

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4094059号
(P4094059)

(45) 発行日 平成20年6月4日(2008.6.4)

(24) 登録日 平成20年3月14日(2008.3.14)

(51) Int.Cl. F I
C O B B 37/08 (2006.01) C O B B 37/08 Z

請求項の数 15 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平9-522511 (86) (22) 出願日 平成8年12月19日(1996.12.19) (65) 公表番号 特表2000-502141(P2000-502141A) (43) 公表日 平成12年2月22日(2000.2.22) (86) 国際出願番号 PCT/EP1996/005701 (87) 国際公開番号 W01997/022629 (87) 国際公開日 平成9年6月26日(1997.6.26) 審査請求日 平成15年11月27日(2003.11.27) (31) 優先権主張番号 PD95A000244 (32) 優先日 平成7年12月20日(1995.12.20) (33) 優先権主張国 イタリア(IT)</p>	<p>(73) 特許権者 フィディア ファルマチェウティチ ソシ エタ ペル アチオニ イタリア国、アバノ テルメ、ヴィア ポ ンテ デッラ ファヅブリカ 3/エイ</p> <p>(74) 代理人 弁理士 山下 穰平</p> <p>(72) 発明者 カッレガロ・ランフランコ イタリア国、36016 シエネ、ヴィア モンテ グラッパ、6</p> <p>(72) 発明者 レニアー・ダヴィデ イタリア国、35138 パドヴァ、ヴィ ア パレストロ、109</p> <p>審査官 原田 隆興</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 低い多分散指数を有するヒアルロン酸分画の調整方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

5,000から300,000までの範囲の平均分子量を有するヒアルロン酸又はその塩の分画の調製において、50,000から10,000,000までの範囲の平均分子量を有する出発ヒアルロン酸又はその塩を、次亜塩素酸ナトリウムのモル/ヒアルロン酸繰返し単位のモルの比率が0.01と5の間より成るような濃度での次亜塩素酸ナトリウムの存在下で同時に超音波で240分以下の時間処理することより成る調製方法。

【請求項2】

ヒアルロン酸が100,000と1,500,000の範囲の分子量を有する鶏頭から抽出される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

生成するヒアルロン酸分画が5,000から50,000までの範囲の分子量を持つ、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

生成するヒアルロン酸分画が5,000~10,000の範囲の平均分子量を持つ、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

生成するヒアルロン酸が10,000~15,000の範囲の平均分子量を持つ、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

生成するヒアルロン酸が 15,000 ~ 25,000 の範囲の平均分子量を持つ、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

25,000 ~ 50,000 の範囲の平均分子量を持つ請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

出発ヒアルロン酸が発酵工程からの由来であり且つ 1,000,000 から 5,000,000 までの範囲の平均分子量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

生成するヒアルロン酸分画が 50,000 から 300,000 までの範囲の平均分子量を持つ、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

出発ヒアルロン酸が生体外合成からの由来であり且つ 50,000 から 10,000,000 までの範囲の平均分子量を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

出発ヒアルロン酸又はその塩を含む NaCl 水溶液が温度 4 且つ濃度 10 mg/ml で実行される、請求項 1 - 10 の何れにも記載の方法。

【請求項 12】

1 から 20 重量% の範囲の濃度を有する水溶液の形で NaCl が前記溶液に添加される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

NaCl のモル/ヒアルロン酸繰返し単位のモルの比率が 0.5 と 2.5 の間より成るような濃度で NaCl が添加される、請求項 1 - 12 の何れにも記載の方法。

20

【請求項 14】

120 と 240 分の間より成る時間実行される、請求項 1 - 13 の何れにも記載の方法。

【請求項 15】

超音波が 50 と 200 W の間より成る出力を有する、請求項 1 - 14 の何れにも記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は平均分子量が 5,000 と 300,000 の間より成り且つ出発高分子量ヒアルロン酸を次亜塩素酸ナトリウムと超音波で同時に処理する 1.7 以下の多分散指数を有するヒアルロン酸分画の調製方法に関する。

30

従来技術

ヒアルロン酸は配糖体結合 1 - 3 及び 1 - 4 によりリンクされたグルクロン及び N - アセチルグルコサミンにより形成された二糖単位の繰返しにより構成された天然の、線状多糖類で、生体親和性且つ生分解性である。

ヒアルロン酸は高級器官の結合組織の中、滑液の中、膝帯の中及び鶏頭の中に存在する；それは又連鎖球菌のようなある種の細菌形態から合成もされ得る（ケンドールほか、*Journ. Biol. Chem.*, vol. 118, p 61, 1937）。

ヒアルロン酸は組織の水和、ムコ多糖の組織化、細胞分化及び脈管形成のような多くの生物学的過程で活発な役割を演じる。ヒアルロン酸溶液のレオロジー的性質に関連して多くの生体医学的応用がある：一つの重要な部門は眼の外科手術のそれである（グラブほか、*Exp. Eye Res.*, vol. 31, p 119, 1979）。ヒアルロン酸及びその誘導体（デラバレとロメオ、EP0216453, 1987. で記述されたヒアルロン酸エステルのような）を含む他の生体医学的応用は組織回復（外傷、火傷）に関連した過程に関する。

40

低分子量分画に関して、種々の分野又は応用が皮膚科学（スコット EP0295092, B1, 1987）及び薬理学で成功裡に探求されている。ある種の生物学的性質が分子量の減少及び種々の局在化と分散指数（ M_w , M_n , M_z ）及び多分散指数により特徴付けられた分布曲線の機能に敏感なことを証明した。例えば、低分子量ヒアルロン酸は多糖類

50

の血管新生を増加させる能力で作用する、又はTNFのような特定の抑制因子として炎症性の進行を阻害する脈管形成可能な物質として作用する(ノブルほか, *J. Clin. Inv.*, vol. 91, p 2163, 1993)。更に、ヒアルロン酸の低分子量分画は骨形成現象に又抗ウイルス剤として使用できる。

ヒアルロン酸分画の調製には例えば加熱、超音波、紫外線及びガンマー線照射を含む物理的方法、又はヒアルロン酸分解酵素を用いる酵素反応(チャブレックほか, *Jour. Appl. Poly. Sci.*, vol. 48, p 233, 1991; レハコバほか, *Int. J. Biol. Macrom.*, vol. 16/3, p 121, 1994)による、更にまた、アスコルビン酸との化学的解重合反応(クリーブランドほか, *Bioch. Biophys. Acta*, vol. 192, p 385, 1969)又は次亜塩素酸塩類との処理(シラーほか, *Biol. Chem. Hopp-Seyler*, vol. 375, p 169, 1994)により得られた多くの例がある。然し、すべての引用した方法は得られた生成物のタイプについて幾つかの方法に分けられる。事実、これらの幾つかは例え配糖体結合を阻害して一次重合構造を変更しないとしても、これらは低い多分散指数により特徴付けられる分解された低分子量生成物を生成することは出来ない。事実、超音波又は熱を用いた技術は漸近的傾向を呈する解重合反応速度論(*depolymerization kinetics*)を作ることが見られた。更に同時に同じ条件(超音波出力と温度)での処理は生成物の完全な分解に導く。

これらの物理的方法と違って、ヒアルロン酸分解酵素の作用により誘導された解重合は結果としての重合鎖の一次構造の保持による反応の効力及び分解反応速度論の制御のような或種の利点を生じさせる。然しこれらのパラメーターの観察は低分子量分布により特徴付けられる高い化学的生産量又は生産物を保証しない。

最後に、次亜塩素酸ナトリウムやアスコルビン酸のような化学薬品の大量の作用は同時に分子量の損失及び重合鎖の化学構造の重大な変更にも導く。望ましい分子の輪郭を持つ分解誘導体はこれらの試薬の注意深い且つ制御された使用によってのみ得ることができる、それ故工業的規模での化学工程の可能性のある使用は大きく制約される。

発明の要約

本発明は、50,000と10,000,000の間の平均分子量を有しているヒアルロン酸又はその塩を、次亜塩素酸ナトリウムのモル/ヒアルロン酸繰返し単位(HA r. u.)のモルの比率が0.01と5の間より成るような濃度の次亜塩素酸ナトリウムの存在下で同時に超音波で240分間以下の時間処理することにより成る、5,000から300,000までの範囲の平均分子量を有しているヒアルロン酸又はその塩の分画の調製方法に関する。

【図面の簡単な説明】

図1: 1.0から10.0までの範囲の、NaClOのモル/HA r. u.のモルの比率を使用して平均分子量175,000を有している出発ヒアルロン酸を8時間次亜塩素酸ナトリウムだけで行った解重合の結果を図表の形で表現、前記モル比は横軸で、平均分子量は左縦軸に且つ多分散指数は右縦軸に書いた。

図2: NaClOのモル/HA r. u.のモルの比率 = 5.0で次亜塩素酸ナトリウムだけで行った解重合の分解反応速度論(*degradation kinetics*)のグラフ、ここで時間は横軸に、平均分子量は左縦軸に且つ多分散指数は右縦軸に書いた。

図3: ヒアルロン酸分画D3-bに行われた解重合の分解反応速度論の図表、時間を横軸に、平均分子量は左縦軸に且つ多分散指数は右縦軸に書いた。

図4: ヒアルロン酸分画D2に行われた解重合の分解反応速度論の図表、時間(分)を横軸に、平均分子量は左縦軸に且つ多分散指数は右縦軸に書いた。

図5: NaClOのモル/HA r. u.のモルの比率が0.5, 1.0, 2.5である次亜塩素酸ナトリウムと超音波で同時に処理された分子量990,000及び多分散指数 = 1.40を有する出発ヒアルロン酸及び比較のための超音波だけで処理した同じヒアルロン酸に行われた解重合の分解反応速度論の表現、平均分子量は縦軸で、一方時間(分)は横軸に書かれた。

10

20

30

40

50

図6：NaClOのモル/HA r.u.のモルの比率が0.5, 1.0, 2.5である次亜塩素酸ナトリウムと超音波で同時に処理された分子量990, 000及び多分散指数=1.40を有するヒアルロン酸及び比較のための超音波だけで処理した同じヒアルロン酸に行われた解重合の分解反応速度論の表現、多分散指数は縦軸で、一方時間(分)は横軸に書かれた。

発明の詳細な説明

本発明に従う工程は異なった分子量を有しているヒアルロン酸又はその塩を解重合するのに使用され得る。

例えばそれはEP0138572及びEP-A-0535200に記載されている如く100,000から1,500,000までの範囲の平均分子量を持っている鶏頭から抽出されたヒアルロン酸を解重合するのに使用され得る。

この場合ヒアルロン酸分画はなるべくなら5,000から50,000までの分子量を持つ、もっと出来れば以下の範囲内にあるのがよい：5,000-10,000, 10,000-15,000, 15,000-25,000, 及び25,000-50,000。本発明に従う工程は例えば発酵技術由来の且つ寧ろ高い分子量、一般に1,000,000から5,000,000までの範囲、を持つことを特徴とする市販のヒアルロン酸の解重合にも都合よく使用できる、又本発明に従う解重合工程により前記ヒアルロン酸から50,000から300,000の範囲より成る平均分子量を持っているヒアルロン酸分画を得ることが可能である。

最後に本発明に従う工程はPCT特許出願番号WO95/24497で公開された生体外合成法により得られる、50,000から10,000,000までの分子量範囲を持つことを特徴とするヒアルロン酸の高分子量分画にも都合良く実行され得る。

本発明に従う工程は一般なるべくなら10mg/mlの濃度で且つなるべくなら4の温度で出発ヒアルロン酸又はその塩を含んでいるNaCl水溶液で実行される。

本発明に従う工程では、NaClOは一般に1から20重量%の範囲の濃度で水溶液の形で前記溶液に添加される。

本発明に従う工程では、NaClOはなるべくならNaClOのモル/HA r.u.のモルの比率が0.5と2.5の間より成るような濃度で添加される。

本発明に従う工程はなるべくなら120と240分の間より成る時間行われる。

超音波はなるべくなら50と200ワットの間出力で且つ10から50kHzの周波数範囲を持つ。

更に本発明に従う工程は簡単な数学関数により制御と追跡が出来る解重合反応速度論を用意する、然しとりわけ前述の如く、それは低い多分散指数(Pd 値= $Mw/Mn < 1.7$)を有している多糖類分画を得ることを許す、さもなければそれは長時間で且つ高価な精製工程によってだけ入手可能となるであろう。

分子量と多分散指数値は、屈折率(RI)及び多角レーザー光散乱(MALLS)などを計測する種々の計器と結合した次元分子篩(dimensional exclusion)クロマトグラフィーにより決定された。

本出願人はNaClOと超音波の同時処理だけがこの目的に達することを実際思いもかけず発見した、これに反し超音波技術とNaClOが二つの別々の段階で加えられるような選択的方法では低い分子量分画と低い多分散指数とを同時に得ることには成功しなかった。

事実次の三つの選択的方法が行われた：

1) 方法‘A’：次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加に続いてその溶液への超音波処理により得られた解重合。

2) 方法‘B’：与えられた出力を固定した超音波の作用、続いて次の段階で次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加することによる解重合。

3) 方法‘C’：次亜塩素酸ナトリウム溶液と超音波を組み合わせた同時作用により得られた解重合。

三つの方法の比較を容易にするために、反応変数(ヒアルロン酸の濃度、次亜塩素酸塩の

10

20

30

40

50

濃度、超音波の出力など)を出来るだけ不変に与えることを試みた。抽出により得られた100,000と1,500,000の間の範囲にあるMwを持つヒアルロン酸溶液で出発して、分解反応速度論で50 で違った、NaClOのモル/HA r.u.のモルの比率の次亜塩素酸塩の(5%)溶液で1と48時間の間の変動する期間処理することによる重合体を研究した。ねらいは多分散指数 1.7を持つ分子量5,000乃至20,000Daのヒアルロン酸分画を作り出すことにあった。

図1は平均分子量175,000を持つヒアルロン酸HA-1から出発して表1に書かれた1.0と1.0の間の異なった、NaClOのモル/HA r.u.のモルの比率で次亜塩素酸ナトリウム溶液と8時間反応して得られたヒアルロン酸分画と多分散指数を表している、又モル比值5.0をとり曲線は表2に書かれたデータと共に図2の分解反応速度論を構成し且つ表現した。

— 表 1 —

生成物	記号	M _w	P _d
天然HA	HA-1	175,000	1.24
HA分解物 モル比： NaClO/HA r.u.: 1/1	D ₁	119,000	1.29
HA分解物 モル比： NaClO/HA r.u.: 2/1	D ₂	64,000	1.32
HA分解物 モル比： NaClO/HA r.u.: 5/1	D ₃	21,000	1.81
HA分解物 モル比： NaClO/HA r.u.: 10/1	D ₄	6,000	2.2

— 表 2 —

生成物	記号	M _w	P _d
時間: 1 時間	D ₃ -a	73,000	1.35
時間: 2 時間	D ₃ -b	56,000	1.41
時間: 8 時間	D ₃ -c	21,000	1.81
時間: 24 時間	D ₃ -d	11,500	1.98
時間: 48 時間	D ₃ -e	5,000	3.00

20,000D以下の分子量で且つ数値(M_w/M_n)が1.7を越えない多分散指数により特徴付けられるヒアルロン酸分画を得ることが困難なことは得られたデータから明らかである。多量の解重合剤の使用及び/又は反応時間の増加によって、望みの分子分布特

10

20

30

40

50

性を持つヒアルロン酸分画（重合体の完全な分解）を得ることは不可能である。

方法‘A’の研究を完成させるために、メタノールとアセトンより成る有機混合液での沈澱により反応混合物から分離された記号D2及びD3-bの分画を使用した。NaClの0.15M溶液に溶解した後、これらは150と200Wの間の出力で且つ20kHzに設定した超音波で15分から8時間の間処理される。表3はゲル浸透クロマトグラフィーにより明らかになったMwと多分散指数値を示す。

— 表3 —

分画	D ₂		D _{3-b}	
	M _w	P _d	M _w	P _d
0	64,000	1.32	56,000	1.41
15	62,000	1.32	51,500	1.43
30	57,000	1.33	47,500	1.43
60	52,500	1.35	44,000	1.45
120	48,000	1.35	41,500	1.47
240	46,500	1.36	39,000	1.51
480	42,000	1.41	37,500	1.53

データと関連グラフ（図3と4）は方法‘A’を用いて望ましいMwを持つHA分画を製造することが不可能なことを示す。超音波処理時間を増加させる、又は化学的多分散条件を変更することによってさえ、多分散指数<1.7によって特徴付けられ且つ5,000と20,000の間の分子量を持つ最終生成物を得ることは未だ不可能である。

方法‘B’も又、方法‘A’で述べたのと同じく天然ヒアルロン酸から出発して、超音波及び次亜塩素酸塩との反応の二つの別々の工程による二重処理を含むが、望まれる平均Mw又は多分散指数を持つ分画は製造しない。正確に言うと、超音波の作用は約35,000の分子量と多分散指数1.5（4で4時間の処理後）を持つヒアルロン酸を作り出すけれども、その後の次亜塩素酸ナトリウムとの化学反応が極度に穏やかな条件下であってさえも製品の構造特性を荒廃させる効果を有することが指摘された。

方法‘C’、本発明で記述されるその革新的結果は超音波と次亜塩素酸ナトリウムの作用を組み合わせ且つ制御する。その組合わせた作用は0と480分間の間の期間にわたってこれら二つの因子の同時使用を含む。化学物理的分解は、チタンをコートした投込み型プローブで作られる20kHzの周波数を持つ150W超音波を使用しながら、NaClの溶液（4の温度で0.15M）中で起こる。更に、NaClの5%溶液が0.5と2.5（NaClのモル/ヒアルロン酸のモルの比率）の間の範囲で天然ヒアルロン酸（Mw約1,000,000）に関して一モル濃度に加えられる。反応速度論的に決まった時間毎に溶液の一定量を採取して5倍量のメタノール/アセトン混合液中に沈澱させる。生成物はそこで乾燥され、二つの前述の計測手段を用いてゲル浸透クロマトグラフィーにより分析される：その間TSK型（G2000及びG3000）の二つの直列カラムが分離に使用される。

この分析のデータは表4（分子量）と表5（多分散度）に記載した。この結果をよりはっきりさせるため、方法‘B’の第一段階（超音波処理だけ）で得られたMwも含めた。

- 表4 -

時間 (分)	超音波のみ (Mw)	超音波+0.5* (Mw)	超音波+1* (Mw)	超音波+2.5* (Mw)
0	990,000	990,000	990,000	990,000
15	645,000	396,000	341,500	286,000
30	453,000	198,000	125,000	92,400
60	266,000	67,000	61,400	35,000
120	172,300	23,000	11,500	7,800
240	89,400	13,400	<5,000	<5,000
480	54,900	<5,000	<5,000	<5,000

10

* = $\frac{\text{NaClOのモル}}{\text{HA r. u. のモル}}$ の比率

- 表5 -

時間 (分)	超音波のみ (Pd)	超音波+0.5* (Pd)	超音波+1* (Pd)	超音波+2.5* (Pd)
0	1.40	1.40	1.40	1.40
15	1.45	1.32	1.42	1.50
30	1.51	1.34	1.45	1.53
60	1.56	1.38	1.60	1.55
120	1.60	1.44	1.63	1.7
240	1.60	1.55	>1.7	>1.7
480	1.65	>1.7	>1.7	>1.7

20

* = $\frac{\text{NaClOのモル}}{\text{HA r. u. のモル}}$ の比率

30

二組の分析データの比較は要求される分子輪郭を持つ少なくとも三つの分画を得ることが可能なことを示す。これら三つの別種の生成物は記号名D4(時間:240分;NaClO 0.5)、D5(時間:120分;NaClO 1.0)及びD6(時間:120分;NaClO 2.5)と呼ばれるだろう。これらは夫々13,400、11,500及び7,800の分子量を持ち、多分散指数値は1.55と1.7の間にある。

5,000以下のMw値はそれらが計器の感度限界以下にあるので正確に確かめることは非常に難しい、それで斯かる値を持つ分画は規定が困難である。

同時に組合わせた分解方法‘C’が分子量の多分散度による許容限界内に残るヒアルロン酸分画を製造することを示すことは興味がある。これらの結果は解重合反応の特異性を確認する、そして図5と6の曲線による判断、以下の反応パラメーター:超音波出力150 W、120分の期間及び1モルのNaClO/ヒアルロン酸のモルのモル濃度、を用いて実行された三つのテストにより確認された良好な反応速度論的制御、前述の実験に用いたのと同じヒアルロン酸から出発して又表6に記した対応するデータは同じ実験条件が使用される時には分解工程が再現可能であることを示す。

40

- 表6 -

生成物	M _w	Pd	反応収率
D ₅ -a	11,100	1.60	55%
D ₅ -b	10,700	1.55	61%
D ₅ -c	12,000	1.60	65%

ここで実例として以下の諸例を記載するが、本発明に従う方法の目的を限定するものではない。

実施例 1 : 5,000 と 10,000 の間の分子量を持つヒアルロン酸の調製

抽出によって得られたヒアルロン酸から 990,000 Da の分子量を持つヒアルロン酸ナトリウム 2.40 gr を、NaCl の 0.15 M 溶液 240 ml 中に溶解させる。14% NaClO 溶液 7.9 ml を添加する。+4 に保温したまま、その結果としての溶液は 150 W の強度で且つ 20 kHz の周波数の超音波で 120 分間処理される。

一滴の粘性から反応の完了がわかると直ちに、0.1 N HCl で pH を 6.5 にして、メタノール - アセトン 2 : 1 の混合液 1,000 ml 中に沈澱させる。生成物は濾過で分離されて 45 で 48 時間真空乾燥させられる。

斯くしてナトリウム塩の形で 1.65 gr が得られる (記号 HA - D9 - Na)。高速液体クロマトグラフィー - ゲル浸透クロマトグラフィー分析は、得られたヒアルロン酸分画が重量平均分子量 (M_w) 5,850、数平均分子量 (M_n) 3,640 及び多分散指数 1.61 を持つことを明らかにした。

天然ヒアルロン酸と比較したフーリエ変換赤外分光法はスペクトルにどんな異常も明らかにしなかった。最後に、D - グルクロン酸の決定用のカルバゾールを用いる方法によって得られた、ヒアルロン酸の存在率の分析は純度 95% を示した。

実施例 2 : 10,000 と 15,000 の間の分子量を持つヒアルロン酸の調製

抽出によって得られたヒアルロン酸から 740,000 Da の M_w を持つヒアルロン酸ナトリウム 2.5 gr を、NaCl の 0.15 M 溶液 250 ml 中に溶解させる。14% NaClO 溶液 3.3 ml を添加する。+4 に保温したまま、その結果としての溶液は 150 W の強度で且つ 20 kHz の周波数の超音波で 120 分間処理される。

一滴の粘性から反応の完了がわかると直ちに、0.1 N HCl で pH を 6.5 にして、メタノール - アセトン 2 : 1 の混合液 1,000 ml 中に沈澱させる。生成物は濾過で分離されて 45 で 48 時間真空乾燥させられる。

斯くしてナトリウム塩の形で 1.50 gr が得られる (記号 HA - D9 - Na)。高速液体クロマトグラフィー - ゲル浸透クロマトグラフィー分析は、得られたヒアルロン酸分画が重量平均分子量 (M_w) 11,650、数平均分子量 (M_n) 7,330 及び多分散指数 1.59 を持つことを明らかにした。

天然ヒアルロン酸と比較したフーリエ変換赤外分光法はスペクトルにどんな異常も明らかにしなかった。最後に、D - グルクロン酸の決定用のカルバゾールを用いる方法によって得られた、ヒアルロン酸の存在率の分析は純度 98% を示した。

実施例 3 : 15,000 と 25,000 の間の分子量を持つヒアルロン酸の調製

抽出によって得られたヒアルロン酸から約 1,000,000 Da の分子量を持つヒアルロン酸ナトリウム 1.00 gr を、NaCl の 0.15 M 溶液 100 ml 中に溶解させる。

14% NaClO 溶液 0.6 ml を添加する。+4 に保温したまま、その結果としての溶液は 150 W の強度で且つ 20 kHz の周波数の超音波で 120 分間処理される。

一滴の粘性から反応の完了がわかると直ちに、0.1 N HCl で pH を 6.5 にして、メタノール - アセトン 2 : 1 の混合液 500 ml 中に沈澱させる。生成物は濾過で分離さ

10

20

30

40

50

れて45で48時間真空乾燥させられる。

斯くしてナトリウム塩の形で0.65grが得られる(記号HA-D8-Na)。高速液体クロマトグラフィー-ゲル浸透クロマトグラフィー分析は、得られたヒアルロン酸分画が重量平均分子量(Mw)22,500、数平均分子量(Mn)15,550及び多分散指数1.45を持つことを明らかにした。

天然ヒアルロン酸と比較したフーリエ変換赤外分光法はスペクトルにどんな異常も明らかにしなかった。最後に、D-グルクロン酸の決定用のカルバゾールを用いる方法によって得られた、ヒアルロン酸の存在率の分析は純度97%を示した。

本発明の方法により得られるヒアルロン酸分画は組織回復機構、脈管形成及び骨形成における細胞相互作用を持つ薬学的組成品の調製に広く使用できる。

更に、これらのヒアルロン酸分画は、欧州特許No.0341745B1に記載の方法に従って、麻醉性、抗炎症性、血管収縮神経性、抗生物質、抗菌性、抗ウイルス性作用を持つ化合物を含んでいる眼科的用法又は機構のための薬学的組成品の調製に使用されるべき自己架橋ヒアルロン酸の工業的製造工程に使用できる。

ヒアルロン酸誘導体も又保健及び外科的関節間分節の準備及び産業、食品及び化粧品分野でも使用できる。

前記分画は又、欧州特許No.0216453B1に記載の方法に従って、眼科学、皮膚科学、耳鼻咽喉科学、歯科学、脈管学、婦人科学での及び保健と外科的関節間分節(surgical articles)の準備に関する神経学の分野での使用のため、エステル化したヒアルロン酸のエステル化調製工程を受けることができる。

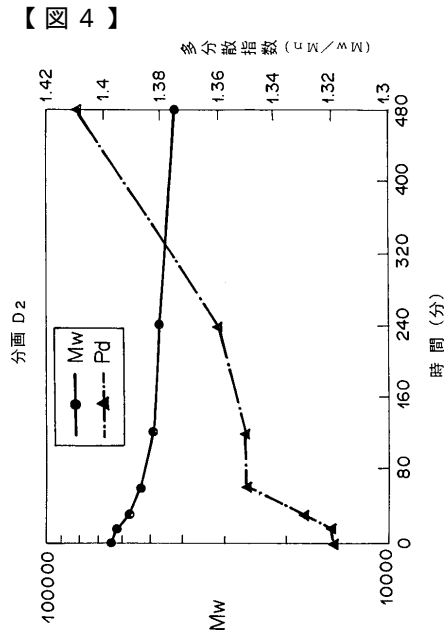
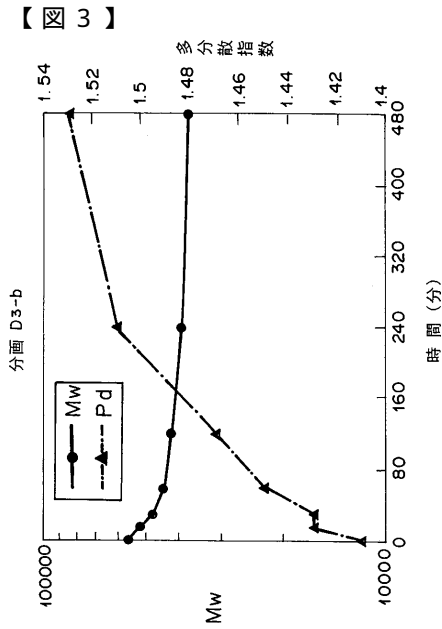
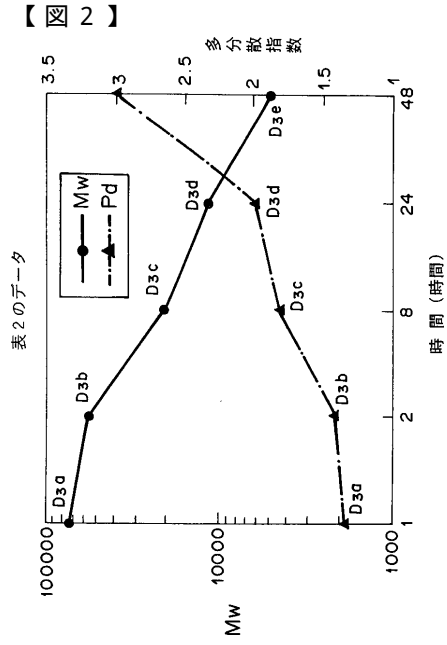
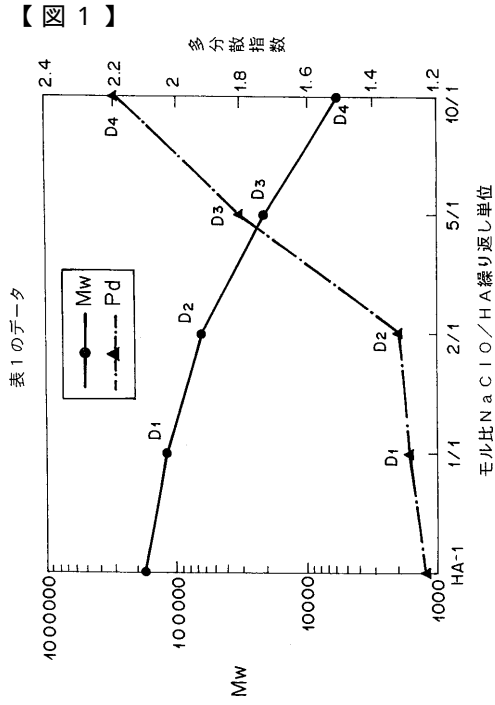
合成的に自己架橋した及びエステル化したヒアルロン酸に加えて、生体医学的生成物及び同じく外被用として、医薬品の解放を制御する賦形剤として、炎症の治療に及び挫傷や火傷の傷治癒過程の加速に、眼科学、皮膚科学、耳鼻咽喉科学、歯科学、脈管学、婦人科学、泌尿器科学、血液透析、心臓学、体外循環での使用のために、特許出願No.PCTWO95/25751に記載の方法に従って硫酸塩にしたヒアルロン酸調製のため本発明に従う工程で得られたヒアルロン酸分画を使用することも可能である。

ここで述べた発明でこれらの方法が、動物、生体工学又は生合成源から得られた天然重合物から出発して300,000Daまでの分子量を持つヒアルロン酸分画を得るように変更できることは明らかである。斯かる変更が本発明の精神と目的からの逸脱と見なすべきではない。

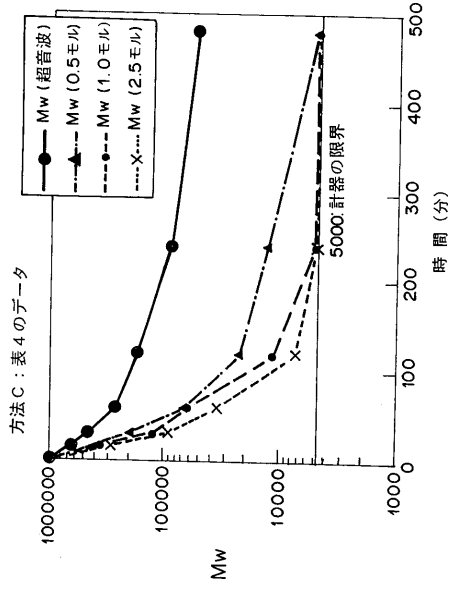
10

20

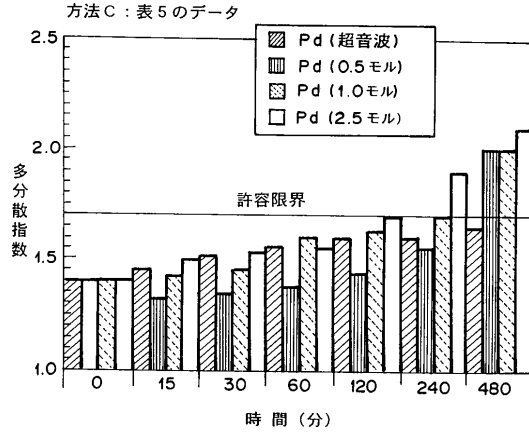
30



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平02-245193(JP,A)

Peter Chabreck et al, Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium,
1991年, Vol.48, p.233-241

Chemical Abstracts, 1994年, Vol.121, No.13, abstract no.158104, & CS 275626 A

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B 37/08