

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4394950号
(P4394950)

(45) 発行日 平成22年1月6日(2010.1.6)

(24) 登録日 平成21年10月23日(2009.10.23)

(51) Int.Cl. F I
CO8B 37/00 (2006.01) CO8B 37/00 H
CO8B 37/02 (2006.01) CO8B 37/02

請求項の数 12 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2003-547462 (P2003-547462)	(73) 特許権者	504203239
(86) (22) 出願日	平成14年11月28日(2002.11.28)		オルガンヌ ティス：レジェネラسیون レパラسیون ランプラスマン－オー ティーアール3
(65) 公表番号	特表2005-510587 (P2005-510587A)		ORGANES, TISSUS REGE NERATION, REPARATION , REMPLACEMENT－OTR3
(43) 公表日	平成17年4月21日(2005.4.21)		フランス、クレティユ エフ－94000 、リュ ピエール プロソレット、33 33, rue Pierre Bross olette, F－94000 Cret eil, France
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/004095		
(87) 国際公開番号	W02003/046014		
(87) 国際公開日	平成15年6月5日(2003.6.5)	(74) 代理人	100092897
審査請求日	平成17年8月19日(2005.8.19)		弁理士 大西 正悟
(31) 優先権主張番号	01/15444		
(32) 優先日	平成13年11月29日(2001.11.29)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遊離ヒドロキシル (OH) 基または第一級または第二級アミンを含有する化合物をスルホン化する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 個または複数の遊離ヒドロキシル基および／または 1 個または複数の置換若しくは無置換の第一級または第二級アミノ基を有する化合物をスルホン化する方法であって、該化合物を、沸点が 100℃未満のアルケン類、アルキン類またはそれらの混合物からなる群から選ばれた酸捕捉剤の存在下に、SO₃-DMF 複合体により処理することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記酸捕捉剤が、2-メチル-2-ブテン、2-メチルプロペン、2-メチルペンテンまたはそれらの異性体類、あるいはそれらの混合物からなる群から選ばれたものであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

下記の工程を包含することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法：

a) 無水の溶媒または共溶媒中の 1 個または複数の遊離ヒドロキシル基および／または 1 個または複数の置換若しくは無置換の第一級または第二級アミノ基を有する化合物の均質な溶液を可溶化または調製すること、

b) 2-メチル-2-ブテンである共溶媒混和性酸捕捉剤の過剰モル量を外界温度で添加すること、

c) 攪拌下で SO₃-DMF 複合体を速やかに添加すること、

d) 前工程で得られた混合物を 30℃未満の制御された温度で 1～2 時間攪拌すること

10

20

、
e) 4 未満にならないような pH 制御下で、アルカリ性溶液に前記混合物を添加することにより反応を停止して、スルホン化された前記化合物の塩を取得すること。

【請求項 4】

前記無水の溶媒が、ジメチルホルムアミドであることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記共溶媒が、ジメチルホルムアミドとホルムアミドからなることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アルカリ性溶液が、重炭酸ナトリウムの 2 % 溶液であることを特徴とする請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記工程 (e) で得られた、スルホン化された前記化合物の精製を包含することを特徴とする請求項 3 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

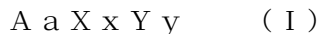
工程 (a) に先立ち、1 個または複数の遊離ヒドロキシル基および／または 1 個または複数の置換若しくは無置換の第一級または第二級アミノ基を有する化合物をプロトン化して、工程 (a) に際してのその可溶化を助長することを特徴とする請求項 3 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

1 個または複数の遊離ヒドロキシル基および／または 1 個または複数の第一級または第二級の置換若しくは無置換アミノ基を有する化合物が、単量体類、オリゴマー類および重合体類からなる群から選ばれたものであることを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

スルホン化されていてもよい、1 個または複数の遊離ヒドロキシル基および／または 1 個または複数の第一級または第二級の置換若しくは無置換アミノ基を有する化合物が、式



(ここに、A は単量体であり；X は基 $RCOOR'$ を表わし；Y は、A に固定された、式 $ROS O_3 R'$ 、 $RNS O_3 R'$ のいずれかに相当する O または N-スルホナト基を表わし；基 R は、場合により枝分れしていてもよく、および／または不飽和であってもよく、1 個または複数の芳香族環を含んでいてもよい脂肪族炭化水素鎖であり（ただし、ベンジルアミンおよびスルホン酸ベンジルアミンを除く）；R' は水素原子または陽イオン／カチオンを表わし；a は単量体の数を表わし；x は単量体 A の基 X による置換の割合または置換度を表わし；y は単量体 A の基 Y による置換の割合または置換度を表わす）の重合体であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記重合体がデキストラン誘導体またはリンゴ酸の共重合体であることを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記重合体が、エステル、アミド、エーテルおよびアセタールからなる群から選択された、酸性媒質中で不安定な官能基によって実現された単量体間または単量体とその置換基との間の結合を含んでいることを特徴とする請求項 9 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、正確な分子の定義が記述されていなければならない用途において、たとえば医薬として、使用することが可能な硫酸化化合物を、非分解惹起性で再現性のある条件下

10

20

30

40

50

で調製する方法に関するものである。

【0002】

本発明の方法は、遊離ヒドロキシル基（OH）もしくは置換または無置換第一級または第二級アミノ基を含有するあらゆる単量体、オリゴマーまたは重合体化合物に適用される。とりわけ、本発明は、官能化された重合体のO-スルホン化およびN-スルホン化の方法に関するものである。

【0003】

先行技術において報告されている硫酸化化合物調製方法は、一般に、O-またはN-スルホン化に際して、重合体鎖の切断を誘発し、それゆえ、毒性をもつ可能性のある反応残渣の生成を惹起する。本発明の方法は、オリゴ糖類などの初期重合体の元のままの構造を

10

【0004】

先行技術において、抗凝固作用をもつ官能化された重合体、とりわけ、デキストラン（D）鎖に、カルボキシメチル基（CM）、メチルベンジルアミド（B）およびメチルベンジルアミドスルホナート（S）を置換して得られる誘導体（略してCMDBSという）の一族が知られている。これらの重合体の製造方法は、とりわけ仏国特許第2461724号明細書ならびに米国特許第4740594号明細書に記載されている。これらの特許のいずれもが、得られた重合体構造の精密な分析結果を示しておらず、記載されている方法も、得られた製品が均質であることを証明できるものではない。これらの特許に記載されているスルホン化反応の実験条件は、グリコシド残基の遊離OH基へのスルホンの固定を優先するものであり、提示されている分析結果は、ベンジルアミンスルホナートの存在を明瞭に証明することができないものである。

20

【0005】

「ヘパリン結合性増殖因子」、略してHBGFと呼ばれるCMDBS族の他のメンバーが、米国特許第5693625号明細書に瘢痕形成剤として記載されている。HBFGPP類も、筋肉組織（仏国特許第2718024号明細書）、神経組織（仏国特許第2718026号明細書）、消化管組織（仏国特許第2718023号明細書）中に誘発された損傷の修復および再生を促進するというそれらの性質ならびにそれらの抗炎症性（仏国特許第2718025号明細書）について記載されている。これらの特許は、すべての生体適合性重合体のうちから、下記の4つの機能的性質を示すものを選別することを可能ならしめる機能上の一連の基準を確立している：

30

－ FGF1および2などの線維芽細胞増殖因子のごときヘパリンに親和性をもつ増殖因子（HBGF）やTGF- β などのトランスフォーミング因子を蛋白質分解から保護し、また、それらの生物活性を細胞培養についての一連の試験において増強する。

－ 1mg当り10国際単位以下の抗凝固作用を示す。

－ 生理的条件下で、白血球エラスターゼの活性を阻害する。

－ 生理的条件下で、プラスミンの活性を阻害する。

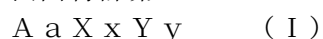
【0006】

仏国特許出願第9809309号明細書は、HBFGPPの諸性質を示し、「再生剤（ReGeneraTing Agent）」を略してRGTAと呼ばれる重合体の一族の構造を報告しており、それらの製造方法および性質を記載している。RGTAは、とりわけ皮膚瘢痕の質を改善できる抗線維化作用、とりわけフリーラジカル（電離性放射線を受けたのちまたは虚血により誘発された酸化的ストレスがあったとき）の有害な作用に対処するための抗酸化作用およびとりわけ骨性塊の組織の恒常性を調節する性質を示す。これらの性質は、HBFGPPについて記載されているそれらを補って完全なものとする。

40

【0007】

仏国特許第9809309号に記載されている重合体は、次式に対応する：



式中：Aは単量体であり；Xは基RCOOR'を表わし；Yは、Aに固定された、式R

50

$\text{OSO}_3\text{R}'$ 、 $\text{RNSO}_3\text{R}'$ のいずれかに相当する O または N-スルホナト基を表わし；基 R は、場合により枝分れしていてもよく、および／または不飽和であってもよく、1 個または複数の芳香族環を含んでいてもよい脂肪族炭化水素鎖であり（ただし、ベンジルアミンおよびスルホン酸ベンジルアミンを除く）； R' は水素原子または陽イオン／カチオンを表わし；a は単量体の数を表わし；x は単量体 A の基 X による置換の割合または置換度を表わし；y は単量体 A の基 Y による置換の割合または置換度を表わす。

【0008】

仏国特許第 9809309 号に記載されている重合体のうち、デキストランの誘導体を CMD S として挙げるができる。CMD S タイプの重合体は、抗凝固剤として記載されてもいる（マイガ (Maiga) ら、カーボハイドレート・ポリマーズ (Carbohydrate Polymers)、1997 年、第 32 巻、第 89-93 頁）。

10

【0009】

これらの先行技術例において、記載されている合成法は、分子の無損傷状態の維持および汚染物質の不存在を保証する十分な再現性という基準に従って製品を取得することができない。すなわち、カルボキシル基を置換する方法が先行技術において広く記載されており、十分な再現性を保証する制御された巧みな置換を可能にするとはいえ、それらのスルホン化法は、使いこなすのがかなり困難である。

【0010】

それらのスルホン化法は、きわめて酸性の pH で実施されるが、このため、重合体鎖の無損傷状態を保存することが、とりわけそれが天然の糖類から構成されている場合、できなくなる。さらに、これらのスルホン化条件は、制御の困難な脱炭酸を惹起する。

20

【0011】

そのようなわけで、先行技術の多くの研究業績が、Aa タイプの多糖類の硫酸化を可能にする方法を記述している。たとえば、デキストラン硫酸（または O-スルホナート）(DS)、カルボキシルデキストラン硫酸 (CM-D-S)（または O-スルホナート）、またはキシランやデンプンなどの他のオリゴ糖の硫酸化物（または O-スルホナート）が、米国特許第 4814437 号明細書に記載されているタイプの諸方法によって硫酸化（または O-スルホン化）されている。これらの方法のうち、スルホン化剤のような強酸を用いて多糖類をスルホン化することを提案している方法は、多くの研究者によって報告されている。たとえば、米国特許第 4740594 号明細書、同第 4755379 号明細書および仏国特許第 2772382 号明細書は、ジクロロメタン (CH_2Cl_2) を溶媒として用い、クロロスルホン酸で処理して、CM-D-S および CM-D-B-S タイプの分子を製造することを記載している。この方法は、塩基性溶媒としてピリジンを用いた DS の合成に同じ酸がすでに使用されており（リケッツ (Ricketts)、バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.) 第 51 巻第 210-133 頁、1952 年）、以前の業績中にすでに広く記載されているものである。ホルムアミド存在下での硫酸およびスルホン酸も、米国特許第 3498972 号明細書および同第 3141014 号明細書中に記載されているように、低温での DS の調製にすでに使用されている。これらの強度に酸性の反応条件は、塩基性の溶媒が存在していても、または低温においてであっても、製品の部分的分解を惹起する。それらは、重合体製品の場合には、高分子鎖の著しい断片化を惹起し、被スルホン化分子中に含まれているある種の官能基の加水分解を惹起する。強酸性のこれらの条件に対するいくつかの改良が、よりよく緩衝されたまたはより酸性度の小さい媒質の使用によってもたらされている。たとえば、それほど過酷でないスルホン化剤としての三酸化硫黄 (SO_3) 複合体の使用がすでに導入されている（アーカイブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Archives of Biochemistry and Biophysics) 第 95 巻第 36-41 頁、1961 年；テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Letters) 第 29 巻第 7 号第 803-806 頁、1988 年；ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサイエティ・パーキン・トランスアクションズ (J. Chem. Soc. Perkin Trans.) 第 1 巻第 157 頁、1995 年）。いくつかの SO_3 -アミンタイプ複

30

40

50

合体が市販されており、たとえば $\text{SO}_3-\text{Me}_3\text{N}$ （トリメチルアミン）、 $\text{SO}_3-\text{Et}_3\text{N}$ （トリエチルアミン）、 SO_3 -ピリジンおよび SO_3 -ピペリジンがある。これらの試薬は、DMF、ホルムアミド、DMSOなどの溶媒中の無水の媒質中で使用されている。しかし、これらの方法は、とりわけ、エステル、エーテルまたはアミド基によって官能化されているデキストランから誘導されたものなどの硫酸化多糖類の製造に利用されるのではあるが、下記の結果をもたらしゆえに、重大な不都合を示す：

－ 割合はスルホン酸類を用いたときほど大きくはないが、重合体の高分子鎖の予測できない断片化、

－ 上記の重合体上にすでに存在する官能基の部分的加水分解および

－ 調製物を汚染し、生体内接種後に毒性を示した（ブレイン・リサーチ（Brain Res.）第16巻第208-2号第473-478頁、1981年）アミン類の形成による副生物の生成。

10

【0012】

これらの技術は、ピリジンの場合には米国特許第4814437号明細書記載の方法が推奨されるなど、毒性のある残留物を最大限除去するようにさらに改良された。というのも、この先行技術の方法で使用される SO_3 -アミンは、大部分の多糖類の、とりわけデキストランの、還元性末端に存在するアルデヒド基と反応性であって、かくして形成される結合は共有結合であり、それゆえ永続性のものである。

【0013】

SO_3 -アミンタイプの複合体を使用した場合の難点は、 SO_3 -DMF、 SO_3 -FAなどの SO_3 -アミドタイプの複合体を用いることによっても克服された。たとえば、DSの塩類、とりわけナトリウム塩が、今日、米国特許第4855416号明細書に記載されているように、ホルムアミドを溶媒として用い、ホルムアミドに会合した SO_3 の複合体（ SO_3 -FA）によるO-スルホン化によって調製されている。この方法は、 SO_3 -FA複合体のその場での生成とそれに続くデキストランとの反応を包含している。 SO_3 -FA複合体の強い反応性は、不活性雰囲気（ N_2 ）および無水溶媒の使用にもかかわらず、強い酸性を生じさせる。このことも、高分子鎖の崩壊を惹起する。

20

【0014】

他のきわめて有用な非アミン複合体は、 SO_3 -DMFである。それは、また、仏国特許第2772382号明細書において、CM-D-SおよびCM-D-B-Sタイプの硫酸化多糖類の合成のために提案されている。しかし、 SO_3 -DMF複合体は、 SO_3 -FA複合体と同様に、反応媒質の強い酸性の原因となり、このことも、高分子鎖の断片化および不安定な基の加水分解をもたらし、最終製品合成の制御をうしなわせる。それゆえ、この方法も、それらが偶発的にかつ制御されずに切断されることを望まない高分子量のポリアニオン重合体を調製する場合には、他の諸方法と同様に不完全である。

30

【0015】

CMDBSおよびCMD Sの取得を可能ならしめるプロトコールが仏国特許第9715702号明細書に記載されているのは、まさにそれらの合成法を改良せんとしてのことである。仏国特許第9715702号明細書によれば、この改良は、一方で、分子量のより高い均質性を示すデキストラン誘導体の取得を可能ならしめ、他方では、構造のより高い均質性、従ってより優れた定義を確実なものにする置換率の制御を可能ならしめる。しかし、仏国特許第9715702号明細書に記載されている方法は、先行技術におけると同様に、 SO_3 -アミン（DMF、ピリジンまたはトリエチルアミン）を使用しての多糖類のスルホン化に依存しており、与えられている実施例は、もっぱら SO_3 -ピリジンを用いて得られている。さらに、この方法は、残留痕跡量のピリジンの生成に至らしめるが、ヒトに対するこのものの毒性は周知であり、また、多糖類鎖断片の形成が生じないようにできるとは思われない。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

50

本発明は、まさに、ヒドロキシル基もしくは第一級または第二級アミノ基を含む化合物にスルホナト基を置換する条件をきわめて厳密かつ正確に制御することを可能にする新規な一般的スルホン化方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0017】

上記目的は、1個または複数の遊離ヒドロキシル基および／または1個または複数の第一級または第二級アミノ基を有する化合物をスルホン化する方法であって、該化合物を、酸捕捉剤の存在下に、 $\text{SO}_3\text{-DMF}$ 複合体により処理することを特徴とするスルホン化方法によって達成される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

酸捕捉剤とは、溶液中のプロトンと選択的に反応できる物質または物質混合物をいう。反応混合物にこの酸捕捉剤を添加すると、プロトンは該酸捕捉剤によって捕捉され、それらはもはや反応性ではないために、もはやpHの低下に関与しない。

【0019】

前記酸捕捉剤は、たとえば、沸点が100℃未満のアルケン類またはアルキン類もしくはそれらの混合物からなる群のなかから選ばれる。

【0020】

前記酸捕捉剤は、2-メチル-2-ブテン(2M2B)、2-メチルプロペン、2-メチルペンテン、またはそれらの異性体、あるいはそれらの混合物であることが有利である。

20

【0021】

本発明の方法は、過度に酸性のpHの使用を回避でき、かくして被処理化合物の切断という危険を取り除くことができる点で、優れたものである。さらに、それは、完全に除去することが困難または不可能な毒性物質を持ち込まないという利点を示す。

【0022】

とりわけ、本発明の方法は、つぎの工程を包含する：

a) ジメチルホルムアミド(DMF)、ホルムアミドとジメチルホルムアミドとからなる共溶媒などの無水の溶媒または共溶媒中のスルホン化すべき化合物の均質な溶液の可溶化または調製。

30

b) 2-メチル-2-ブテンなどの共溶媒混和性酸捕捉剤の過剰モル量の外界温度(20-22℃)での添加。

c) 攪拌下での $\text{SO}_3\text{-DMF}$ 複合体の速やかな添加、

d) 前工程で得られた混合物の、30℃未満の制御された温度での1-2時間の攪拌、

e) アルカリ性溶液、たとえば重炭酸ナトリウム(NaHCO_3)または他のアルカリの2%溶液への、決して4未満にならないようなpH制御下での、前記混合物の添加による反応の停止による被スルホン化化合物の塩の取得。

【0023】

本発明の方法は、有利には、たとえば、分画分子量が1000ドルトンの限外濾過膜を通しての水(ヒトに注射可能なものと同質のもの)に対する接線限外濾過による、工程(e)で得られたスルホン化化合物の精製を包含する。

40

【0024】

工程(a)で使用する溶媒はジメチルスルホキシド(DMSO)ではないことが好ましい。本発明の範囲内で実施された研究によって、この溶媒は、スルホン化多糖類調製物から除去するのがきわめて困難であり、それゆえ、医薬品形態の調製にそれら調製物を使用するのに障害となることが明らかにされたからである。

【0025】

スルホン化すべき化合物が無水の溶媒または共溶媒に溶けにくい場合、本方法を実施する特別な一形態は、該化合物をプロトン化して、その可溶化を助長することにある。と

50

りわけ、1個以上のカルボキレート基により置換されたデキストランなどの糖の重合体である被スルホン化合物がそうであり、それらのプロトン化は、たとえば陽イオン交換樹脂カラムを通過させることにより、 $-COOH$ 基の形成に導く。

【0026】

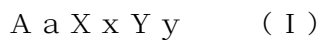
従って、スルホン化の条件は、最初からカルボキシル基によって置換されている重合体の脱炭酸を回避するのに十分なように設定、制御する。その結果、スルホン化の条件はつぎのようであるのが有利である：

スルホン化すべき重合体を無水の溶媒に溶解させる（実施例2の1参照）。過剰モル量の酸捕捉剤（アルケン2M2Bなど）を加える。 SO_3-DMF 複合体などのスルホン化試薬（ SO_3 ）を加え、前記酸捕捉剤の蒸発温度よりも低い温度で反応を進行させる。 $NaHCO_3$ などのアルカリ性溶液の添加により反応を停止させる。

10

【0027】

本発明の方法は、単量体、オリゴマーまたは重合体に適用される。それは、とくに、先に定義したHBGFPPやRGTAなどの重合体に、従ってとりわけデキストランから誘導された化合物やリンゴ酸共重合体に、適合している。かくして、本発明は、とくに式：



の重合体を対象とする。

【0028】

上記式中、Aは単量体であり；Xは基 $RCOOR'$ を表わし；Yは、Aに固定された、式 $ROSOR'$ 、 $RNSOR'$ のいずれかに相当するOまたはN-スルホナト基を表わし；基Rは、場合により枝分れしていてもよく、および／または不飽和であってもよく、1個または複数の芳香族環を含んでいてもよい脂肪族炭化水素鎖であり（ただし、ベンジルアミンおよびスルホン酸ベンジルアミンを除く）；R'は水素原子または陽イオン／カチオンを表わし；aは単量体の数を表わし；xは単量体Aの基Xによる置換の割合または置換度を表わし；yは単量体Aの基Yによる置換の割合または置換度を表わす。

20

【0029】

本発明の方法は、重合体、とりわけ式（I）の重合体であって、式（I）の重合体のA-AまたはA-X結合などの単量体間または単量体とそれらの置換基との間の結合が酸性媒質中で不安定な官能基、とりわけエステル、アミド、エーテル、アセタール（グリコシド性）官能または他の基によって行われている重合体に対して実施することができる。

30

【0030】

それゆえ、本発明の方法は、単量体またはヘパリンのある種の断片などのオリゴマーである硫酸化糖類、さらにはRGTA族重合体、とりわけAが、デキストランまたは他のあらゆる多糖類化合物を基礎とした重合体の場合のように、配糖体単量体であるものといった硫酸化糖類を調製するのにとくに適している。

【0031】

本発明の他の利点および特徴は、本発明方法の実施に関するものであり、添付の図面を参照して説明する以下の実施例から明らかになるであろう。

【0032】

図面中、図1は、末端アルデヒドが認められるCMD Sの1個の分子を図示したものである。xおよびyの値が0ではないCMD S分子の場合、a) アルデヒドまたはヘミアセタール、b) カルボキシメチルグルコシドおよびc) スルホナトグルコシドの3つのタイプの単位Zが存在する。

40

【0033】

図2は、置換デキストランの末端単位のアルデヒド官能とヘミアセタールとの間の平衡を示す。アノマー位において置換されている単位は、もはや平衡に関与しない。

【0034】

図3は、表3に示した構造特性をもつCMD Sタイプの分子のクロマトグラフィープロファイルを示す。

【0035】

50

図4は、異なるゲル濾過カラムでの同一製品PA07について得られたクロマトグラフィープロフィールを示す。

【0036】

図5は、CMD Sの構造を示す。

【0037】

これらの実施例は、とりわけCMD S、CMD B Sなどのデキストランから誘導された重合体のスルホン化についての、本発明の方法と先行技術の方法との比較をも包含している。この比較は、仏国特許第9715702号明細書および仏国特許第9907636号明細書の中で提案されているプロトコルでは、デキストラン重合体の分子の完全性（無損傷性）の良好な保持ができないことを示している。それらが、簡単な方法で検出、定量

10

【実施例1】

【0038】

I - スルホン化の評価

【0039】

I. 1 - カルボキシル基およびスルホナト基の測定方法

【0040】

異なるスルホン化方法を比較できるように、我々は、グルコース1単位当りのカルボキシル基(x)およびスルホナト基(y)による置換の程度(ds)を測定した。デキストランはグルコースの重合体であるので、各グルコース単位は3個の反応性OH基をもっている。従って、理論極大dsは3である。定量は、先行技術において記載されている慣用のプロトコルに従った滴定法および元素分析によって行う。

20

【0041】

滴定定量を元素分析と組合せるとき、カルボキシメチルエーテル基(x)およびスルホナト基(y)による総置換率(x+y)を求めることができる。

【0042】

I. 2 - 置換基の位置の決定

【0043】

グルコシド単位上のグラフトされた基の位置を明らかにするために、我々は、当業者に既知の(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリ(J. Biol. Chem.))第275巻第38号第29383-29390頁、2000年)慣用的条件に従ったNMR(プロトン核磁気共鳴)による分析法を用いた。我々は、ブルカー(Bruker)200MHz分析計を用いた。

30

【0044】

I. 3 - ポリグルコシド鎖の断片化を測定できる方法

【0045】

スルホナト基付加前後の重合体鎖の完全性を測定するために、溶液中の製品中に存在するアルデヒドを定量した。

【0046】

アルデヒドの定量により、製品の還元性末端単位の数を求めることができる。図1に示したように、重合体の還元性末端のみがアルデヒド基を有するからである。このように、スルホン化すべき製品について、アルデヒド基の数を求めるが、この場合、それは、製品1g当りアルデヒド1マイクロモルに等しい。この値は、反応の過程で切断が生じなければ、いずれの場合にも、出発製品の値以下であるはずである。

40

【0047】

実際に、スルホン化反応後に測定された遊離アルデヒドの値は、スルホナト基導入前に測定した値(0.5ミリモル/gのCMD Sの場合、1.0マイクロモル/g)よりも小さい。x=0.5、y=1.25のCMD Sタイプの製品の場合に通常見出される遊離アルデヒドの値は、製品1グラム当りアルデヒド0.4マイクロモル近傍である。これに対し、この数が出発値(1.0)を超えれば、切断が強度に生じている。

50

【0048】

それゆえ、この方法は、断片の生成を測定することができる。鎖の切断ごとに、反応性で検出可能な新しいアルデヒド基が生じるからである。

【0049】

I. 4-分子量の測定と調製物の見かけの均質性の検討を可能ならしめる方法

【0050】

分子量測定は、直列接続したゲル濾過カラムKB-804およびKB-805（ショーデックス、日本）を用いた0.7 ml/分の0.1 M NaNO_3 による高速立体排除クロマトグラフィーによって行う。生成物を、ミニドーン（mini Dawn）光散乱検出器およびRID10型屈折計によって検出する（ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリ（J. Biol. Chem.）第275巻第38号第29383-29390頁、2000年）。調製物の均質性は、分子量分布曲線とピーク幅の大きさ（半分の高さのところでの）ならびにその曲線の対称性の程度によって反映される。

10

【0051】

HPLC-ゲル濾過という第二の手法は、分子量分布に関して分子の均質性を証明することを可能ならしめる。ガウス分布の一例を図3に示す。

【0052】

クロマトグラフィー条件は、次の通りである：カラム：TSKゲルG4000PWXL（東ソー・ハース）、30℃、7.8 mm ID x 30 cm；移動相：0.3 M NaCl ；流量：0.7 ml/分；検出：IR0.06。

20

【0053】

SO_3 -アミン複合体を用いる手法に従って合成された製品の場合、調製物の均質性は、用いるクロマトグラフィー系によって異なることが認められた。

【0054】

製品をショーデックスカラムによって分離するとき、ピークは非対称であるが、第二のクロマトグラフィー分離系を用いるときには、同じ製品に対応するピークは、図4に示すように、対称的になる。このことは、これらの調製品ならびに先行技術のそれらにおける分子量ばらつきの均質性が使用する分離系と関係があることを示している。

【実施例2】

【0055】

30

II-本発明を利用してのカルボキシメチルデキストランのO-スルホン化の例および先行技術との比較

【0056】

クロスルホン酸あるいは SO_3 -アミン複合体、 SO_3 -DMF複合体および本発明の対象である酸捕捉剤2-メチル-2-ブテン存在下の SO_3 -DMF（ SO_3 -DMF/2M2B）による種々のO-スルホン化反応を、以下の実施例において記載する。

【0057】

これらの比較を確立するために、カルボキシメチルデキストランを出発重合体として選択した。

【0058】

40

II. 1- SO_3 -DMF複合体/2-メチル-2-ブテンによる酸捕捉剤存在下での反応

【0059】

500 mLフラスコ中で、酸型カルボキシメチルデキストラン（ CMDH^+ ）5 g（4.27ミリモル）をホルムアミド40 mLに溶解させ、つぎに2-メチル-2-ブテン40 mL（25当量）を攪拌下に加える。 SO_3 -DMF 7.90 g（グルコース単位当り5当量）を加える。攪拌下、30℃で2時間反応させる。

【0060】

反応媒質を200 mLの2% NaHCO_3 中へきわめてゆっくり注ぐことによって、反応を停止させる。pHは7の近傍になければならない。そうでない場合には、水酸化ナト

50

リウムまたはHClを添加して溶液を中和する。いずれの場合にも、溶液のpHは、製品の分解を回避するために、決して5より低くならない。

【0061】

減圧下での回転蒸発によって過剰の水、DMFおよび2M2Bを除去したのち、製品を接線限外濾過とそれに続く凍結乾燥によって精製する。スルホン化された製品6gが、白色粉末の形で得られる。

【0062】

以下の表1は、グルコース1単位当り5当量のSO₃-DMFおよび2.5当量の2M2BによるCMDH⁺ (x=0.52)のO-スルホン化の再現性を示している。EM(平均誤差)百分率は、同一のCMDから調製した複数製品に関して求めるべきものである。

【0063】

【表1】

	スルホン化前の (x)	スルホン化後の COO ⁻ (mEq/g) (x)	EM %	SO ₃ ⁻ , mEq/g (y)	EM %	アルデヒド (μmol/g)	EM %
1	0.52	1.58(0.53)	2	3.82(1.28)	5	0.35	5
2	0.52	1.54(0.50)	1	3.76(1.25)	1	0.49	3
3	0.52	1.57(0.52)	1	3.79(1.26)	1	0.55	3
4	0.52	1.52(0.48)	2	3.64(1.17)	1	0.60	8

【0064】

表中、EM=平均偏差(%)

【0065】

以下の表2は、試薬SO₃-DMF/2M2B(1:5)の量の関数としてのCMDH⁺のO-スルホン化を示している。

【0066】

【表2】

グルコース単位当りSO ₃ /DMF(2M2B) 当量数	置換度(ds)	
	x	y
0.0	0.50	-
2.0 (10.0)	0.49	0.42
2.5 (12.5)	0.52	0.89
3.0 (15.0)	0.52	1.00
4.0 (20.0)	0.49	1.10
5.0 (25.0)	0.52	1.20

【0067】

以下のプロトコールに従って、10回の独立した操作を行った：5回は、表1のエントリー1-4に従い、5当量のSO₃-DMFおよび2.5当量の2M2Bを用いる同一のプロトコールに厳密に従って実施した。他の5回は、試薬SO₃-DMF/2M2Bの量をグルコース1単位当り試薬2から5当量まで変化させて実施した。SO₃-DMF対2M2Bの比は、常に一定で、1:5である(表2、エントリー1-5)。

【0068】

それらの結果は、エーテル基およびグルコシド結合を有する製品を取得する場合に前記方法が再現性のあるものであることを示している。

【0069】

これらのいずれの場合にも、EM（平均誤差）百分率は、10％に設定した最大限度未満である。

【0070】

(x) が有意には変化せず (EM < 2 %) (脱炭酸がない)、(y) が < 3 % であることに注目する必要がある。

【0071】

分子量測定により、不均質性がなく (表1、エントリー4に記載の製品に対応する図3)、PM (分子量) = 67500 + / - 7500 であることが確認される。

【0072】

得られた結果は、2M2Bの存在下では、得られるスルホン化率が、反応の化学量論比の関数であることを示している。さらに、前記の反応条件は、CMD上に事前に付加されていたカルボキシメチルエーテル基の割合に影響しない。

【0073】

II. 2-プロトンNMR分析による分子の説明

【0074】

滴定定量、元素分析、還元糖類の定量、MALLS検出と組合せたHPLC／ゲル濾過とこれを補完する¹H-NMR分光分析などの分析手法を用いて、合成された製品の分析を行った。

【0075】

¹H-NMR分光分析によって、出発デキストランのグルコシド単位 of C2およびC3, 4における3個の反応性ヒドロキシルへの異なる基の置換位置および置換割合を明確にすることができる。以下の表3は、CMD-Sタイプのデキストランの例においてのNMR分析によるAへのXおよびYの置換の位置を示している。

【0076】

【表3】

重合体	ds			dsにおいて示した基の位置				分子量
				X		Y		
	X	Y	OH	C2	C3+C4	C2	C3+C4	
CMDS	0.50±0.4	1.20±0.4	1.30±0.4	0.35	0.15	0.52	0.68	67000±5000

【0077】

d. s. : グルコース単位 (A) 当りの各基の置換度。X = CM : CH₂COONa ; Y = SO₃Na

OH : 単量体A当りの未反応OH基の数を表す

d. s. は、置換されなかった残存ヒドロキシル基 (出発時の遊離OHの数は、Aのグルコース単量体当り3である) に基づいて計算する (n = 3)

C3 + C4 : X, Yおよび遊離OHについて、総d. s. と位置C-2について求めたd. s. との差として計算したC-3 + C-4位における総置換度。

【0078】

III-先行技術との比較

【0079】

III. 1-クロロスルホン酸によるO-スルホン化。ClSO₃Hとの反応

【0080】

カルボキシメチルデキストラン5g (24.27ミリモル、グルコース単位当り1当量) を、ジクロロメタン162mL中へ加える。不均質な混合物が得られる。この混合物を

10

20

30

40

50

強く攪拌して、ジクロロメタン中の該製品の均質な懸濁液を得る。

【0081】

クロロスルホン酸 1.6 mL (24.27 ミリモル、グルコース単位当り 1 当量) を、上記混合物にゆっくり加える。反応媒質を攪拌下に 2 時間保持する。反応の間に、褐色の生成物の凝集体が生じる。この混合物を濾過し (No. 4 フリットガラスフィルター上)、回収した製品を、ジクロロメタン 100 mL で 2 回、ジクロロメタン/ジオキサン (1:1) 混合物 100 mL で 3 回、最後にジオキサン 100 mL で 1 回洗う。得られた製品を蒸留水 200 mL に溶解させ、溶液を、2 M 水酸化ナトリウムの添加により pH 9.5 とし、つぎに 0.05 モル/L の HCl で pH 7 とする。

【0082】

この溶液を濾過し、濃縮し、メタノール 500 mL で沈殿させる。かくして得られた沈殿をつぎに、精製に先立ち、乾燥装置中で乾燥する。

【0083】

このプロトコールに従って、3 回の独立した操作を行った：

- 1 回は、1 当量のクロロスルホン酸を用い、外界温度で、
- 1 回は、2 当量のクロロスルホン酸を用い、外界温度で、
- 1 回は、2 当量のクロロスルホン酸を用い、4 °C で。

【0084】

III. 2-SO₃-アミンまたはアミド複合体との反応

【0085】

SO₃ を基礎とする複合体：SO₃-ピリジン、SO₃-トリメチルアミン、SO₃-トリエチルアミンおよび SO₃-DMF (ジメチルホルムアミド) を用いて、以下に詳述するプロトコールを実施した。

【0086】

後記の表 4 は、種々の SO₃ 複合体による CMD (d. s. C = 0.56) の O-スルホン化によって得られた製品の構造上および生物学的特性を示している。

【0087】

500 mL フラスコに、カルボキシメチルデキストラン 5 g (24.27 ミリモル、グルコース単位当り 1 当量) をホルムアミド 50 mL に溶解させる。カルボキシメチルデキストランの溶解を助長するために、反応媒質の温度を 50 °C にする。製品がいったん溶解すると、溶液を外界温度にもどす。実施する各反応につき、下記の表 4 に示した複合体のそれぞれを含有する溶液を、ホルムアミド 50 mL 中で個々に調製し、先のカルボキシメチルデキストラン溶液に攪拌下に加える。反応を、外界温度で 2 時間進行させる。

【0088】

4 °C の蒸留水 2 l を加えて反応を停止させる。混合し、2 M NaOH 溶液を用いて反応媒質の pH を 7.5-8 にもどす。

【0089】

減圧下での回転蒸発により過剰の水を除去したのち、製品を接線限外濾過およびそれに続く凍結乾燥によって精製する。硫酸化製品 6 g が、白色粉末の形で得られる。

【0090】

このプロトコールに従って、4 回の独立した操作を行った：

- 1 回は、SO₃-ピリジン複合体を用いて、外界温度で、
- 1 回は、SO₃-トリメチルアミンを用いて、外界温度で、
- 1 回は、SO₃-トリエチルアミンを用いて、外界温度で、
- 1 回は、SO₃-DMF を用いて、外界温度で。

【0091】

一方、仏国特許第 9715702 号明細書実施例 5 に記載されているプロトコールに厳密に従って、反応を実施した (表 4 の 8 行目)。そこでは、CMD の可溶化を、トリエチルアンモニウム塩の形成によって達成する。遊離 OH 当りの複合体のモル比が 0.4 (これはグルコース単位当り複合体 2 当量に相当する) の SO₃-ピリジンを DMSO に溶解

10

20

30

40

50

させ、重合体溶液に加える。反応は、ジメチルホルムアミド中外界温度で行う。

【0092】

表4は、種々の方法に従って合成したCMD Sタイプのいくつかの重合体の構造特性および各方法の制約を示している。本発明の方法は、表4のエントリー10および11に相当し、反応条件は実施例1に記載したものである。

【0093】

【表4】

	スルホン化 試薬	反応条件	x	y	末端 アルデヒド ($\mu\text{mol/g}$)	活性 (生体内)	毒性 (生体内)
1	-	-	0.56	0.0	1.00	(-)	(-)
2	ClSO_3H	1 eq/22°C	0.41	0.22	12.7	一定しない	一定しない
3	ClSO_3H	2 eq/22°C	0.37	0.35	11.0	一定しない	一定しない
4	ClSO_3H	2 eq/4°C	0.51	0.35	4.0	一定しない	一定しない
5	$\text{SO}_3\text{-Me}_3\text{N}$	2 eq/22°C	0.50	0.00	1.9	(+)	(+)
6	$\text{SO}_3\text{-Et}_3\text{N}$	2 eq/22°C	0.29	0.40	1.6	(+)	(+)
7	$\text{SO}_3\text{-ピリジン}$	2 eq/22°C	0.44	0.17	1.8	(+)	(+)
8	$\text{SO}_3\text{-ピリジン}$	2 eq/22°C	1.00*	0.35	1.9	(-)	(+)
9	$\text{SO}_3\text{-DMF}$	2 eq/22°C	0.37	0.23	1.5	Nd	Nd
10	$\text{SO}_3\text{-DMF/2M2B}$	2 eq/22°C	0.57	0.62	0.8	(+)	(-)
11	$\text{SO}_3\text{-DMF/2M2B}$	5 eq/22°C	0.55	1.15	0.5	(+)	(-)

【0094】

表中、Nd = 測定せず

*この実験における出発製品は、グルコース単位当たり1残基がCMにより置換されていた。

【0095】

カルボキシラート置換度 $x = 0.56$ の単一ロットのカルボキシル化デキストラン（表4、エントリー1）から、DC Sタイプの種々の製品を合成した。精製後、製品を種々の構造分析手法によって特性決定した。

【0096】

滴定分析の結果は、クロロスルホン酸および SO_3 -アミドまたはアミンによるオースルホン化反応がグラフトされたカルボキシラート基（d s Cまたはx）のエーテル結合の切断および高分子鎖の分解（分子量および還元糖の定量）を惹起することを示している。この切断は、加えられる試薬の当量数が大きいほど、より顕著である。反応媒質の温度を低下させると、この分解を抑制することができる。

【0097】

$\text{SO}_3\text{-Et}_3\text{N}$ 複合体（表4、エントリー6）により調製した製品は、もっともスルホン化された製品であるが、もっとも大規模な脱炭酸を受けたものでもあることを指摘しておかなければならない。

【0098】

表の最後の2つのエントリー（エントリー10および11）は、グラフトされたカルボキシラート基および高分子鎖のエーテル結合の分解ならびに鎖の分解を抑制するための酸捕捉剤として働く2M2Bを作用させている。

【0099】

製品2M2Bの存在下では、スルホン化後に得られる製品のdsCが前駆体のdsCと同じであること認められる。このことは、加える試薬の量にかかわらず確認される。実際に、SO₃-DMF複合体を2.5倍用いるとき（エントリー11）、高いdsSが得られるが、とりわけdsCは変化しない。かくして、2M2B存在下でのプロトコールの有効性が証明される。

【0100】

既知のO-スルホン化手法では、脱炭酸および高分子鎖の分解があるが、2M2B存在下でO-スルホン化する手法は、デキストランにグラフトされたカルボキシラート基が失われるという問題を解決することを可能ならしめる。

10

【0101】

生体内活性の測定および生体内毒性の測定は、J. ゴートロン (Gautron)、C. ケジア (Kedzia)、I. フスマン (Husmann) およびD. バリトー (Barritault) : 「デキストラン誘導体による成熟ラット骨格筋再生の促進」、コントランデュ・ドゥ・ラカデミ・デ・シヤンス・ドゥ・パリ (パリ科学アカデミー紀要; C. R. Acad. Sci. Paris)、シヤンス・ドゥ・ラ・ヴィ (生命科学; Sciences de la Vie) (1995年) 第318巻第671-676頁に記載されている実験条件に従い、押しつぶし後の成熟ラット後肢長指伸筋の筋再生のモデルにおいて行う。組織切片上での再生を、再生された筋線維の数を測定することによって定量化する。毒性は、線維形成の減少 (生理食塩水を注入した対照と比較しての) により、また、再生の様相の分析および再生異常帯域または筋組織変性を示す炎症性帯域の生成を明らかにすることによって、測定する。

20

【0102】

IV-他のタイプの重合体に対する方法の一般化

【0103】

表5は、本発明の方法による式AaXxYy (Aは糖であり、aは1より大である) の種々の重合体の合成およびそれらの分析上の特性を示す。

【0104】

【表5】

30

	出発製品dsC	規模	dsS	dsC	末端アルデヒド(μmol/g)
1	デキストラン(D)	2g	1.19	-	0.15μmol/g
2	D	2g	1.24	-	0.15μmol/g
3	CM ₅₀ -D	2g	1.22	0.5	0.20μmol/g
4	CM ₅₀ -セルロース(C)	2g	1.23	0.5	0.20μmol/g
5	CM ₅₀ -D	10g	1.17	0.5	0.20μmol/g
6	CM ₅₀ -C	10g	1.22	0.5	0.20μmol/g
7	CM ₄₀ -B ₄₀ -D	50g	1.24	0.5	0.20μmol/g
8	CM ₄₀ -B ₂₀ -D	10g	1.23	0.6	0.05μmol/g
9	CM ₄₀ -PhA ₄₀ -D	10g	1.23	0.6	0.05μmol/g
10	CM ₄₀ -PhA ₄₀ -C	10g	1.22	0.6	0.05μmol/g

40

【図面の簡単な説明】

【0105】

50

【図 1】末端アルデヒドが認められる C M D S の 1 個の分子を示した説明図である。

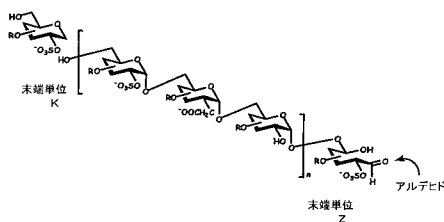
【図 2】置換デキストランの末端単位のアルデヒド官能とヘミアセタールとの間の平衡を示した説明図である。

【図 3】表 3 に示した構造特性をもつ C M D S タイプの分子のクロマトグラフィープロフィールを示した説明図である。

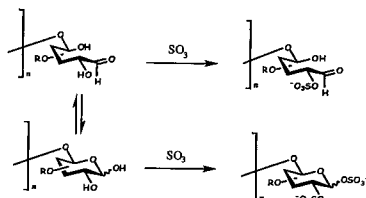
【図 4】異なるゲル濾過カラムでの同一製品 P A O 7 について得られたクロマトグラフィープロフィールを示した説明図である。

【図 5】C M D S の構造を示した説明図である。

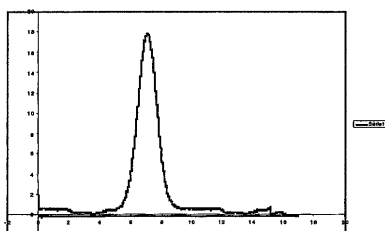
【図 1】



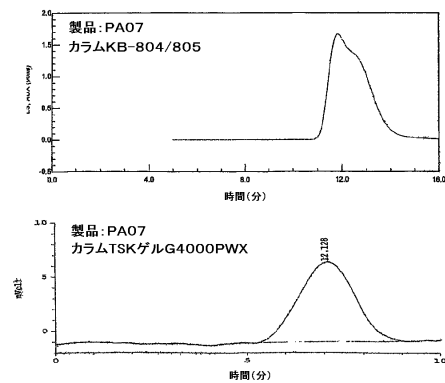
【図 2】



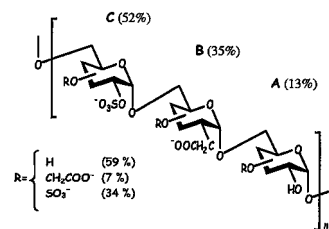
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(74)代理人 100115200

弁理士 山口 修之

(72)発明者 エマニュエル プティ

フランス、アミアン エフ-80000、リュ デュ ヴィコント ドゥ ブラジェロン、11

(72)発明者 ドゥルセ ガルシアーパピ

フランス、モランジ エフ-91420、アヴェニュー エミル ゾラ、34

(72)発明者 ヴェロニク パルピアーシャッセフィエール

フランス、ジフ スル イヴェット エフ-91190、プラス デュ マルシェ ヌフ、13

審査官 福井 悟

(56)参考文献 特開平04-117401 (JP, A)

特表2001-523300 (JP, A)

特表平10-506665 (JP, A)

特開平11-130760 (JP, A)

特開平06-228115 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B 1/00-37/18

CA/REGISTRY(STN)