登録商標））を使用する。

【0032】

1Lの樹脂をクロマトグラフィーカラムに充填し、次いで脱塩水で洗浄し、次いで40%の水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液（TBAI）を、蠕動ポンプによって上側から樹脂で濾過する。

【0033】

全ての溶液が通過すると、溶出液が9.5～10の一定のpHを有するまで、樹脂を脱塩水で洗浄する。

【0034】

30

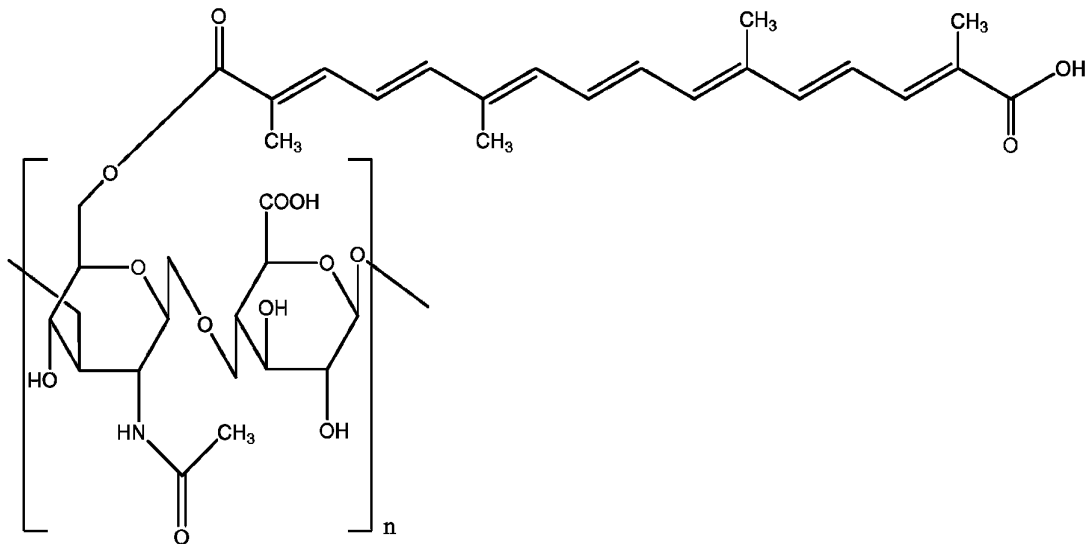
このように塩化した1リットルの樹脂により、約75～80gのヒアルロン酸ナトリウムを塩化できる。ヒアルロン酸ナトリウムを水に溶解し（約3g/Lの濃度）、得られたゲルを、以前に調製した樹脂を含有するカラムに通す。溶出液を回収し、凍結乾燥させる。

【0035】

実施例2

クロセチンによるヒアルロン酸エステルの調製

【化2】



10

nは250～5000である。

【0036】

1.5gのHA-TBAを、サーモスタットを備えるリアクタ内で500mLのDMF
に溶解し、30℃で撹拌下に置く。

20

【0037】

0.8gのクロセチンを、湿気に対して保護したリアクタ内で400mLのDMFに溶
解し、1eqのN,N-カルボニルジイミダゾールを混合物に加える。1時間後、溶液を
HA-TBAゲルにゆっくり加え、このように得られた混合物を30℃にて16時間撹拌
させる。

【0038】

90mLの飽和塩化ナトリウム溶液を添加することによって反応を停止させる。生成物
を96体積%のエタノールの添加によって沈殿させ、上清を捨て、濾過した残渣を異なる
濃度でエタノールにより数回洗浄し、次いで真空下で乾燥させる。得られた生成物は0.
5%の置換度を有する。

30

【0039】

実施例3

クロセチンによるヒアルロン酸エステルの調製

1.5gのHA-TBAを、サーモスタットを備えるリアクタ内で500mLのDMF
に溶解し、30℃で撹拌下に置く。

【0040】

0.4gのクロセチンを、湿気に対して保護したリアクタ内で200mLのDMFに溶
解し、1eqのN,N-カルボニルジイミダゾールを混合物に加える。1時間後、溶液を
HA-TBAゲルにゆっくり加え、このように得られた混合物を30℃にて16時間撹拌
させる。

40

【0041】

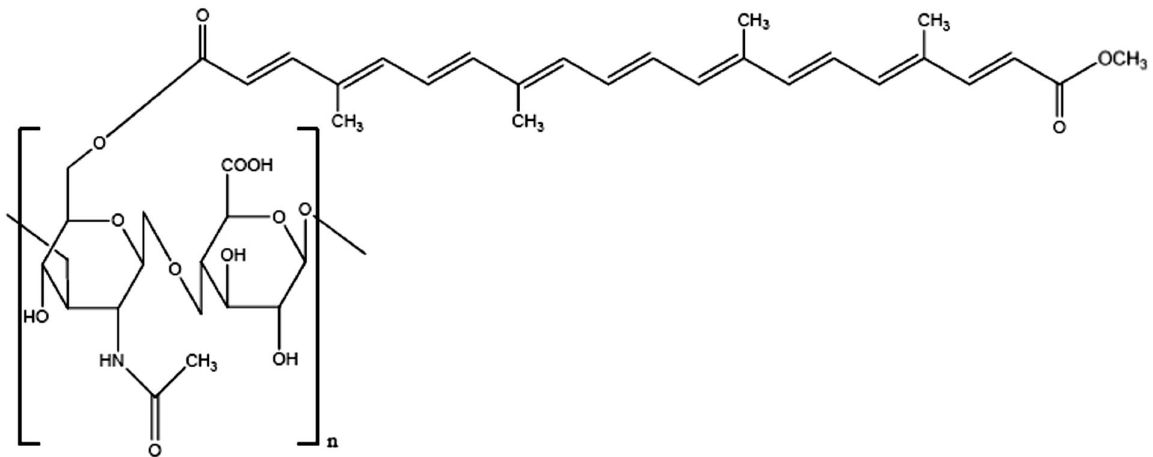
70mLの飽和塩化ナトリウム溶液を添加することによって反応を停止させる。生成物
を96体積%のエタノールの添加によって沈殿させ、上清を捨て、濾過した残渣を異なる
濃度でエタノールにより数回洗浄し、次いで真空下で乾燥させる。得られた生成物は0.
25%の置換度を有する。

【0042】

実施例4

ピキシンのヒアルロン酸エステルの調製

【化3】



10

式中、 n は250～5000である。

【0043】

1.5gのHA-TBAを、サーモスタットを備えるリアクタ内で500mLのDMFに溶解し、30℃で攪拌下に置く。

20

【0044】

0.95gの**ピキシ**ンを、湿気に対して保護したリアクタ内で450mLのDMFに溶解し、1eqのN,N-カルボニルジイミダゾールを混合物に加える。1時間後、溶液をHA-TBAゲルにゆっくり加え、このように得られた混合物を30℃にて16時間攪拌させる。

【0045】

90mLの飽和塩化ナトリウム溶液を添加することによって反応を停止させる。生成物を96体積%のエタノールの添加によって沈殿させ、上清を捨て、濾過した残渣を異なる濃度でエタノールにより数回洗浄し、次いで真空下で乾燥させる。得られた生成物は0.4%の置換度を有する。

30

【0046】

実施例5

ピキシンによるヒアルロン酸エステルの調製

1.5gのHA-TBAを、サーモスタットを備えるリアクタ内で500mLのDMFに溶解し、30℃で攪拌下に置く。

【0047】

0.5gの**ピキシ**ンを、湿気に対して保護したリアクタ内で250mLのDMFに溶解し、1eqのN,N-カルボニルジイミダゾールを混合物に加える。1時間後、溶液をHA-TBAゲルにゆっくり加え、このように得られた混合物を30℃にて16時間攪拌させる。

40

【0048】

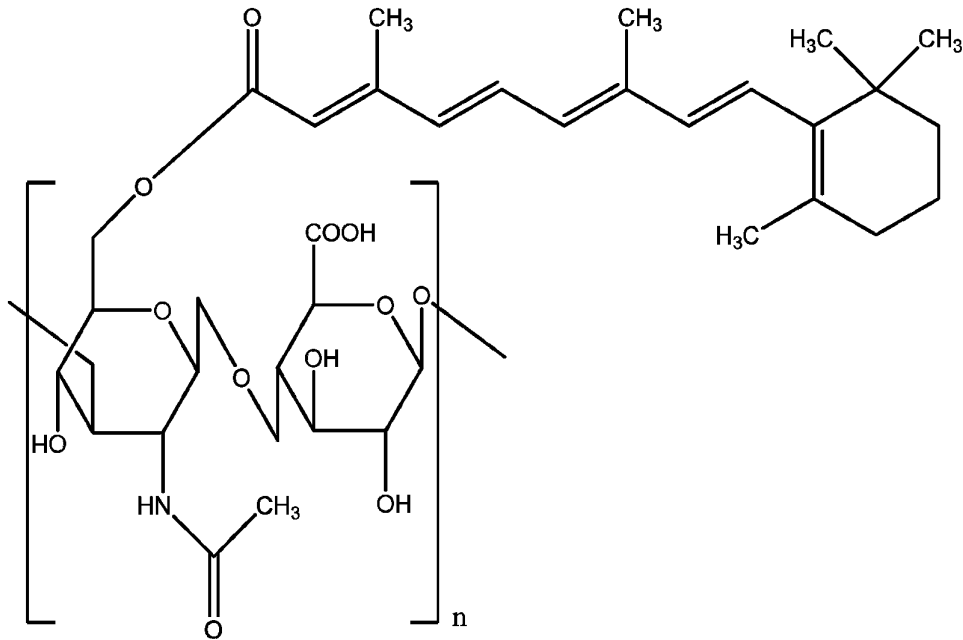
80mLの飽和塩化ナトリウム溶液を添加することによって反応を停止させる。生成物を96体積%のエタノールの添加によって沈殿させ、上清を捨て、濾過した残渣を異なる濃度でエタノールにより数回洗浄し、次いで真空下で乾燥させる。得られた生成物は0.15%の置換度を有する。

【0049】

実施例6

レチノイン酸によるヒアルロン酸エステルの調製

【化4】



10

式中、 n は250～5000である。

20

【0050】

1.5gのHA-TBAを、サーモスタットを備えるリアクタ内で500mLのDMFに溶解し、30℃で攪拌下に置く。

【0051】

0.7gのレチノイン酸を、湿気に対して保護したリアクタ内で350mLのDMFに溶解し、1eqのN,N-カルボニルジイミダゾールを混合物に加える。1時間後、溶液をHA-TBAゲルにゆっくり加え、このように得られた混合物を30℃にて16時間攪拌させる。

【0052】

90mLの飽和塩化ナトリウム溶液を添加することによって反応を停止させる。生成物を96体積%のエタノールの添加によって沈殿させ、上清を捨て、濾過した残渣を異なる濃度でエタノールにより数回洗浄し、次いで真空下で乾燥させる。得られた生成物は0.2%の置換度を有する。

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 31/728 (2006.01) A 6 1 K 31/728
A 6 1 K 31/727 (2006.01) A 6 1 K 31/727
A 6 1 P 27/02 (2006.01) A 6 1 P 27/02

(72)発明者 メリギ ロベルト
イタリア国 4 5 0 2 5 フラッタ ポレージネ ヴィア カナルピアンコ 1 1 0 1 シー

審査官 奥谷 暢子

(56)参考文献 特開2011-252153(JP,A)
特表平11-504668(JP,A)
特表2004-536911(JP,A)
特表2006-515521(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 8 B 3 7 / 0 8
A 6 1 K 9 / 0 8
A 6 1 K 3 1 / 7 2 6
A 6 1 K 3 1 / 7 2 7
A 6 1 K 3 1 / 7 2 8
A 6 1 K 4 7 / 1 0
A 6 1 K 4 7 / 1 8
A 6 1 P 2 7 / 0 2
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)