

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7277452号
(P7277452)

(45)発行日 令和5年5月19日(2023.5.19)

(24)登録日 令和5年5月10日(2023.5.10)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 8 B 37/08 (2006.01)	C 0 8 B 37/08	Z
A 6 1 K 31/728 (2006.01)	A 6 1 K 31/728	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 L 27/20 (2006.01)	A 6 1 L 27/20	
請求項の数 12 (全23頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-522074(P2020-522074)	(73)特許権者	519015771 ジョインセラピューティクス エッセ . エッセ . エッセ . イタリア , 2 2 1 0 0 コモ , 1 , ピア ツァ デル ポボロ
(86)(22)出願日	平成30年10月24日(2018.10.24)	(74)代理人	110001416 弁理士法人信栄事務所
(65)公表番号	特表2021-500436(P2021-500436 A)	(72)発明者	ピアンチーニ , ジュリオ イタリア , 2 2 1 0 0 コモ , 1 , ピア ツァ デル ポボロ , ジョインセラピュ イティクス エッセ . エッセ . エッセ . 内
(43)公表日	令和3年1月7日(2021.1.7)	(72)発明者	カレンガロ , ランフランコ イタリア , 2 2 1 0 0 コモ , 1 , ピア ツァ デル ポボロ , ジョインセラピュ イティクス エッセ . エッセ . エッセ . 内 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/IB2018/058297		
(87)国際公開番号	WO2019/082097		
(87)国際公開日	令和1年5月2日(2019.5.2)		
審査請求日	令和3年10月15日(2021.10.15)		
(31)優先権主張番号	102017000122135		
(32)優先日	平成29年10月26日(2017.10.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	イタリア(IT)		

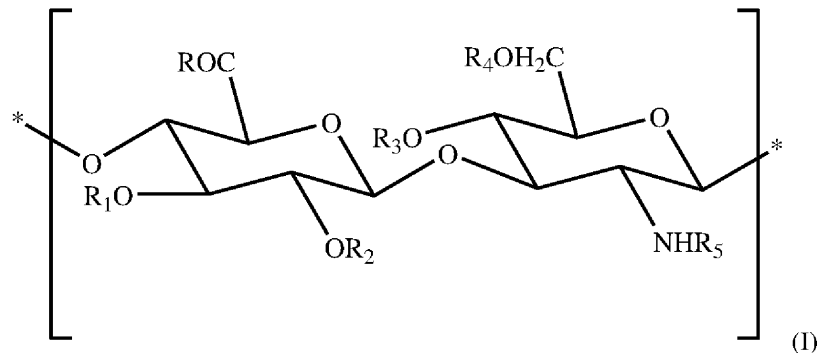
(54)【発明の名称】 炎症症状の治療における官能化ヒアルロン酸またはその誘導体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

官能化ヒアルロン酸またはその誘導体であって、式(I)：

【化6】



[式中、

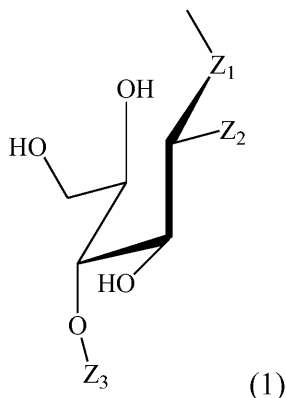
R₁、R₂、R₃、R₄は、互いに独立して、H；SO₃⁻；脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式シリーズ、-CO-(CH₂)₂-COOYのカルボン酸に由来するアシル基であり、ここで、Yは、負電荷またはHであり、

かつ

R は、Z (1) または Z (2) であり、かつ R₅ は、 - CO - CH₃ ; H ; SO₃⁻ ; 脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式シリーズのカルボン酸に由来するアシル基 ; 酸性ヒアルロン酸のアシル基であり、

ここで、Z (1) は、式 (1) :

【化 7】



10

の成分であり、

これにおいて、Z₁ は、 - NR₆CH₂ - であり、かつ R₆ は、 H、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式の、置換または未置換の基であり、

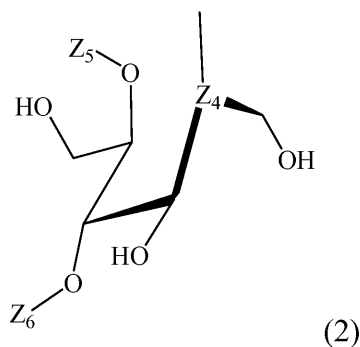
20

Z₂ は、 - OH、または - NHCOCH₃ であり、

Z₃ は、 H、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは Z (2) は、式 (2) :

【化 8】



30

の成分であり、

これにおいて、Z₄ は、 - NR₆CH - であり、かつ R₆ は、 H、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式の、置換または未置換の基であり、

Z₅ および Z₆ は、互いに独立して、 H、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは

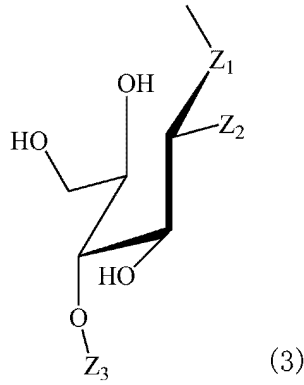
40

R₅ は、Z (3) または Z (4) であり、かつ R は、 NR₆R₇、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式シリーズのアルコール基、OH、O⁻、ヒアルロン酸のアルコール基、ヒアルロン酸のアミノ基であり、かつ R₆、R₇ は、互いに独立して、 H、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式の、置換または未置換の基であり、

ここで Z (3) は、式 (3) :

50

【化 9】



10

の成分であり、

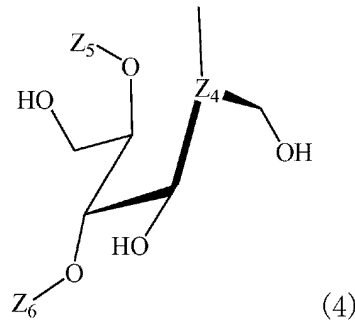
これにおいて、 Z_1 は、 $-CH_2-$ または $-CO-$ であり、

Z_2 は、 $-OH$ 、または $-NHCOCH_3$ であり、

Z_3 は、 H 、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは $Z(4)$ は、式(4)：

【化 10】



20

の成分であり、

これにおいて、 Z_4 は、 $-CH-$ であり、

Z_5 および Z_6 は、互いに独立して、 H 、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは

R は、 $Z(1)$ または $Z(2)$ であり、かつ R_5 は、 $Z(3)$ または $Z(4)$ である]を有する、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体。

【請求項 2】

Z_3 、 Z_5 、および Z_6 が、互いに独立して、 H ；グルコース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、マンノース、ラクトース、トレハロース、ゲンチオビオース、セロビオース、セロトリオース、マルトース、マルトトリオース、キトビオース、キトトリオース、マンノビオース、メリビオース、フルクトース、 N -アセチルグルコサミン、 N -アセチルガラクトサミンの成分、またはそれらの組合せである、請求項 1 に記載の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体。

40

【請求項 3】

Z_3 が、 H ；グルコース、ガラクトース、マンノース、 N -アセチルグルコサミン、 N -アセチルガラクトサミンの成分、またはそれらの組合せである、請求項 1 または 2 に記載の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体。

【請求項 4】

50

Zが、ラクトースまたはガラクトースの成分であり、これにおいて、Zが、Z(1)、Z(2)、Z(3)、およびZ(4)のいずれか1つである、請求項1から3のいずれか1項に記載の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体。

【請求項5】

請求項1に記載の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体を調製するためのプロセスであって、前記プロセスが以下の工程：

i) ヒアルロン酸またはその部分的もしくは完全に脱アセチル化された誘導体を提供すること；

ii) 還元的アミノ化反応により、単糖、二糖、オリゴ糖のアミン誘導体を提供すること；

iii) 以下を反応させることであって：

a) 工程i)の前記ヒアルロン酸を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、工程ii)の前記アミン誘導体と、または

b) 工程i)の前記部分的もしくは完全に脱アセチル化された誘導体を、アミノボランの存在下で、単糖、二糖、オリゴ糖と；

または

c) 工程i)の前記部分的もしくは完全に脱アセチル化された誘導体を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、単糖、二糖、オリゴ糖のカルボキシリック誘導体と；

または

d) 工程iii-b)から得られた前記誘導体を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、工程ii)の前記アミン誘導体と；

または

e) 工程iii-c)から得られた前記誘導体を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、工程ii)の前記アミン誘導体と反応させること；

および

iv) そのようにして得られた前記官能化ヒアルロン酸またはその誘導体を、有機溶媒を用いて沈殿させること、を含む、該プロセス。

【請求項6】

前記工程iii)の、単糖、二糖、オリゴ糖の、ヒアルロン酸またはその誘導体に対するモル比が、0.5から3.0である、請求項5に記載のプロセス。

【請求項7】

改変されたガレクチン発現に起因する病理の治療における使用のための、請求項1に記載の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体であって、前記病理が、非アルコール性脂肪性肝炎、局面型乾癬、関節リウマチ、変形性関節症、新生物、ならびに肺、腎臓、および心臓血管系の線維症プロセスである、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体。

【請求項8】

整形外科的疾患の治療における、生体材料または細胞増殖のための足場としての使用のための、請求項1に記載の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体。

【請求項9】

少なくとも1つの、請求項1に記載の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体と、少なくとも1つの薬理活性物質および/または少なくとも1つの生物活性物質とを含む、医薬組成物であって、

- 前記薬理活性物質が、抗生物質、抗感染薬、抗菌剤、抗ウイルス薬、細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、抗腫瘍薬、抗炎症薬、癬痕形成薬、麻酔薬、鎮痛剤、血管収縮薬、コリン作動性またはアドレナリン作動性のアゴニストおよびアンタゴニスト、抗血栓薬、抗凝固薬、止血薬、線溶薬、血栓溶解薬、タンパク質およびそのフラグメント、ペプチド、ポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド、増殖因子、酵素、ワクチン、およびそれらの組合せから選択され、かつ
 - 前記生物活性物質が、コラーゲン、フィブリノーゲン、フィブリン、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸マグネシウム、セルロース、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ラミニン、フィブロネクチン、エラスチン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸-グリコール酸共重合体、ポリカプロラクトン、ゼラチン、アルブミン、グリコリド-カプロラクトン共重合体、グリコリド-トリメチレンカーボネート共重合体、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、リン酸二カルシウム、脱灰骨基質、およびそれらの混合物から選択される、医薬組成物。

【請求項 10】

10

改変されたガレクチン発現に起因する病理の治療における使用のための、請求項 9 に記載の医薬組成物であって、前記病理が、非アルコール性脂肪性肝炎、局面型乾癬、関節リウマチ、変形性関節症、新生物、ならびに肺、腎臓、および心臓血管系の線維症プロセスである、医薬組成物。

【請求項 11】

前記工程 i i i) の、単糖、二糖、オリゴ糖の、ヒアルロン酸またはその誘導体に対するモル比が、1 から 20 である、請求項 6 に記載のプロセス。

【請求項 12】

前記工程 i i i) の、単糖、二糖、オリゴ糖の、ヒアルロン酸またはその誘導体に対するモル比が、1 から 10 である、請求項 11 に記載のプロセス。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体、ならびにその調製のためのプロセス、および生体材料としておよび医薬組成物の成分としてのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ガレクチンは、N - アセチル - ラクトサミンなどの、N - グリコシル化または O - グリコシル化によりタンパク質に結合され得る、- ガラクトシド糖への特異的な結合によって定義されるタンパク質のファミリーである。哺乳類では 15 のガレクチンが知られており、それらは L G A L S 遺伝子によりコードされ、連続番号が付されているが、ヒトではガレクチン - 1、- 2、- 3、- 4、- 7、- 8、- 9、- 10、- 12、および - 13 のみが同定されている。

30

【0003】

これらは、細胞内または細胞外のレベルにおいて局在する。後者の場合、それらは細胞表面上のグリカンと二価または多価の相互作用を行なって、サイトカインおよび他の炎症メディエーターの産生、細胞接着、移動、およびアポトーシスを含む、様々な細胞応答を誘導する。さらに、膜糖タンパク質受容体とラティスを形成することが可能であり、受容体の特性を調節する。細胞内ガレクチンはシグナリング経路に参与することが可能であり、アポトーシス、細胞分化、および細胞運動性を含む、生物学的応答を改変する。最新のエビデンスは、ガレクチンが急性および慢性の炎症応答において、ならびに他の様々な病理学的プロセスにおいて、重要な役割を果たすことを示している。

40

【0004】

最近の研究は、いくつかのガレクチンが、関節リウマチ、変形性関節症などの、いくつかの骨格筋障害の炎症応答に参与することを示している（非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3、非特許文献 4）。ガレクチンは、多くの炎症病理において過剰発現されており、それ故、メタロプロテアーゼ活性の阻害が、結果として炎症カスケードの著しい阻害を決定し得る。

【0005】

さらに、ガレクチンは腫瘍の発生および進行において活発な役割を果たすことが知られ

50

ている。このため、ガレクチンの阻害剤／調節剤が、新生物の診断および治療の双方を改善する目的で現在研究されている。(非特許文献5)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】D. Weinmannら、「Scientific Reports」DOI: 10.1038/srep39112

Toegel S.ら、「Histochem Cell Biol」、2014年、第142巻、P.373、

Toegel S.、「The Journal of Immunology」、2016年、P.1910

10

Li S.ら、「J Clin. Cell Immunol」、2013年、第4巻、第5号、P.1000164

Ebrahim AH,ら、Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy (癌におけるガレクチン: 発癌、診断、および治療)、「Ann Transl Med」、2014年、第2巻、第9号、P.88. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.12

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0007】

それ故、本発明の目的は、これらの受容体の発現を調節する製品であって、改変されたガレクチン発現に起因する病理に対し治療的に作用するようにするとともに、それらに医学および薬学の観点から高い受容性プロフィールを与える、該製品を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記の目的は、請求項1に記載されたような、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体によって達成された。

【0009】

別の態様においては、本発明は、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体を調製するためのプロセスに関する。

30

【0010】

さらなる態様においては、本発明は、改変されたガレクチン発現に起因する病理の治療における、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体の使用に関する。前記受容体の過剰／過少調節によって影響を受ける病理の非限定的例は、非アルコール性脂肪性肝炎、局面型乾癬、関節リウマチ、変形性関節症、新生物、ならびに肺、腎臓、および心臓血管系の線維症プロセスである。

【0011】

さらなる態様においては、本発明は、整形外科的疾患の治療における、生体材料または細胞増殖のための足場としての、前記官能化ヒアルロン酸またはその誘導体の使用に関する。

40

【0012】

なおさらなる態様においては、本発明は、成形／美容外科、血液透析、心臓病学、血管学、眼科学、耳鼻科、歯科学、婦人科学、泌尿器科学、皮膚科学、腫瘍学、および組織修復における、生体材料または細胞増殖のための足場としての、前記官能化ヒアルロン酸またはその誘導体の使用に関する。

【0013】

さらなる態様においては、本発明は、少なくとも1つの官能化ヒアルロン酸またはその誘導体と、少なくとも1つの薬理活性物質および／または少なくとも1つの生物活性物質とを含む、医薬組成物に関する。

50

【0014】

なおさらなる態様においては、本発明は、改変されたガレクチン発現に起因する病理の治療における、前記医薬組成物の使用に関する。前記受容体の過剰/過少調節によって影響を受ける病理の非限定的例は、非アルコール性脂肪性肝炎、局面型乾癬、関節リウマチ、変形性関節症、新生物、ならびに肺、腎臓、および心臓血管系の線維症プロセスである。

【0015】

なおさらなる態様においては、本発明は、成形/美容外科、血液透析、心臓病学、血管学、眼科学、耳鼻科、歯科学、婦人科学、泌尿器科学、皮膚科学、腫瘍学、および組織修復における、前記医薬組成物の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

10

【0016】

本発明の特徴および利点は、以下の詳細な記載、非限定的例として提供された実施形態、およびここに添付された図面から明らかとなるであろう。

【図1】ラクトース、脱アセチル化ヒアルロン酸、およびヒアルロン酸誘導体の、赤外スペクトル間の比較を示す図であり、ここでは、R5はZ(3)であり、かつZ3はガラクトース成分である。

【図2】ヒアルロン酸、還元的アミノ化により得られた還元糖のアミン誘導体、およびヒアルロン酸誘導体の、赤外スペクトル間の比較を示す図であり、ここでは、RはZ(1)であり、かつZ3はガラクトース成分である。

【図3】 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(400 MHz、 D_2O 、343 K)を示す図である：
1) ヒアルロン酸ナトリウム；2) 実施例6によって得られたヒアルロン酸ナトリウム；
3) 実施例13によって得られた部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミン誘導体(還元糖を用いた還元的アミノ化)。

20

【図4】 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(400 MHz、 D_2O 、298 K)を示す図である：
1) ヒアルロン酸ナトリウム；2) 実施例3によって得られた還元糖のアミン誘導体；
3) 実施例13によって得られた部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミド誘導体(還元糖を用いたアミン誘導体のアミド化)。

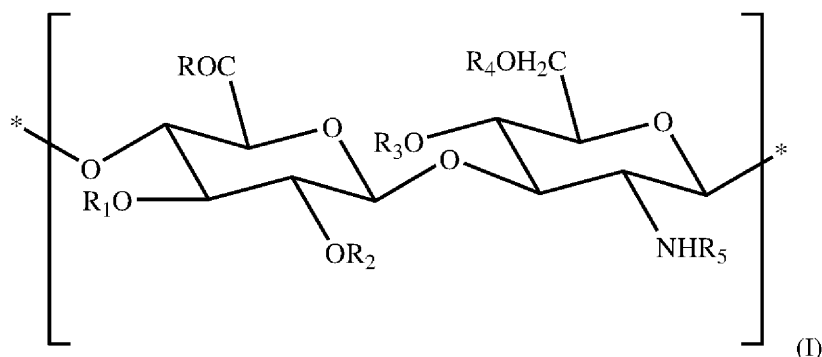
【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明はそれ故、式(I)：

30

【化1】



40

[式中、

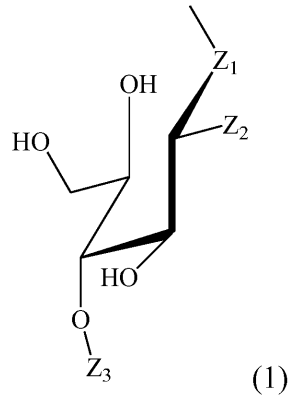
R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 は、互いに独立して、 H ； SO_3^- ；脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式シリーズ、 $-\text{CO}-\text{(CH}_2)_2-\text{COOY}$ のカルボン酸に由来するアシル基であり、ここで、 Y は、負電荷または H であり、

かつ

R は、 $Z(1)$ または $Z(2)$ であり、かつ R_5 は、 $-\text{CO}-\text{CH}_3$ ； H ； SO_3^- ；脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式シリーズのカルボン酸に由来するアシル基；酸性ヒアルロン酸のアシル基であり、

50

ここで、 $Z(1)$ は、式(1)：
【化2】



10

の成分であり、

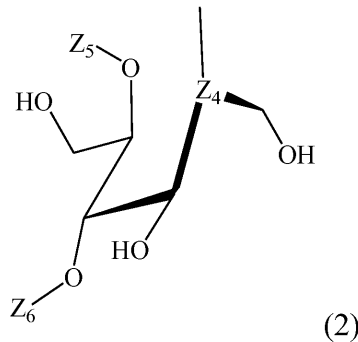
これにおいて、 Z_1 は、 $-NR_6CH_2-$ であり、かつ R_6 は、H、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式の、置換または未置換の基であり、

Z_2 は、 $-OH$ 、または $-NHCOCH_3$ であり、

Z_3 は、H、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは $Z(2)$ は、式(2)：

【化3】



20

30

の成分であり、

これにおいて、 Z_4 は、 $-NR_6CH-$ であり、かつ R_6 は、H、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式の、置換または未置換の基であり、

Z_5 および Z_6 は、互いに独立して、H、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは

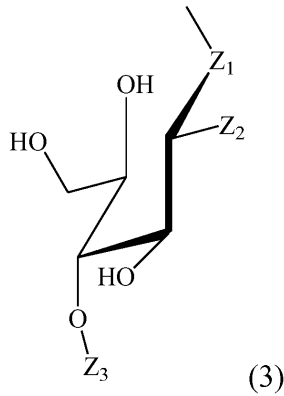
R_5 は、 $Z(3)$ または $Z(4)$ であり、かつ R は、 NR_6R_7 、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式シリーズのアルコール基、 OH 、 O^- 、ヒアルロン酸のアルコール基、ヒアルロン酸のアミン基であり、かつ R_6 、 R_7 は、互いに独立して、H、または、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式の、置換または未置換の基であり、

40

ここで $Z(3)$ は、式(3)：

50

【化 4】



10

の成分であり、

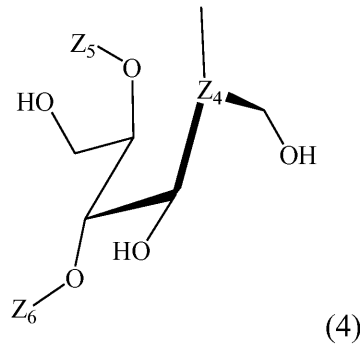
これにおいて、 Z_1 は、 $-CH_2-$ または $-CO-$ であり、

Z_2 は、 $-OH$ 、または $-NHCOCH_3$ であり、

Z_3 は、 H 、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは $Z(4)$ は、式(4)：

【化 5】



20

の成分であり、

これにおいて、 Z_4 は、 $-CH-$ であり、

Z_5 および Z_6 は、互いに独立して、 H 、単糖、二糖、またはオリゴ糖であり、

あるいは

R は、 $Z(1)$ または $Z(2)$ であり、かつ R_5 は、 $Z(3)$ または $Z(4)$ である]
の官能化ヒアルロン酸またはその誘導体に関する。

【0018】

用語「脂肪族、芳香族、アリアル脂肪族、脂環式、複素環式」は、好ましくは： $C1 - C10$ アルキル、置換 $C1 - C10$ アルキル、 $C2 - C10$ アルケニル、置換 $C2 - C10$ アルケニル、 $C4 - C10$ ジエニル、置換 $C4 - C10$ ジエニル、 $C2 - C10$ アルキニル、置換 $C2 - C10$ アルキニル、フェニル、置換フェニル、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、 $C1 - C10$ アルキルチオ、置換 $C1 - C10$ アルキルチオ、フェニルチオ、置換フェニルチオ、アリアルチオ、置換アリアルチオ、カルボニル、置換 $C1 - C6$ カルボニル、カルボキシル、置換 $C1 - C6$ カルボキシル、アミノ、置換 $C1 - C6$ アミノ、アミド、置換 $C1 - C6$ アミド、スルホニル、置換 $C1 - C6$ スルホニル、スルホン酸、ホスホニル、置換 $C1 - C6$ ホスホニル、ポリアリアル、置換ポリアリアル、 $C3 - C20$ シクロアルキル、置換 $C3 - C20$ シクロアルキル、 $C3 - C20$ ヘテロシクロアルキル、置換 $C3 - C20$ ヘテロシクロアルキル、 $C2 - C10$ シクロアルケニル、置換 $C2 - C10$ シクロアルケニル、 $C4 - C10$ シクロジエニル、置換 $C4 - C10$ シクロジエニル、またはアミノ酸から選択される、飽和または不飽和

40

50

の、脂肪族または芳香族の、直鎖、分枝鎖、または環式の成分を意味する。用語「置換(された)」は、少なくとも1つのハロゲン、ヒドロキシル、C1 - C4アルキル、カルボキシル、またはそれらの組合せに結合されたことを意味する。

【0019】

好ましくは、Z₃、Z₅、およびZ₆は、互いに独立して、H；グルコース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、マンノース、ラクトース、トレハロース、ゲンチオビオース、セロビオース、セロトリオース、マルトース、マルトトリオース、キトビオース、キトトリオース、マンノビオース、メリビオース、フルクトース、N - アセチルグルコサミン、N - アセチルガラクトサミンの成分、またはそれらの組合せである。

【0020】

より好ましくは、Z₃は、H；グルコース、ガラクトース、マンノース、N - アセチルグルコサミン、N - アセチルガラクトサミンの成分、またはそれらの組合せである。

【0021】

特に好ましい実施形態においては、式Zの成分は、ラクトースまたはガラクトースの成分であり、これにおいて、Zは、Z(1)、Z(2)、Z(3)、およびZ(4)のいずれか1つである。

【0022】

上記に示した構造式から分かるように、ヒアルロン酸またはその誘導体は、以下の：
 1) ヒアルロン酸またはその誘導体のカルボキシル基と、アミンとの間の、Zの前駆体と第一級アミンまたはアンモニア供給源との還元的アミノ化を介した、アミド結合、
 2) 予め脱アセチル化されたヒアルロン酸またはその誘導体のアミン基と、成分Zとの間の、還元的アミノ化を介した、アミド結合、
 3) 予め脱アセチル化されたヒアルロン酸またはその誘導体のアミン基と、成分Zの前駆体のカルボキシル基との間の、アミド結合、
 により、Z(1)、Z(2)、Z(3)であろうと、またはZ(4)であろうと、式Zの成分とのコンジュゲーションによって官能化される。

【0023】

それ故、別の態様においては、本発明は、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体を調製するためのプロセスであって、前記プロセスが以下の工程：

i) ヒアルロン酸またはその部分的もしくは完全に脱アセチル化された誘導体を提供すること；

ii) 還元的アミノ化反応により、単糖、二糖、オリゴ糖のアミン誘導体を提供すること；

iii) 以下を反応させることであって：

a) 工程i)の前記ヒアルロン酸を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、工程ii)の前記アミン誘導体と、
 または

b) 工程i)の前記部分的もしくは完全に脱アセチル化された誘導体を、アミノボランの存在下で、単糖、二糖、オリゴ糖と；
 または

c) 工程i)の前記部分的もしくは完全に脱アセチル化された誘導体を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、単糖、二糖、オリゴ糖のカルボキシリック誘導体と；
 または

d) 工程iii - b)から得られた前記誘導体を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、工程ii)の前記アミン誘導体と；
 または

e) 工程iii - c)から得られた前記誘導体を、カルボジイミドの存在下、および/またはカルボキシ基活性化剤の存在下で、工程ii)の前記アミン誘導体と反応させること；

10

20

30

40

50

および

i v) そのようにして得られた前記官能化ヒアルロン酸またはその誘導体を、有機溶媒を用いて沈殿させること、を含む、該プロセスに関する。

【0024】

驚くべきことに、アミノ-ボランが、イミノ基の還元においてカルボニル基に比べて著しい選択性を示すこと、および水性媒体と適合性があり、それにより第一級アミン、アンモニア供給源、多糖のアミン成分の存在下で、還元糖の有効なアミン還元を可能にすることが観察された。同時に、カルボジイミドおよび/またはカルボキシリック基活性化剤の存在が、エステル誘導体の生成に関する優れた選択性により、ヒアルロン酸のアミド誘導体の生成を促進する。それ故、プロセスは全体として、有利には、単糖、二糖、およびオリゴ糖を、化学スペーサーの導入を必要とすることなくヒアルロン酸主鎖へ結合する可能性を与える。

10

【0025】

本発明に従って官能化誘導体の調製において使用され得るヒアルロン酸の誘導体は、好ましくは以下の通りである：

- ヒアルロン酸塩、例えばヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸カルシウム、ヒアルロン酸マグネシウム、ヒアルロン酸亜鉛、ヒアルロン酸コバルト、ヒアルロン酸アンモニア、ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウム、およびそれらの混合物、

20

- 欧州特許第0216453号明細書にも記載された通りの、そのカルボキシリック基の一部または全てが、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、複素環式シリーズのアルコールを用いてエステル化される、ヒアルロン酸エステル、

- 欧州特許第0341745号明細書にも記載された通りの、そのカルボキシリック基の一部または全てが、同じ多糖鎖または別の鎖からのアルコール性基を用いてエステル化される、自己架橋ヒアルロン酸エステル、

- 欧州特許第0265116号明細書にも記載された通りの、そのカルボキシリック基の一部または全てが、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、脂環式、または複素環式シリーズのポリアルコールを用いてエステル化されて、スペーサー鎖による架橋を生じる、架橋ヒアルロン酸化合物、

30

- 国際公開第96/357207号にも記載された通りの、ヒアルロン酸との、または部分的もしくは完全なヒアルロン酸エステルとの、コハク酸ヘミエステルもしくはコハク酸重金属塩、

- 国際公開第95/25751号にも記載された通りの、O-硫酸化誘導体、または国際公開第98/045335号にも記載された通りの、N-硫酸化誘導体。

【0026】

前記の単糖、二糖、およびオリゴ糖は、成分Zについて上記に示した定義に対応する。

【0027】

前記アミノボランは、好ましくは、2-メチルピリジンボラン、5-エチル-2-メチルピリジンボラン、ピリジンボラン、トリメチルアミンボラン、トリエチルアミンボラン、ジメチルアミンボラン、tert-ブチルアミンボラン、またはそれらの混合物である。より好ましくは、前記アミノボランは、2-メチルピリジンボラン、5-エチル-2-メチルピリジンボラン、またはそれらの混合物である。

40

【0028】

アミノボランは、そのまま使用されてもよく、または予めアルコールなどの水混和性有機溶媒中に溶解もしくは分散されてもよい。前記アルコールの中で最も好ましいのは、メタノール、エタノール、2-プロパノール、またはそれらの混合物である。

【0029】

用語「有機溶媒」は、水性反応溶液の比誘電率を低下させることができる、有機水混和性溶媒を意味する。適当な有機溶媒は、アセトン、メタノール、エタノール、2-プロパ

50

ノール、またはそれらの混合物であり、好ましくは、有機溶媒は、エタノール、2-プロパノール、またはそれらの混合物である。

【0030】

用語「カルボキシル基活性化剤」は、前記基のヒドロキシル官能基を修飾する試薬であって、それ故置換反応におけるその除去を促進する、該試薬を意味する。

【0031】

カルボキシル基の活性化剤は、ヒドロキシベンゾトリアゾール、1,1'-カルボジイミダゾール、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシルホスホキシイミドナトリウム塩、N-ヒドロキシルスクシンイミド、およびそれらの混合物を包含する。

【0032】

適当なカルボジイミドは、ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、およびそれらの混合物を包含する。

【0033】

任意で、工程iv)において分離された沈殿は、30%までの、および好ましくは10%までのパーセントの水を用いた、水と有機溶媒との混合物を用いて洗浄される。

【0034】

好ましくは、工程iii)において、単糖、二糖、オリゴ糖の、ヒアルロン酸またはその誘導体に対するモル比は、0.5から30、より好ましくは、1から20、なおより好ましくは、1から10である。

【0035】

さらなる態様においては、本発明は、改変されたガレクチン発現に起因する病理の治療における、前記官能化ヒアルロン酸またはその誘導体の使用に関する。前記受容体の過剰/過少調節によって影響を受ける病理の非限定的例は、非アルコール性脂肪性肝炎、局面型乾癬、関節リウマチ、変形性関節症、新生物、ならびに肺、腎臓および心臓血管系の線維症プロセスである。

【0036】

新生物および線維症プロセスの例は、急性リンパ性白血病、突発性肺線維症、肝線維症、心臓線維症、腎線維症、および卵巣、前立腺、肺、胃、皮膚、甲状腺、および膵臓の腫瘍を包含する。

【0037】

さらなる態様においては、本発明は、整形外科的疾患の治療における、生体材料または細胞増殖のための足場としての、前記官能化ヒアルロン酸またはその誘導体の使用に関する。

【0038】

なおさらなる態様においては、成形/美容外科、血液透析、心臓病学、血管学、眼科学、耳鼻科、歯科学、婦人科学、泌尿器科学、皮膚科学、腫瘍学、および組織修復における生体材料または細胞増殖のための足場としての、前記官能化ヒアルロン酸またはその誘導体の使用に関する。

【0039】

官能化ヒアルロン酸またはその誘導体はまた、医学分野において、および別の業種において使用される、物体をコーティングするための生体材料としても使用可能であり、新規な生物学的特性をもつ媒体として使用される物体の表面を提供する。

【0040】

コートされ得る物体は、例えば、カテーテル、チューブ、プローブ、心臓弁、軟部組織人工補綴物、動物由来の人工補綴物、人工腱、骨および心血管補綴物、コンタクトレンズ、血液酸素付加装置、人工腎臓、心臓、膵臓、肝臓、血液バッグ、シリンジ、外科用器具、濾過システム、研究室用機器、細胞および組織の培養用および再生用の容器、ペプチド、タンパク質、および抗体用の媒体、を包含する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

官能化ヒアルロン酸またはその誘導体はまた、化粧品分野および皮膚科学においても使用可能である。

【 0 0 4 2 】

なおさらなる態様においては、本発明は、少なくとも1つの官能化ヒアルロン酸またはその誘導体と、少なくとも1つの薬理活性物質および/または少なくとも1つの生物活性物質とを含む、医薬組成物に関する。

【 0 0 4 3 】

適当な薬理活性物質は、抗生物質、抗感染薬、抗菌剤、抗ウイルス薬、細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、抗腫瘍薬、抗炎症薬、癬痕形成薬、麻酔薬、鎮痛剤、血管収縮薬、コリン作動性またはアドレナリン作動性のアゴニストおよびアンタゴニスト、抗血栓薬、抗凝固薬、止血薬、線溶薬、血栓溶解薬、タンパク質およびそのフラグメント、ペプチド、ポリヌクレオチド、増殖因子、酵素、ワクチン、またはそれらの組合せを包含する。

10

【 0 0 4 4 】

好ましくは、前記生物活性物質は、コラーゲン、フィブリノーゲン、フィブリン、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸マグネシウム、セルロース、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ラミニン、フィブロネクチン、エラスチン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸-グリコール酸共重合体、ポリカプロラクトン、ゼラチン、アルブミン、グリコリド-カプロラクトン共重合体、グリコリド-トリメチレンカーボネート共重合体、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、リン酸二カルシウム、脱灰骨基質、およびそれらの混合物から選択される。

20

【 0 0 4 5 】

好ましくは、前記少なくとも1つの官能化ヒアルロン酸またはその誘導体、および前記少なくとも1つの生物活性物質は、100:1から1:150の重量比にある。

【 0 0 4 6 】

なおさらなる態様においては、本発明は、改変されたガレクチン発現に起因する病理の治療における前記医薬組成物の使用に関する。

【 0 0 4 7 】

前記受容体の過剰/過少調節によって影響を受ける病理の非限定的例は、非アルコール性脂肪性肝炎、局面型乾癬、関節リウマチ、変形性関節症、新生物、ならびに肺、腎臓、および心臓血管系の線維症プロセスである。

30

【 0 0 4 8 】

なおさらなる態様においては、本発明は、成形/美容外科、血液透析、心臓病学、血管学、眼科学、耳鼻科、歯科学、婦人科学、泌尿器科学、腫瘍学、皮膚科学、および組織修復における、前記医薬組成物の使用に関する。

【 0 0 4 9 】

好ましくは、本発明による医薬組成物は、医薬組成物の重量を基準にして、10重量%までの前記少なくとも1つの官能化ヒアルロン酸またはその誘導体、好ましくは5重量%までの前記少なくとも1つの官能化ヒアルロン酸またはその誘導体を含む。特に好ましいのは、前記少なくとも1つの官能化ヒアルロン酸またはその誘導体の量が、医薬組成物の重量を基準にして、0.5 - 5重量%である医薬組成物である。

40

【 0 0 5 0 】

特に好ましい実施形態においては、本発明は、上記に記載の少なくとも1つの官能化ヒアルロン酸またはその誘導体と、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、またはその混合物とを含む、医薬組成物に関する。前記組成物は、骨格系に関する整形外科的適用において有利な利用法がある。

【 0 0 5 1 】

医薬組成物は、経口的、筋肉内、静脈内、関節内、経皮的、真皮下、または外部および内部局所的に、例えば外科的手段により投与され得る。

50

【 0 0 5 2 】

好ましくは、前記約組成物は、関節内、経皮的、または内部局所的に投与される。

【 0 0 5 3 】

医薬組成物はさらに、薬学的に許容される賦形剤を含み得る。

【 0 0 5 4 】

適当な薬学的に許容される賦形剤は、例えば、pH調整剤、浸透圧調整剤、溶媒、安定化剤、キレート剤、希釈剤、結合剤、崩壊剤、潤滑剤、流動化剤、着色剤、懸濁化剤、界面活性剤、凍結保護剤、保存料、および酸化防止剤を包含する。

【 0 0 5 5 】

本発明はまた、上記に記載したような、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体を、単独で、または上記記載の、少なくとも1つの薬理活性および/または生物活性物質と組合せて含む、生体材料にも関する。前記生体材料は、ミクロスフェア、ナノスフェア、膜、スポンジ、ワイヤ、フィルム、ガーゼ、ガイドウェイ、タンポン、ゲル、ヒドロゲル、ファブリック、不織布、カニューレ、またはそれらの組合せの形態にあってもよい。

10

【 0 0 5 6 】

また、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体について好ましく有利として同定された全ての態様が、上記記載の調製プロセス、組成物、生体材料、および使用についてもまた好ましく有利であると考えられることも、理解されるべきである。

【 0 0 5 7 】

さらに、上記に開示された、官能化ヒアルロン酸またはその誘導体、調製プロセス、組成物、生体材料、および使用の、好ましい態様の全ての可能な組合せが、同様に好ましいことが理解されるべきである。

20

【 0 0 5 8 】

以下は、例示を目的として提示された、本発明の実施例である。

【実施例】

【 0 0 5 9 】

実施例 1 . 還元糖の第一級アミン誘導体の合成

(4 - O - - D - ガラクトピラノシル 1 - アミノ - 1 - デオキシ - D - グルシトール塩酸塩)

メタノール中の、ラクトース (6 . 2 5 % w / v) および酢酸アンモニウム (5 6 % w / v) の溶液を、攪拌下に室温で、ラクトースについて等モルである量の、5 - エチル - 2 - メチルピリジンボラン複合体で処理した。かくて得られた混合物を、同じ条件下に16時間維持し、次いで未処理の反応生成物を同体積のイソプロパノールと混合し、続いて6N塩酸を用いてpH 2 - 3に酸性化し、ラクトースのアミン誘導体の塩酸塩を沈殿させた。次いで沈殿を単離し、エタノール：水 (9 : 1 , 3 x) の混合物で洗浄し、エタノール：6N水酸化ナトリウム (9 5 : 5) でpHを9に等しくし、再度エタノール：水 (9 : 1 , 2 x) で、そして最後にエタノール (1 x) で洗浄した。かくて得られた固体を、次に減圧下で乾燥させ、さらなる精製なしに、次に続く合成工程に使用した。誘導体を、IR (赤外) 分光法により特性評価した。反応収率：90%。

30

【 0 0 6 0 】

実施例 2 . 還元糖のベンジルアミン誘導体の合成

水およびメタノール (3 : 1) 中の、ラクトース (3 % w / v)、ベンジルアミン (5 % w / v)、および5 - エチル - 2 - メチルピリジンボラン (6 % w / v) の溶液を、55の温度で攪拌し、20時間にわたり反応させた。続いて、混合物を冷却し、ジクロロメタンで抽出し、最後に水性相を低圧で蒸発させて、白色結晶固体を得、これをエチルエーテルで洗浄し、最終的にデカンテーションにより回収し、減圧下に乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H - NMR分光法により特性評価した。反応収率：90%。

40

【 0 0 6 1 】

実施例 3 . 還元糖の第一級アミン誘導体の合成

メタノールおよび水 (1 : 1) 中の、実施例 2 によって得られた誘導体の溶液 (4 % w

50

／v)を、室温で磁気攪拌下に置いた。続いて、Pd-炭(0.4%w/v)を添加し、かくて生成された系を水素で加圧した。48時間後、系を減圧し、同体積の水と混合し、固体をデカンテートし、溶液をセライト上で濾過した。かくて得られた溶液を、減圧下で乾燥させ、白色固体を生じた。かくて得られた生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：96%。

【0062】

実施例4．ラクトビオン酸のイミダゾールアミドを主成分とするアシル化溶液の合成

ジメチルスルホキシド中のラクトビオン酸(10%w/v)の溶液を、1,1-カルボジイミダゾール(1当量)と混合し、室温で2時間攪拌した。かくて得られた溶液を、その後さらなる精製無しに使用した。

【0063】

実施例5．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウムの合成(48時間)

ヒドラジン-水和物中の硫酸ヒドラジン溶液(1%w/v)を、ヒアルロン酸ナトリウム(2%w/v)と混合し、かくて得られた系を55に加熱し、攪拌下に48時間にわたり反応させた。続いて、未処理の反応生成物を冷却し、次いでエタノールで沈殿させ、次にエタノールで単離および洗浄し、その後減圧下に24時間乾燥させた。その後、かくて得られた生成物(5%w/v)を、酢酸の水溶液(5%v/v)中に溶解し、溶液を4に冷却し、HIO₃の水溶液(0.5M、60%v/v)を滴下添加した。混合物を同じ条件下で1時間にわたり反応させ、次いで塩酸の水溶液(57%w/v、溶液については11%v/v)を添加して、系をさらに15分間にわたり反応させた。溶液を次に、エチルエーテルで完全に退色するまで抽出し、NaOH(1N、0.1N)を用いて水性相のpHを7-7.5に修正し、最後に生成物をエタノールで沈殿させ、エタノールで洗浄し、そして乾燥させた。かくて得られた生成物を、¹H-NMRおよびIR分光法により特性評価した。反応収率：83%、脱アセチル化度：11%。

【0064】

実施例6．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウムの合成(72時間)

ヒドラジン水和物中の、ヒアルロン酸ナトリウム(2%w/v)およびヒドラジン硫酸(1%w/v)の溶液を、55の温度において72時間にわたり磁気攪拌下に置いた。反応時間の終わりに、エタノールを添加してポリマーを沈殿させ、得られた固体を次にさらなるエタノールで洗浄し、窒素流下で乾燥させた。生成物を酢酸水溶液(6%w/v、5%酢酸)中に再度溶解し、サーモスタットで0-5とし、水中のヨウ素酸溶液(7.5%w/v)の一体積(体積で0.8当量)と混合した。かくて得られた系を、1時間にわたり攪拌下に置き、次いで一体積(体積で0.11当量)のヨウ化水素酸水溶液(57%)と混相し、さらに15分間反応させた。その後、1M NaOH水溶液の添加により、pHを9に調整し、溶液をエチルエーテルで完全に退色するまで抽出した。この後、生成物をエタノールで沈殿させ、エタノールで洗浄し、減圧下に乾燥させ、そしてIRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：86%、脱アセチル化度：20%。

【0065】

実施例7．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウムの合成(96時間)

ヒドラジン-水和物中の硫酸ヒドラジン溶液(1%w/v)を、ヒアルロン酸ナトリウム(2%w/v)と混合し、かくて得られた系を55に加熱して、攪拌下で96時間にわたり反応させた。続いて、未処理の反応生成物を冷却し、次いでエタノールで沈殿させ、次にエタノールで単離および洗浄し、その後減圧下に24時間乾燥させた。その後、かくて得られた生成物(5%w/v)を、酢酸の水溶液(5%v/v)中に溶解し、溶液を4に冷却し、HIO₃の水溶液(0.5M、60%v/v)を滴下添加した。混合物を同じ条件下で1時間にわたり反応させ、次いで塩酸の水溶液(57%w/v、溶液については11%v/v)を添加して、系をさらに15分間にわたり反応させた。溶液を次に、エチルエーテルで完全に退色するまで抽出し、NaOH(1N、0.1N)を用いて水性相のpHを7-7.5に修正し、最後に生成物をエタノールで沈殿させ、エタノールで洗浄し、そして乾燥させた。生成物を、¹H-NMRおよびIR分光法により特性評価した

10

20

30

40

50

。反応収率：86%、脱アセチル化度：21%。

【0066】

実施例8．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウムの合成（120時間）

ヒドラジン-水和物中の硫酸ヒドラジン溶液（1% w/v）を、ヒアルロン酸ナトリウム（2% w/v）と混合し、かくて得られた系を55 に加熱して、攪拌下で120時間にわたり反応させた。続いて、未処理の反応生成物を冷却し、次にエタノールで沈殿させ、次いでエタノールで単離および洗浄し、その後減圧下に24時間乾燥させた。その後、かくて得られた生成物（5% w/v）を、酢酸の水溶液（5% v/v）中に溶解し、溶液を4 に冷却し、HIO₃の水溶液（0.5M、60% v/v）を滴下添加した。混合物を同じ条件下で1時間にわたり反応させ、次いで塩酸の水溶液（57% w/v、溶液については11% v/v）を添加して、系をさらに15分間にわたり反応させた。溶液を次に、エチルエーテルで完全に退色するまで抽出し、NaOH（1N、0.1N）を用いて水性相のpHを7-7.5に修正し、最後に生成物をエタノールで沈殿させ、エタノールで洗浄し、そして乾燥させた。生成物を、¹H-NMRおよびIR分光法により特性評価した。反応収率：89%、脱アセチル化度：26%。

10

【0067】

実施例9．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウムの合成（24時間）

ヒドラジン水和物中の、ヒアルロン酸ナトリウム（2% w/v）およびヨウ素化アンモニウム（0.7% w/v）の溶液を、60 の温度で24時間にわたり磁気攪拌下に置いた。反応時間の終わりに、エタノールを添加してポリマーを沈殿させ、得られた固体を次にさらなるエタノールで洗浄し、窒素流下で乾燥させた。生成物を酢酸水溶液（6% w/v、5%酢酸）中に再度溶解し、サーモスタットで0-5 とし、水中のヨウ素酸溶液（7.5% w/v）の一体積（体積で0.8当量）と混合した。かくて得られた系を、1時間にわたり攪拌下に置き、次いで一体積（体積で0.11当量）のヨウ化水素酸水溶液（57%）と混相し、さらに15分間反応させた。1M NaOHの水溶液の添加により、pHを9に調整し、溶液をエチルエーテルで完全に退色するまで抽出した。この後、生成物をエタノールで沈殿させ、エタノールで洗浄し、減圧下に乾燥させた。かくて得られた固体を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：88%、脱アセチル化度：15%。

20

【0068】

実施例10．テトラブチルアンモニウムを用いたヒアルロン酸塩の調製

ヒアルロン酸ナトリウムの水溶液（1.6% w/v）を、予めテトラブチルアンモニウム溶液（40% w/v）で活性化された、テトラブチルアンモニウム塩（溶液について50% v/v）の形態にあるスルホン酸樹脂を充填したカラムを通して濾過した。溶出された溶液を、次に凍結乾燥させた。

30

【0069】

実施例11．テトラブチルアンモニウムを用いた、部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸塩の調製

部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウムの水溶液（1.6% w/v）を、予めテトラブチルアンモニウム溶液（40% w/v）で活性化された、テトラブチルアンモニウム塩（溶液について50% v/v）の形態にあるスルホン酸樹脂を充填したカラムを通して濾過した。溶出された溶液を、次に凍結乾燥させた。

40

【0070】

実施例12．ヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化）

水中の、ヒアルロン酸ナトリウムの溶液（0.25% w/v）を、実施例1で得られたアミン誘導体（30当量）と混合し、得られた溶液pHを、水酸化ナトリウム（1N、0.1N）または塩酸（1N、0.1N）の適当な添加により6.8に調整した。その後、予め水：ジメチルスルホキシド（1.1：1）中に溶解された、（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩（5当量、11% w/v）およびヒドロキシベンゾトリアゾール（3.5当量、6% w/v）の溶液を滴下添加した。溶液のpHを、

50

水酸化ナトリウム（1 N、0.1 N）の適当な添加により6.8に調整し、得られた未処理の生成物を、室温で16時間にわたり反応させた。その後、pHを、水酸化ナトリウム/塩酸（0.1 N）を用いて適宜に7に調整し、得られた溶液を水に対し繰返し透析した（カットオフ：12 - 14000）。その後、溶液を塩化ナトリウムと、5% w/v力価が達成されるまで混合し、所望の生成物をエタノールで沈殿させ、乾燥させて、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：88%、還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化：88%。

【0071】

実施例13. ヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化）

ヒアルロン酸ナトリウム（3% w/v）、ヒドロキシベンゾトリアゾール（0.4% w/v）、N-エチル-N-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（0.6% w/v）、および実施例3によって得られたラクトースのアミン誘導体（2% w/v）の水溶液を、0.1 M NaOHまたは0.1 M HClの水溶液の添加によってpHを6.8に維持しながら、22時間にわたり攪拌下に置いた。その後、NaCl（5 g / 100 mL）を添加して、生成物を、メタノールを用いて沈殿させた。かくて得られた固体を、デカンテーションにより回収し、メタノールおよび水（4：1）、きれいなメタノールで洗浄し、最後に減圧下に乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：86%、還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化：27%。

10

【0072】

実施例14. ヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化）

ヒアルロン酸ナトリウム（0.5% w/v）、N-ヒドロキシスクシンイミド（1.3% w/v）、N-エチル-N-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（1.0% w/v）、および実施例3で得られたラクトースのアミン誘導体（2.1% w/v）を含有する水およびジオキサン（1：1）の溶液を、室温で12時間にわたり攪拌した。反応時間の終わりに、炭酸水素ナトリウムを添加してpHを9-10に調整して、そして溶液をさらに3時間にわたり攪拌下に置いた。混合物のpHを、酢酸（50%、v/v）の添加により7に調整し、その後塩化ナトリウム（5 g / 100 mL）を添加し、生成物を、エタノールを用いて沈殿させ、エタノールで、そしてエーテルで洗浄し、最後に減圧下に乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：85%、還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化：21%。

20

30

【0073】

実施例15. 有機媒体中でのヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化）

ジメチルスルホキシド中の、ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウム塩（2% w/v）の溶液を、pH3に調整するため塩酸水溶液で処理し、続いて1,1-カルボニルジイミダゾール（1.5当量）と混合して、12時間にわたり反応させた。その後、溶液を、グーチ（Gooch）濾過器を用いて濾過して、固体成分を除去し、実施例1で得られたアミン誘導体（2当量）を添加し、かくて得られた混合物を48時間にわたり反応させた。その後、飽和塩化ナトリウム溶液を、塩化ナトリウム5% w/vの最終力価を得るべく十分な量で添加し、混合物を1時間にわたり攪拌下に置き、最後にアセトンの添加により生成物を沈殿させ、得られた固体を単離し、次いで乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：80%、還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化：10%。

40

【0074】

実施例16. 有機媒体中でのヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化）

ジメチルホルムアミド中のヒアルロン酸ナトリウム（2% w/v）の溶液を、1,1-カルボニルジイミダゾール（1当量）と混合した。かくて得られた溶液を、6時間にわたり反応させ、その後、実施例1で得られたアミン誘導体（5当量）を添加し、系をさらに36時間にわたり反応させた。それに続き、生成物をアセトンで沈殿させ、次に単離し、

50

アセトンで洗浄し、その後減圧下に乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：80%、還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化：57%。

【0075】

実施例17．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミン誘導体（還元糖を用いた還元的アミノ化）

実施例7で得られた部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム（1.5% w/v）の水溶液を、ラクトース（10当量）と混合し、酢酸（100%）を用いてpHを調整して約5.5の値に到達させた。かくて得られた系を、60℃に加熱し、次いでメタノール中の2-メチルピリジンボラン溶液（10当量、10% w/v）と混合し、同じ条件下で2時間にわたり反応させた。それに続き溶液のpHを、塩酸水溶液（4N）を用いて約2-3の値に調整し、系を同じ条件下に15分間維持した。その後、系を冷却し、NaOH（1N）を用いてpHを7-7.5に調節し、得られた溶液を水に対し繰返し透析した（カットオフ：12-14000）。最後に、溶液を塩化ナトリウムと、5% w/v力価が達成されるまで混合し、所望の生成物をエタノールで沈殿させ、乾燥させて、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：80%、還元糖を用いたアミノ化：21%。

10

【0076】

実施例18．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミン誘導体（還元糖を用いた還元的アミノ化）

実施例7によって得られた部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム（1.5% w/v）の水溶液を、ラクトース（10当量）と混合し、酢酸（100%）を用いてpHを調整して約5.5の値に到達させた。かくて得られた系を、60℃に加熱し、次いでメタノール中の2-メチルピリジンボラン溶液（10当量、10% w/v）と混合し、同じ条件下で2時間にわたり反応させた。それに続き溶液のpHを、塩酸水溶液（4N）を用いて約2-3の値に調整し、系を同じ条件下に15分間維持した。その後、系を冷却し、NaOH（1N）を用いてpHを7-7.5に調節し、塩化ナトリウムを、その力価5% w/vに達するまで添加した。所望の生成物をエタノールで沈殿させ、乾燥させて、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：84%、還元糖のアミノ化：21%。

20

30

【0077】

実施例19．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミン誘導体（還元糖を用いた還元的アミノ化）

実施例5によって得られた部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム（1.5% w/v）の水溶液を、ラクトース（10当量）と混合し、酢酸（100%）を用いてpHを調整して約5.5の値に到達させた。かくて得られた系を、60℃に加熱し、次いでメタノール中の2-メチルピリジンボラン溶液（10当量、10% w/v）と混合し、同じ条件下で2時間にわたり反応させた。それに続き溶液のpHを、塩酸水溶液（4N）を用いて約2-3の値に調整し、系を同じ条件下に15分間維持した。その後、系を冷却し、NaOH（1N）を用いてpHを7-7.5に調節し、得られた溶液を水に対し繰返し透析した（カットオフ：12-14000）。最後に、溶液を塩化ナトリウムと、その力価5% w/vが達成されるまで混合し、所望の生成物をエタノールで沈殿させ、乾燥させて、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：78%、還元糖のアミノ化：11%。

40

【0078】

実施例20．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミン誘導体（還元糖を用いた還元的アミノ化）

実施例6によって得られた部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム（2% w/v）の水溶液を、ラクトース（3当量）と混合し、酢酸（100%）を用いてpHを調整して約5.5の値に到達させた。かくて得られた系を、60℃に加熱し、次いでイソ

50

プロパノール中の2-メチルピリジンボラン溶液(1当量、10% w/v)と混合し、同じ条件下で3時間にわたり反応させた。それに続き、反応のpHを、塩酸水溶液(4N)を用いて約2-3の値に達するように調整し、系を同じ条件下に15分間維持した。その後、系を冷却し、イソプロパノールの添加により生成物を沈殿させ、イソプロパノール：水(80：20および90：10)で洗浄して、減圧下に乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：95%、還元糖を用いたアミノ化：20%。

【0079】

実施例21．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミン誘導体(還元糖を用いた還元的アミノ化)

実施例9によって得られた部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム(2% w/v)の水溶液を、ラクトース(3当量)と混合し、酢酸(100%)を用いてpHを調整して約5.5の値に到達させた。かくて得られた系を、60℃に加熱し、次いでイソプロパノール中の2-メチルピリジンボラン溶液(1当量、10% w/v)と混合し、同じ条件下で3時間にわたり反応させた。それに続き、反応のpHを、塩酸水溶液(4N)を用いて約2-3の値に達するように調整し、系を同じ条件下に15分間維持した。その後、系を冷却し、イソプロパノールの添加により生成物を沈殿させ、イソプロパノール：水(80：20および90：10)で洗浄して、減圧下に乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：95%、還元糖を用いたアミノ化：15%。

【0080】

実施例22．実施例17-21によって得られた化合物のアミド誘導体(還元糖を用いたヒアルロン酸の還元的アミノ化により得られた誘導体のアミド化)

水中の、実施例17によって得られたヒアルロン酸のアミン誘導体(0.25% w/v)の溶液を、実施例1で得られたアミン誘導体(30当量)と混合し、得られた溶液pHを、水酸化ナトリウム(1N、0.1N)または塩酸(1N、0.1N)の適当な添加により6.8に調整した。その後、予め水：ジメチルスルホキシド(1.1：1)中に溶解された、(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(5当量、11% w/v)およびヒドロキシベンゾトリアゾール(3.5当量、6% w/v)の溶液を滴下添加した。溶液のpHを、水酸化ナトリウム(1N、0.1N)の適当な添加により6.8に調整し、得られた未処理の生成物を、室温で16時間にわたり反応させた。その後、pHを、水酸化ナトリウム/塩酸(0.1N)を用いて適宜に7に調整し、得られた溶液を水に対し繰返し透析した(カットオフ：12-14000)。その後、溶液を塩化ナトリウムと、5% w/v力価が達成されるまで混合し、所望の生成物をエタノールで沈殿させ、乾燥させて、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：90%、還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化：90%。

【0081】

実施例23．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミド誘導体(還元糖のカルボキシリック誘導体を用いたアシル化)

水中の、実施例7によって得られた脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム(0.30% w/v)の溶液を、ラクトビオン酸(30当量)と混合し、得られた溶液pHを、水酸化ナトリウム(1N、0.1N)または塩酸(1N、0.1N)の適当な添加により6.8に調整した。その後、予め水：ジメチルスルホキシド(1.1：1)中に溶解された、(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(5当量、11% w/v)およびヒドロキシベンゾトリアゾール(3.5当量、6% w/v)の溶液を滴下添加した。溶液のpHを、水酸化ナトリウム(1N、0.1N)の適当な添加により6.8に調整し、得られた未処理の生成物を、室温で16時間にわたり反応させた。その後、pHを、水酸化ナトリウム/塩酸(0.1N)を用いて適宜に7に調整し、得られた溶液を水に対し繰返し透析した(カットオフ：12-14000)。その後、溶液を塩化ナトリウムと、5% w/v力価が達成されるまで混合し、所望の生成物をエタノールで沈

10

20

30

40

50

殿させ、乾燥させて、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：79%、ラクトビオン酸を用いたアシル化：5%。

【0082】

実施例24．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のカルボキシリック誘導体を用いたアシル化）

実施例4によって調製されたラクトビオン酸の溶液を、水中の、実施例7によって得られた脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム（0.5当量、0.30% w/v）の溶液に添加し、かくて得られた未処理の生成物を、室温で16時間にわたり反応させた。その後、pHを、水酸化ナトリウム/塩酸（0.1N）を用いて適宜に7に調整し、得られた溶液を水に対し繰返し透析した（カットオフ：12-14000）。その後、溶液を塩化ナトリウムと、5% w/v力価が達成されるまで混合し、所望の生成物をエタノールで沈殿させ、乾燥させて、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：87%、ラクトビオン酸を用いたアシル化：16%。

10

【0083】

実施例25．部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のカルボキシリック誘導体を用いたアシル化）

実施例4によって調製されたラクトビオン酸の溶液を、水中の、実施例7によって得られた脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウム（0.5当量、0.30% w/v）の溶液に添加し、かくて得られた未処理の生成物を、室温で16時間にわたり反応させた。その後、飽和塩化ナトリウム溶液を、塩化ナトリウム5% w/vの最終力価を得るべく十分な量で添加し、混合物を1時間にわたり攪拌下に置き、最後にアセトンの添加により生成物を沈殿させ、得られた固体を単離し、次いで乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：85%、ラクトビオン酸を用いたアシル化：16%。

20

【0084】

実施例26．有機媒体中の、部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のカルボキシリック誘導体を用いたアシル化）

実施例4によって調製されたラクトビオン酸の溶液を、ジメチルスルホキシド中の、実施例11によって得られた脱アセチル化されたテトラブチルアンモニウムヒアルロン酸塩（0.5当量、2% w/v）の溶液に添加し、かくて得られた未処理の生成物を、室温で16時間にわたり反応させた。その後、飽和塩化ナトリウム溶液を、塩化ナトリウム5% w/vの最終力価を得るべく十分な量で添加し、混合物を1時間にわたり攪拌下に置き、最後に生成物をアセトンの添加により沈殿させ、得られた固体を単離し、次いで乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：80%、ラクトビオン酸を用いたアシル化：10%。

30

【0085】

実施例27．有機媒体中の、部分的に脱アセチル化されたヒアルロン酸のアミド誘導体（還元糖のカルボキシリック誘導体を用いたアシル化）

実施例4によって調製されたラクトビオン酸の溶液を、ジメチルホルムアミド中の、実施例7によって得られた脱アセチル化されたヒアルロン酸ナトリウムの溶液（0.5当量、2% w/v）の溶液に添加し、かくて得られた未処理の生成物を、室温で16時間にわたり反応させた。その後、飽和塩化ナトリウム溶液を、塩化ナトリウム5% w/vの最終力価を得るべく十分な量で添加し、混合物を1時間にわたり攪拌下に置き、最後に生成物をアセトンの添加により沈殿させ、得られた固体を単離し、次いで乾燥させた。生成物を、IRおよび¹H-NMR分光法により特性評価した。反応収率：88%、ラクトビオン酸を用いたアシル化：19%。

40

【0086】

実施例28．実施例23-27によって得られた化合物のアミド誘導体（還元糖のアミン誘導体を用いたヒアルロン酸のアシル化により得られた誘導体のアミド化）

水中の、実施例24によって得られたヒアルロン酸のアミド誘導体（0.25% w/v

50

）の溶液を、実施例 1 で得られたアミン誘導体（30 当量）と混合し、得られた溶液 pH を、水酸化ナトリウム（1 N、0.1 N）または塩酸（1 N、0.1 N）の適当な添加により 6.8 に調整した。その後、予め水：ジメチルスルホキシド（1.1：1）中に溶解された、（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩（5 当量、11% w/v）およびヒドロキシベンゾトリアゾール（3.5 当量、6% w/v）の溶液を滴下添加した。溶液の pH を、水酸化ナトリウム（1 N、0.1 N）の適当な添加により 6.8 に調整し、得られた未処理の生成物を、室温で 16 時間にわたり反応させた。その後、pH を、水酸化ナトリウム/塩酸（0.1 N）を用いて適宜に 7 に調整し、得られた溶液を水に対し繰返し透析した（カットオフ：12 - 14000）。その後、溶液を塩化ナトリウムと、5% w/v 力価が達成されるまで混合し、所望の生成物をエタノールで沈殿させ、乾燥させて、IR および ¹H-NMR 分光法により特性評価した。反応収率：84%、還元糖のアミン誘導体を用いたアミド化：93%。

10

【0087】

実施例 29 . 炎症マーカーの減少

NIH-3T3 系マウス線維芽細胞を、DMEM 中で、10% ウシ胎児血清 FCS の存在下で増殖させ、IL1 = 1 ng/ml で 24 時間処理した。その後、いくつかの培養物を、実施例 13 によって得られた濃度 1.25 mg/ml のヒアルロン酸のアミド誘導体とインキュベートした。細胞 RNA を、処理から 6、12、および 24 時間で抽出し、その後の qPCR による前炎症性サイトカイン TGF-β1 の発現の分析用とした。前記分析は、増幅反応中に遺伝子発現が定量化されるようにする、ロータージーン（Rotor Gene）Q シリーズを用いて実施した。qPCR 用の反応混合物中には、二重鎖 DNA 分子の副溝に結合する蛍光分子が存在する。各反応につき、ネガティブコントロールもまた実施した（cDNA なしの反応混合物）。実験は、二重に行い、統計分析を両側 t 検定により実施した。t 検定値 < 0.05 をもつ差異が、有意と見なされた。表に提示された値は、Pfaffl 2⁻ Ct 法（Pfaffl M.V. 「Nucleic Acid Research」、2001 年、第 29 巻、第 9 号、e45）を用いた比較定量法によって得られた、2⁻ Ct に対応する：

20

$$Ct = Ct_{\text{ハウスキーピング}} - Ct_{\text{遺伝子標的}}$$

$$Ct = Ct_{\text{試料}} - Ct_{\text{コントロール}}$$

$$2^{-Ct}$$

30

【0088】

【表 1】

時間 (時間)	未処理の コントロール	IL18 で処理された コントロール	IL18 およびヒアルロン酸の アミド誘導体で処理
	TGF-β1	TGF-β1	TGF-β1
6	1.000	2.101	1.289
12	1.000	1.112	0.946
24	1.000	0.778	0.462

40

【0089】

ガレクチンによって影響される病理学的プロセスを調節する能力は、本発明によって得られたヒアルロン酸誘導体の、線維症などのガレクチン 3 により調節されるプロセスにおける炎症カスケードのサイトカインダウンストリーム、TGF-β1 の発現を低減する著しい能力を実証している、実施例 29 によって十分に裏付けられる。

50

【図面】
【図 1】

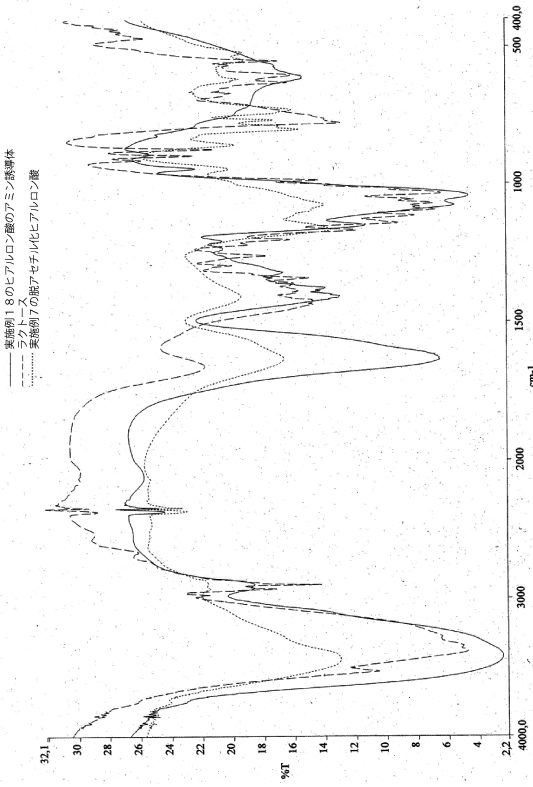


Fig. 1

【図 2】

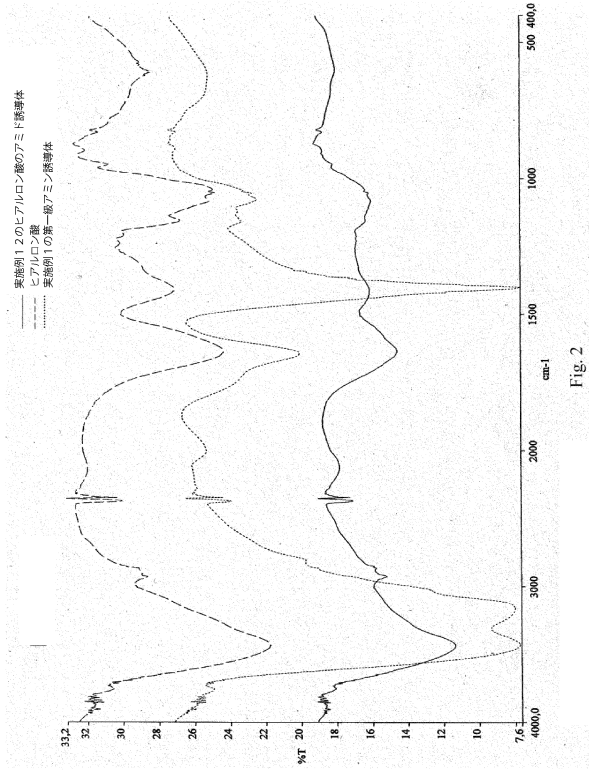


Fig. 2

【図 3】

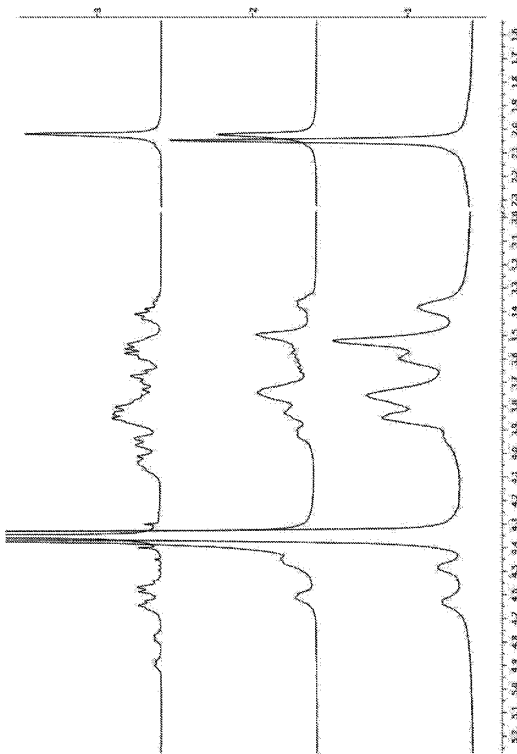


Fig. 3

【図 4】

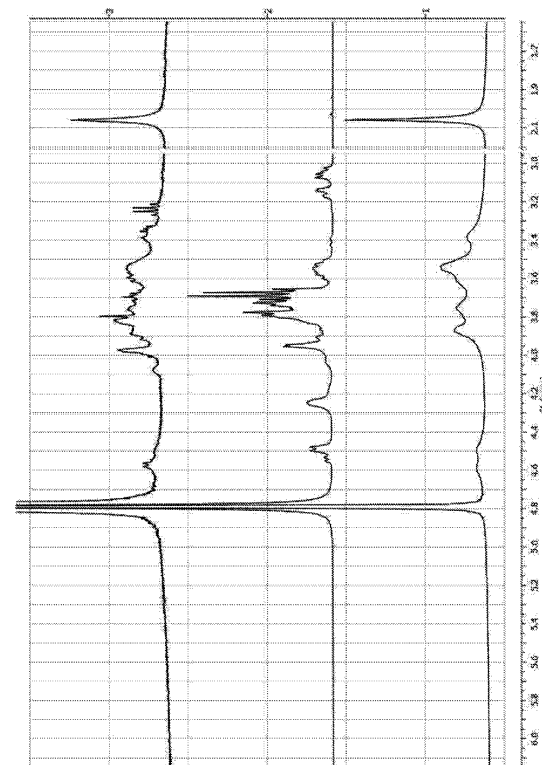


Fig. 4

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 L	33/08 (2006.01)	A 6 1 L	33/08	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

審査官 安藤 倫世

(56)参考文献	特表 2 0 0 2 - 5 1 9 4 8 1 (J P , A)
	特表 2 0 0 1 - 5 2 2 3 8 5 (J P , A)
	特表平 0 2 - 5 0 4 1 6 3 (J P , A)
	特開昭 6 2 - 0 6 4 8 0 2 (J P , A)
	国際公開第 2 0 1 4 / 0 3 8 6 4 1 (W O , A 1)
	国際公開第 2 0 1 4 / 0 2 7 2 0 3 (W O , A 1)
	国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 2 5 5 1 (W O , A 1)
(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)	
	C 0 8 B
	A 6 1 K
	C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)