

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7337406号
(P7337406)

(45)発行日 令和5年9月4日(2023.9.4)

(24)登録日 令和5年8月25日(2023.8.25)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 31/728 (2006.01)	A 6 1 K 31/728
A 6 1 K 33/18 (2006.01)	A 6 1 K 33/18
A 6 1 L 15/00 (2006.01)	A 6 1 L 15/00

請求項の数 11 (全19頁)

(21)出願番号	特願2021-509845(P2021-509845)	(73)特許権者	507211897
(86)(22)出願日	令和1年8月17日(2019.8.17)		コンティプロ アクチオヴァ スポレチノ
(65)公表番号	特表2021-534869(P2021-534869 A)		スト
(43)公表日	令和3年12月16日(2021.12.16)		チェコ, シーゼットー 5 6 1 0 2 ドル
(86)国際出願番号	PCT/CZ2019/050035	(74)代理人	ニ ドプロチ, ドルニ ドプロチ 4 0 1
(87)国際公開番号	WO2020/038501		110002398
(87)国際公開日	令和2年2月27日(2020.2.27)	(72)発明者	弁理士法人小倉特許事務所
審査請求日	令和4年8月10日(2022.8.10)		ブッフア, ラドヴァン
(31)優先権主張番号	PV2018-428	(72)発明者	スロバキア, フメンナー, クコレリホ
(32)優先日	平成30年8月23日(2018.8.23)		1 4 9 5 / 2
(33)優先権主張国・地域又は機関	チェコ(CZ)	(72)発明者	スヴォジル, ヴィット
			チェコ, 5 6 2 0 1 ウスチー ナト オ
			ルリツィー, イレムニツケホ 1 8 1
		(72)発明者	クノトコヴァ, カテリナ
			チェコ, 5 6 5 0 1 ホツェニ, ストロ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヨウ化物及びヒアルロン酸誘導体を含む酸化作用を有する組成物, その調製方法及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミド基: $-NH-CO-$ の水素が構造式: $-NCL-CO-$ に従って塩素原子で置換されたヒアルロン酸又は修飾されたヒアルロン酸のクロラミドを含む抗菌性組成物であって, さらにヨウ化物を含み, 前記ヒアルロン酸又は前記修飾されたヒアルロン酸の塩素による置換度が50~100%であることを特徴とする組成物。

【請求項 2】

前記アミド基: $-NH-CO-$ の水素が構造式: $-NCL-CO-$ に従って塩素原子で置換され, かつ同時にクロラミドのいくつかの $-OH$ 基が $-O-CO-R^2$ 基で置換され及び/又はいくつかの $-CH_2-OH$ 基が $-CH=O$ で置換され及び/又はいくつかの $-CO-OH$ 基が $-CO-OR^2$ 基で置換され, 式中の R^2 は1~17個の炭素原子を含む直鎖又は芳香族鎖であることを特徴とする請求項1記載の抗菌性組成物。

【請求項 3】

前記修飾されたヒアルロン酸がエチルエステル, ベンジルエステル, ラウロイル, ホルミル, パルミトイル, ヘキサノイルヒアルロナンからなる群より選択され, 且つ前記ヨウ化物が, ヨウ化ナトリウム, ヨウ化カリウム, ヨウ化カルシウム, ヨウ化マグネシウム及びそれらの混合物からなる群から選択されることを特徴とする請求項1又は2記載の抗菌性組成物。

【請求項 4】

前記クロラミドの分子量が5~500 kg.mol⁻¹の範囲内であることを特徴とする請求項

1～3 いずれか 1 項記載の抗菌性組成物。

【請求項 5】

前記組成物中の前記クロラミド対前記ヨウ化物のモル比が 1 : 1～1 : 5 の範囲にあることを特徴とする請求項 1～4 いずれか 1 項記載の抗菌性組成物。

【請求項 6】

さらに添加剤を 90 重量%以下の濃度で含むことを特徴とする請求項 1～5 いずれか 1 項記載の抗菌性組成物。

【請求項 7】

前記添加剤が、水、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、グリセロール、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、アルギン酸ナトリウム、オキシセルロース、カルボキシメチルセル
10
ロース、ヒドロキシエチルセルロース、又はいくつかの-OH基が-O-CO-R²基で置換され及び/又はいくつかの-CH₂-OH基が-CH=O基で置換され及び/又はいくつかの-CO-OH基が-CO-OR²基で置換された修飾されたヒアルロン酸（式中、R²は 1～17 個の炭素原子を含む直鎖又は芳香族鎖である）からなる群から選択されることを特徴とする請求項 6 記載の抗菌性組成物。

【請求項 8】

自己支持性フィルム、凍結乾燥物、ステープルファイバーの層（不織布）、エンドレスフ
20
ァイバー、織物、ニット布、組物、又はナノファイバー層からなる群から選択される固体基材の形態であって、最終組成物中の前記クロラミドの含有量が、乾燥物質に換算して計算して 10～90%の範囲内であることを特徴とする請求項 1～7 いずれか 1 項記載の抗菌性組成物。

【請求項 9】

二層以上の層からなる固体の基材の形態であることを特徴とする請求項 8 記載の抗菌性組成物。

【請求項 10】

最終組成物の適用直前に混合されることが意図される二つの分離した溶液又はゲルの形態であって、前記ヒアルロン酸のクロラミド又は前記修飾されたヒアルロン酸のクロラミ
30
ドが第 1 の溶液又はゲルに含まれ、前記ヨウ化物が第 2 の溶液又はゲルに含まれ、該最終組成物中のクロラミドの含有量が乾燥物質に換算して計算して 10～90%の範囲であり、該最終組成物中のヨウ化物の含有量が乾燥物質に換算して計算して 10～90%の範囲内であることを特徴とする請求項 1～7 いずれか 1 項記載の抗菌性組成物。

【請求項 11】

創傷被覆材の製造のための、又は移植可能な医療機器、瘻瘡に対する製剤、抗菌性充填材、抗接着性バリア、膜、ポーチ（pouches）もしくはラップ（wrappings）の製造のための請求項 1～10 いずれか 1 項記載の抗菌性組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヨウ化物、及びヒアルロナンクロラミド（chloramide）としても言及される、アミド基-NH-CO-に含まれる水素原子の大部分が構造式-NCl-CO-に従っ
40
て塩素原子で置換されたヒアルロン酸誘導体を含む組成物に関する。水の存在下で、前記の混合物は、-1 より高い酸化度を有し広域スペクトルの抗菌作用を付与するヨウ素を発生させる。最終組成物は、薄いフィルム、凍結乾燥物、ステープルファイバーの層、エンドレスファイバー、織物、ニット布、組物又はナノファイバー層のような多数の形態を含み、それによりヨウ化物とヒアルロナンクロラミドが両方とも医療用具又は薬剤に移行され得る。

【0002】

さらに、本発明は、下記の特性又は下記の特性の任意の組み合わせが要求される分野におけるヨウ化物及びヒアルロナンクロラミドを含有する最終組成物の使用に関する：

・酸化又は抗菌又は抗真菌又は抗ウイルス活性

10

20

30

40

50

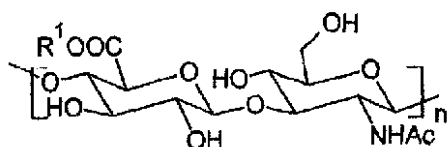
- ・ 生体適合性及び生分解性
- ・ 好適な安定度を有する様々な形態を製造する可能性
- ・ 治癒プロセスへの著しい寄与

【背景技術】

【0003】

ヒアルロン酸

ヒアルロン酸又はそのナトリウム塩は、D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミンの二つの繰り返し単位によって構成される、硫酸化されていないグリコサミノグリカンである。



(式中、 R^1 は水素又はナトリウムを表す)

【0004】

天然のヒアルロン酸の分子量は $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ の範囲内にある。この親水性の多糖は、水和、プロテオグリカン類の構成又は細胞の分化のような多数の生物学的プロセスに重要な役割を果たし、皮膚、滑液、そして結合組織の本質的な要素であることが知られている。上記ポリマーは生物系において自然に発生し、従って、それは生分解性で生体適合性であるとして特徴づけられ得る。従って、それは、広範囲の生物医学的な用途のための生物活性物質のキャリアーの分野で適する基材を製造する。

【0005】

ヒアルロン酸の化学的修飾及び形態

その物理的及び生物学的特性を調節する目的のためのヒアルロン酸の化学的修飾の多数の既知の方法が存在する(Burdick J. A. and Prestwich G. D., Adv. Mater. 23, 41-56, 2011)。特定用途に関して溶解度の本質的な変化が要求される場合、最も頻繁に行なわれる方法は、生分解性のエステル結合により疎水性鎖を高分子構造に共有結合することからなる(Kettou S. et al., PV 2009-399, Buffa R. et al., WO2010105582)。上記の方法で修飾した場合、該材料は、ファイバー(Scudlova J. et al., EP2925916 A1)、ニット布又は組物(Pitucha T. et al., CZ 306354)、自己支持性フィルム(Foglarova M. et al. PV2015-166; Foglarova M. et al., Carbohydrate Polymers, 144, 68-75, 2016)又はナノファイバー層(Ruzickova J. et al. PV2013-913)のような様々な形態の製造に使用できる。不織布はステープルマイクロファイバーを結合することによって形成され、該ファイバーは非静止凝固浴(a non-stationary coagulation bath)中で湿式紡糸法によって製造される(Zapotocky V. et al., International Journal of Biological Macromolecules, 95, 903-909, 2017)。

【0006】

トリクロロイソシアヌル酸、又はトリクロロイソシアヌル酸ナトリウムによる酸化

トリクロロイソシアヌル酸(TCC)は、ほとんどの場合非水溶媒中で、構造的に単純なアミドをN-塩素化してN-クロラミドにするためにしばしば使用される(Hiegel G. A. et al., Synthetic Communications, 35, 2099-2105, 2005)。さらに、TCCは、水の存在下で一級水酸基を選択的に酸化するための、ピペリジニルオキシのもの(TEMPO)のような安定なラジカルとの組み合わせでしばしば言及される。ヒアルロン酸に関しては、水中でTEMPOと共にTCCを使用することが、例えば特許(Buffa R. et al., WO2011069475A3)に記載された。そこでは一級水酸基をアルデヒドとカルボン酸に酸化することのみが述べられクロラミドの形成は述べられていなかった。従って、大量の第二及び第一アルコールの両方を含む基質(多糖類)の場合、TCC及びその類似化合物が使

10

20

30

40

50

用される場合は水酸基上の反応が予測され得る。ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム (DCC-Na) としても知られている TCC のモノナトリウム塩は、反応性はより低い、より良好な水溶性の TCC 類似化合物である。しかしながら、水酸基を含まないアミン及びアミドのいくつかを酸化させるための DCC-Na の使用が開示された (Sun X. et al., Ind. Eng. Chem. Res., 49, 22, 2010)。生じたクロラミンは重合され、最終基質は、ラテックス乳濁液の形態の抗菌性、抗真菌性及び抗ウイルス性物質として試験され成功した (Cao Z. et al., App. Mat. Inter. 1, 2, 494-504, 2009)。

【0007】

上記の資料に基づくと、水中での N -塩素化ヒアルロナンアミド ($\text{N-chlorinated hyaluronan amide}$) の選択的な調製のための TCC 又はその特定の類似化合物の使用は、想定されるヒアルロナンの水酸基との反応のため、予測可能でないことが結論付けられ得る。

【0008】

多糖類の次亜塩素酸又は次亜塩素酸塩による酸化

次亜塩素酸及びその塩は、主としてピペリジニルオキシラジカル (TEMPO) と組み合わせて、多糖類の水酸基の酸化にしばしば使用される (Bragd P. et al., WO2002/48197, Buffa R. et al., WO2011/069475A3)。アミド基を含む多糖類に関しては、大部分の場合、各クロラミドの形成が観察されなかったと一般的には言えるであろう。初期の資料はヒアルロナンクロラミドの存在に全く言及しなかった (Green S. P. et al., J. Rheumatology, 17, 1670-5, 1990, Lindvall S. et al., Chem.-Biol. Interac. 90, 1-12, 1994, Baker M. S. et al., 461-7 Arthritis and Rheumatism, 32, 4, 1989)。前述の論文は、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) と過酸化水素及び塩化物との反応において生じる次亜塩素酸又はその塩によって引き起こされたヒアルロナンの分解過程の検討を記載している。炎症過程をシミュレートする目的で主として細胞間マトリックスに含まれるグリコサミノグリカンの分解について記述しているいくつかの刊行物がさらに存在する。主な資料は、炎症プロセス自体及び予測される特定の化学構造の生体内での存在の両方に関する情報であった。より最近の情報、既にヒアルロナンのクロラミドに言及している。例えば、刊行物 (Hawkins C. L. et al., Free Radical Biology & Medicine, 24, 9, 1396-1410, 1998) は、アミド基を含む、低分子のものを含む、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸及び他の物質の分解のメカニズムの研究を扱っている。使用された酸化剤は $\text{HOCl} / \text{ClO}^-$ であった。著者らは、不安定な中間体 (それは直接的な方法では検出されなかったが) 以外のヒアルロナンクロラミドの形態の存在を想定していない。その理由は、その急速な均等な又は還元的な開裂にあり、いずれの場合もポリマーの分解につながるように反応するラジカルの形成に帰着する。別の論文 (Parsons B. J. et al., Biochem. J., 381, 175-184, 2004) には、MPO (ミエロペルオキシダーゼ酵素)、過酸化水素及び塩化物による、ヒアルロナン、コンドロイチン硫酸及び他の基質のクロラミドの形成について記載されている。著者らはそれぞれのクロラミドは一定のライフタイムを有すると推定し、そのようなクロラミドの添加剤による分解の詳細な記載を提供している。別の非常に興味深い論文 (Rees M. D. et al., 125, 13719-13733 J. Am. Chem. Soc., 2003) には、アミド基を含む単糖、オリゴ糖及び多糖の NaClO との反応について記載されている。前述の論文は、 Cu^{2+} のような他の試薬及び物質の存在下及び不存在下の両方における、また酸素との組み合わせでの、各々 35% 及び 16% の修飾度を有するヒアルロナン及びコンドロイチン硫酸のクロラミドの安定性の完全な分析を含んでいる。この分解がある種の金属の存在によってかなり加速されることが見出された。ヒアルロナン及びコンドロイチン硫酸のポリマークロラミドの 50 °C の温度における急速な分解は、金属がない状態で観察された。この分解は、より低い温度では著しく遅かった。直接観察の結果はさらに、過酸化水素の存在下及び生理学的な量の塩化物の存在下でおきる MPO とグリコサミノグリカンとの反応が少量のグリコサミノグリカンクロラミドを生成させることを示す。従って、著者らは該クロラミドは生体内でも生成されるという結論に達した。

【0009】

上記の資料に基づいて、低い修飾度を有するヒアルロナンクロラミドは、既知ではあ

ても、それらを生物医学的な用途のための組成物を調製するのに適切なものとする十分な安定性を有することを期待できないという結論になった。

【0010】

ヒアルロン酸及び三ヨウ化物

－1より高い酸化度を有するヨウ素（ I^- ）の形態は、防腐効果及び消毒効果を付与するよく知られた生体適合性化合物である。最も普及した形態の一つは、分子状ヨウ素（ I_2 ）及びヨウ化物（ I^- ）への可逆的な分解が起こりやすい三ヨウ化物（酸化度－1／3）である。分子状ヨウ素は、気体状態に変化しやすく、このことは三ヨウ化物を含む固形材料が I_2 の昇華により徐々にその酸化特性を失うことを意味する。この理由で、三ヨウ化物は様々な溶液の形で使用されることが殆どである。その一例は、その生体適合性及び有効性のため、防腐効果又は消毒効果を必要とする種々の用途に適する、いわゆるルゴールヨウ素溶液（三ヨウ化カリウムの水溶液）である。前記の溶液の軽微な欠点は、それが傷痕及び一時的な皮膚の脱色の形成を引き起こし得ることにある。後者の欠点は、傷跡が残ることを著しく抑制し、一般に、著しく治療プロセスに寄与するヒアルロン酸の添加によって克服された。文献C Z 1 2 0 1 5は200, 000～2, 500, 000 g.mol⁻¹の範囲の分子量を有するヒアルロン酸の生理学的に許容可能な塩、ヨウ素及びヨウ化カリウムを含む包帯付着防止のための組成物を記載している。無菌の水溶液又はゲルの形態で入手可能なこの組成物は、創傷治療プロセスを加速することができる。局所的な創傷治療の用途への、上記のヒアルロン酸及び三ヨウ化カリウムの溶液(商品名Hyiodine（登録商標）)の使用も、いくつかの文献（Bezdekova B. et al., Veterinarstvi 54, 516-519, 2004; Frankova J. et al., Journal of Materials Science: Materials in Medicine 17, 891-898, 2006; Slavkovsky R. et al. Clinical and Experimental Dermatology 35, 4, 373-379, 2010）に記載された。著者らは、主に生体適合性の抗菌性三ヨウ化物と生体適合性のヒアルロン酸を含む独特な組み合わせと、治療プロセスをサポートする後者の存在のおかげで、慢性創傷の治療の分野で優れた結果を得た。

【0011】

しかしながら、貯蔵、輸送及び可能な他の現場使用(in situ applications)が関係する場合、三ヨウ化物と多糖類を含む溶液の適用可能性の重要な制限を考慮に入れなければならない。一方、この材料(溶液)の体積は類似の固体形態の体積よりかなり大きく、またさらに現場使用の可能性は溶液の空間的な不安定性(流出)によりかなり制限される。一方、三ヨウ化物の酸化活性が、長期保存のために標準的であるが脆弱であるケイ酸塩ガラス以外のタイプの包装材料の使用を非常に困難にするので、包装材料の形態によって液体形態の利用性の範囲は制限される。多糖類と三ヨウ化物を含む固形物質を調製する試みは、溶媒がない状態での三ヨウ化物の固有の不安定性により成功していなかった。溶媒の存在は、 I_2 分子の昇華プロセスを抑制し、これを I^- と再結合させて三ヨウ化物 I_3^- の形態を取り戻す。従って、溶媒の蒸発中に、ルゴールのヨウ素溶液は活性成分（ I_2 ）を急速に失い、該成分は固体状態から昇華する。これは三ヨウ化物を含む最終形態の長期保存の観点から決定的に根源的な問題を構成する。

【0012】

文献C Z 2 2 3 9 4は、治療プロセスを促進するための抗菌性混合物並びに創傷治療を促進するための抗菌性ドレッシングを開示する。上記の混合物は、生理学的に活性なヒアルロン酸塩、及び場合によっては、さらに他の多糖類、及び活性な抗菌性物質を含む。それ以外に、ヨウ化カリウムのような電解質を含む。この組成物は、化学的又は物理的混合物の形態であることが可能であり、化学的なもの場合は水溶液であるのが有利であり、物理的なもの場合は多糖類ファイバーの層であり、該層の構造が抗菌性物質を含むのが有利である。この創傷ドレッシングは体表創傷の治療に適している。上記開示に特有の欠点は、三ヨウ化物以外の抗菌性物質の存在が不可欠で、それが局所的皮膚刺激、望ましくない毒性又はアレルギー反応の危険を含むことである。

【0013】

文献C Z 3 0 3 5 4 8は、－1より高い酸化度を有する活性なヨウ素を含む抗菌性組成

物の安定性に関連した問題を回避する巧妙な可能性を開示する。上記の問題の解決は、その場でヨウ化物がヨウ素酸塩と反応するより早くには活性ヨウ素が発生しないことにある。しかしながら、別の問題は、使用される酸化剤（アルカリ金属のヨウ素酸塩）が非常に強い酸化作用を示し、活性ヨウ素の形成の過程で、それがヨウ化物と反応することが可能になる前に組織と接触するに至る場合、組織にダメージをもたらすことにある。言い換えれば、－１より高い酸化度を有するヨウ素へのヨウ化物の酸化を保証する組成物の部分は生体適合性ではない。

上記欠点は、本発明による技術的解決法によって解消し、ここでは完全に生体適合性の形態の製剤が示され、これは二つの部分：

１．ヨウ化物

２．生体適合性の酸化剤

を含む。

成分１及び２は単一の最終組成物に含まれる固体のものとして形成してもよく、また二つの分離した組成物に含まれる液体のものとして形成してもよい。後者の場合は、両方の成分が溶媒の存在下で共に混合される場合、－１より高い酸化度を有するヨウ素が発生し放出される。貯蔵及び輸送中の最終組成物の安定性は、現場で水性環境が存在するより早くは－１より高い酸化度を有する活性な（揮発性の）ヨウ素は生じないという点で保証される。より高い修飾度（５０％以上）を有するヒアルロン酸のクロラミドの形態の生体適合性の酸化剤は、活性ヨウ素発生剤（a generator of the active iodine）として寄与し、ヨウ化物との急速な反応中にその発生が起こり、同時に活性塩素源として寄与する。より低い修飾度（３５％以下）を有するヒアルロン酸のクロラミドは既に記載されてきたが、各々の開示は、不十分な安定性に関する理由のため、その実用的な適用を提案するものではない。成分１及び２を含む最終組成物は、それが同じに（at the same）下記の要件を全て満たすという点で独特である：

- ・適用の種々のフェーズの全てにおける十分な生体適合性及び生分解性
- ・広範囲の種類の微生物、真菌類又はウイルスの増殖抑制（活性ヨウ素及び塩素の両方の含有に起因して）
- ・治癒プロセスに対する好ましい効果（ヒアルロン酸の存在に起因して）
- ・好適な安定度を有する広範囲の種類の形態を製造する可能性

【００１４】

一般に、前記の組み合わせは抗菌性が要求される外用及び内服用の両方、及び同時に生体適合性の創傷ドレッシング、充填材、抗接着性バリア、膜、ポケット（pockets）もしくはラップ(wraps)との関連で望ましい。

【００１５】

本発明は、ヒアルロナンクロラミド及びヨウ化物を含有する安定な、生体適合性の、かつ生分解性の組成物の調製及び使用を解決し、それにより塩素及び－１より高い酸化度を有するヨウ素の存在に起因する、治癒効果を伴う広域スペクトルの抗菌及び抗ウイルス作用を提供する。さらに、大きく調節可能な表面積及び分解時間を有する種々の形態が記述される。

【００１６】

発明の要約

本発明の主題は、ヨウ化物及びヒアルロン酸の誘導体を含む組成物であり、アミド基：－NH－CO－に含まれる水素原子の大部分が塩素原子NCI－CO－で置換されており、「大部分」とは、５０～１００％の範囲を指す。上記のように修飾された後、溶液の形態で存在するポリマー、即ちヒアルロナンクロラミドは、急速に、ヨウ化物（組成物の他方の部分）と反応し、 I_3^- 又は I_2 のような－１より高い酸化度を有するヨウ素化合物と天然のヒアルロン酸の形成に至る。下記式によりこの反応を記述できる。

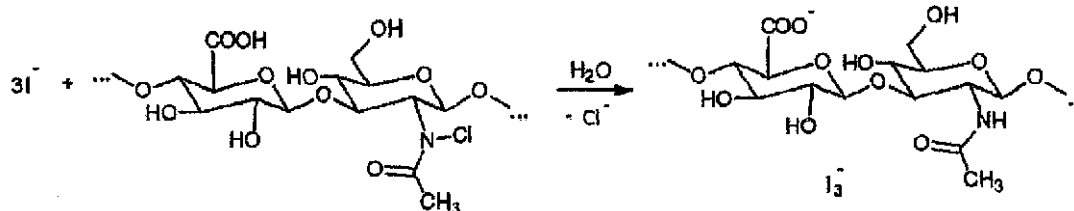
10

20

30

40

50



【0017】

最終組成物は修飾されたヒアルロン酸をさらに含んでもよく、その化学的な修飾には、ヒアルロン酸のカルボキシル基及び/又は水酸基が含まれる。

【0018】

ヒアルロン酸誘導体は、修飾ヒアルロン酸のクロラミドによって表すこともでき、前記アミド基： $-\text{NH}-\text{CO}-$ の水素原子が構造式： $-\text{NCl}-\text{CO}-$ に従って塩素原子で置換され、かつ同時にクロラミドのいくつかの $-\text{OH}$ 基が $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^2$ 基で置換され及び/又はいくつかの $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 基が $-\text{CH}=\text{O}$ で置換され及び/又はいくつかの $-\text{CO}-\text{OH}$ 基が $-\text{CO}-\text{OR}^2$ 基で置換され、式中の R^2 は1～17個の炭素原子を含む直鎖又は芳香族鎖である。前記修飾されたヒアルロン酸のクロラミドの例はエチルエステル、ベンジルエステル、ラウロイル、ホルミル、パルミトイル、ヘキサノイルヒアルロナンである。前記ヨウ化物は、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、ヨウ化カルシウム、ヨウ化マグネシウム及びそれらの混合物を含む群から選択されることが好ましい。好ましくは、多糖類、すなわちクロラミドの分子量が、 $5 \sim 500 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ の範囲である。好ましくは、前記組成物中の前記クロラミド対前記ヨウ化物のモル比が1：1～1：5の範囲内にある。

【0019】

抗菌性組成物はまた、添加物を90重量%以下の濃度で含んでもよく、前記添加剤は、ポリエチレンオキシド、水、グリセロール、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、エステル形態の修飾ヒアルロン酸、アルデヒド形態の修飾ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、オキシセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、脂肪酸、塩化ナトリウム、塩化カリウム、又は塩化カルシウムを含む群から選択される。したがって、前記修飾されたヒアルロン酸はいくつかの $-\text{OH}$ 基が $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^2$ 基で置換され及び/又はいくつかの $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 基が $-\text{CH}=\text{O}$ 基で置換され及び/又はいくつかの $-\text{CO}-\text{OH}$ 基が $-\text{CO}-\text{OR}^2$ 基で置換された修飾されたヒアルロン酸（式中、 R^2 は1～17個の炭素原子を含む直鎖又は芳香族鎖である）である。

【0020】

ヒアルロナンクロラミドの調製は、窒素に結合した塩素を含む試薬により、好ましくはトリクロロイソシアヌル酸又はジクロロイソシアヌル酸の塩により行なわれる。その調製（修飾）は、水中で、該溶液のpHを2.5～7.5の範囲、好ましくは4.0～6.0の範囲内として行なわれる。より低いpH値は、0.2当量～7当量の範囲、好ましくは2当量～4当量の範囲の量の酢酸を添加することにより得られる。最初の基質はヒアルロン酸又はその化学的に修飾される誘導体によって構成することができ、該基質の分子量は $40 \sim 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ の範囲である。さらに、最終組成物の調製は、下記：

・ヨウ化物及びヒアルロナンクロラミドを含む固体形態であって、該形態は例えば、自己支持性フィルム、凍結乾燥物、ステープルファイバーの層（不織布）、エンドレスファイバー、織物、ニット布、組物又はナノファイバー層を含み、これらの全ては所望によりさらに添加物を含み、最終組成物中のクロラミドの割合が乾燥物質に換算して計算して10～90%の範囲内として、ヨウ化物の割合が乾燥物質に換算して計算して10～90%の範囲内としてもよく、該固体形態は2層又はそれ以上の共に押圧された異なる層からなっている；

・所望により、さらに添加剤を含む液体及びゲル形態であって、ヨウ化物を含む成分がヒ

アルロナンクロラミドを含む成分と分離されており、最終適用の直前にそれらの成分が共に混合され、最終組成物中のクロラミドの割合が乾燥物質に換算して計算して10～90%の範囲内となり、最終組成物中のヨウ化物の割合が乾燥物質に換算して計算して10～90%の範囲内であるもの、の形成を含む。

【0021】

さらに、本発明は、特に下記の特性又は下記の特性の任意の組み合わせが要求される分野における、前記最終組成物の使用に関する：

- ・酸化又は抗菌又は抗真菌又は抗ウイルス活性
- ・生体適合性及び生分解性
- ・好適な安定度を有する様々な形態を製造する可能性
- ・治療プロセスへの著しい寄与
- ・制御された生分解速度

最終組成物は生物医学的な適用において、特に創傷ドレッシング、移植可能な医療機器、瘻瘡に対する製剤、抗菌性の充填材、抗接着性バリア、膜、ポケット又はラップ、吻合を行なった後の癒着の予防のための製品、又は傷の離開の予防のための製品、又は他の物質との組み合わせで、腹壁欠陥の外科的修復をサポートするための製品の製造のために使用可能である。

【0022】

最終組成物の制御された生分解速度は、ヒアルロナンクロラミドを、アルギン酸ナトリウムもしくはカルボキシメチルセルロースのようなより遅い分解性を示す添加剤と組み合わせること、及び／又はヒアルロナンクロラミドそれ自体を例えば多価の Ca^{2+} 陽イオンを用いて架橋することによって達成できる。

【0023】

本発明は、ヒアルロナンクロラミドに加えて、ヨウ化カリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カルシウム又はヨウ化マグネシウム又はそれらの混合物のようなヨウ化物を含み、治療効果と共に抗菌及び抗ウイルス作用を示す、安定な、生体適合性及び生分解性の組成物の調製及び使用に関する。さらに、大きく調節可能な表面積、機械的又は流動学的性質及び分解期間を有する広範囲の形態が記載されている。

【0024】

本発明による技術的解決法の実際の実行は、技術的な観点から複雑ではなく、また、入手しにくい化学薬品、溶剤又は単離手段を使用することを要しない。

【図面の簡単な説明】

【0025】

無し

【0026】

図面の詳細な説明

図1A、図1B：実施例20により調製されたヒアルロナンクロラミド及びヨウ化カリウムをベースとする凍結乾燥物の形態を有する組成物の抗菌活性。

この図は、ヒアルロナンクロラミドをベースとする可溶性の凍結乾燥物及び実施例20による5/1の比率のヒアルロナン及びヨウ化カリウムの混合物をベースとする可溶性の凍結乾燥物の組み合わせを含む組成物の存在下での（2回の繰り返し：左側と中央の図）、対照材料（右側の図）、即ち実施例19による5/1の比率で天然のヒアルロン酸にヨウ化カリウムを添加したものの凍結乾燥物と比較した、微生物*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*（全て図1A中）及び*Staphylococcus epidermidis*（図1B）の増殖抑制を示す。図1Bは、1つの繰り返し（左側の図）と対照材料（右側の図）の間の比較を示す。

抗菌活性の測定方法は、実施例43に記載されている。

【発明を実施するための形態】

【0027】

$DS = \text{置換度} = 100\% \times (\text{修飾されたポリマー単位のリモル量}) / (\text{全てのポリマー単位のリモル量})$

別段の定めがない限り、ここに使用される表現「当量」(eq)は、ヒアルロナンの二糖のようなそれぞれの多糖類の繰返し単位に関するものである。

別段の定めがない限り、パーセントは重量パーセントである。

ここに使用される限り、ポリマーの分子量はSEC-MALLS方法によって決定した重量平均値を表す。

【0028】

実施例1

ヒアルロナンのエチルエステルの調製

ヒアルロン酸水溶液(1g, 300 kg.mol⁻¹, 40 mlの水中)にNaOHをpH値が9に達するまで添加した。続いて、20 mlのジメチルスルホキシド及び0.08 mlのヨウ化エチルを添加し、生じた混合物を、3日間45℃の温度で攪拌した。その後、生じた混合物を、100%のイソプロパノール140 mlによって沈殿させ、濾過によって分離した固形物をイソプロパノールで洗浄し、真空乾燥した。この生成物(897 mg)をNMRによって分析した。

このエステルのDS値は6% (NMRにより測定した。文献：Kettou S. et al., CZ PV 2009-399)であった。

【0029】

実施例2

ヒアルロナンのベンジルエステルの調製

ヒアルロン酸水溶液(1g, 300 kg.mol⁻¹, 40 mlの水中)にNaOHをpH値が9に達するまで添加した。続いて、20 mlのジメチルスルホキシド及び0.08 mlの臭化ベンジルを添加し、生じた混合物を、4日間20℃の温度で攪拌した。その後、生じた混合物を、100%のイソプロパノール140 mlによって沈殿させ、濾過によって分離した固形物をイソプロパノールで洗浄し、真空乾燥した。最終生成物(920 mgの量で得られた)をNMRによって分析した。

このエステルのDS値は3% (NMRにより測定した。文献：Kettou S. et al., CZ PV 2009-399)であった。

【0030】

実施例3

ヒアルロナンのラウロイルの調製

70 mlのテトラヒドロフラン、4当量のトリエチルアミン及び0.1当量の4-ジメチルアミノピリジン、蒸留水100 ml中のヒアルロン酸(5g, 250 kg.mol⁻¹)の溶液に添加した。同時に、ラウリン酸(4当量)を、30 mlのテトラヒドロフラン及び7 mlのトリエチルアミンの混合物に溶解し、得られた溶液に、0~5℃で15分間で4.8 mlのエチルクロロホルメートを添加した。続いて、生じた懸濁液を、前記ヒアルロナンの溶液に濾過して入れ、その反応混合物を20℃で5時間攪拌した。生じた溶液を、100%のイソプロパノール400 mlを加えることにより沈殿させ、80%のイソプロパノールで、そして次に100%のイソプロパノールで洗浄した。その後、その沈殿を40℃で2日間乾燥した。置換度はNMRによって測定され37%であった。

【0031】

実施例4

ヒアルロナンのホルミルの調製

NaCl 1%, KBr 1%, N-アセチルアミノ-TEMPO(0.01当量)及びNaHCO₃(20当量)を含有するHA(1g, 200 kg.mol⁻¹)の1%水溶液に、窒素雰囲気下でNaClO(0.5当量)の水溶液を徐々に添加した。この混合物を10℃で12時間攪拌し、そこに0.1 gのエタノールを添加した。続いて、最終混合物をもう1時間攪拌した。生じた溶液を蒸留水で希釈して0.2%の濃度にし、混合物(0.1% NaCl, 0.1% NaHCO₃)に対して5リットル3回(1 x 1日)、その後蒸留水に対して5リ

10

20

30

40

50

ットル7回(2×1日)透析した。最終溶液を蒸発させ分析した。DS9%(NMRで決定した)。

【0032】

実施例5

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃で15分間攪拌した。その後、3.2g(1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、該混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、該混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS82%(NMRによって決定した)。

10

【0033】

実施例6

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン($M_w 40 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)を、100mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、該溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、3.2g(1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、該混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS83%(NMRから決定した)。

20

【0034】

実施例7

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)を1000mlの蒸留水に溶解した。続いて、2mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、3.2g(1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS72%(NMRから決定した)。

【0035】

30

実施例8

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、0.14mlの酢酸(0.2当量)を添加し、その溶液を20℃で15分間攪拌した。その後、3.2g(1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、該混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS53%(NMRから決定した)。

【0036】

実施例9

40

ヒアルロナンクロラミドの調製

5gのヒアルロナン($M_w 180 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)を250mlの蒸留水に溶解した。続いて、3mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、3.2g(1当量)の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS83%(NMRから決定した)。

【0037】

実施例10

ヒアルロナンクロラミドの調製

50

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて、5 mlの酢酸 (7 当量) を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、3.2 g (1 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 95% (NMRから決定した)。

【0038】

実施例 11

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて、2 mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、1.07 g (0.33 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 51% (NMRから決定した)。

【0039】

実施例 12

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて、2 mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、4.8 g (1.5 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 96% (NMRから決定した)。

【0040】

実施例 13

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて、2 mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、2.91 g (1 当量) の量のトリクロロイソシアヌル酸を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 97% (NMRから決定した)。

【0041】

実施例 14

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて、2 mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、0.87 g (0.3 当量) の量のトリクロロイソシアヌル酸を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で24時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し、20時間真空乾燥した。DS 71% (NMRから決定した)。

【0042】

実施例 15

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 gのヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を250 mlの蒸留水に溶解した。続いて、2 mlの酢酸を添加し、その溶液を20℃の温度で15分間攪拌した。その後、3.2 g (1 当量) の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を20℃の温度で5時間攪拌した。続いて、その混合物を2.5リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を2リットルのイソプロパノールで洗浄し

， 20 時間真空乾燥した。DS 52 %（NMR から決定した）。

【0043】

実施例 16

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 g のヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 250 ml の蒸留水に溶解した。続いて，2 ml の酢酸を添加し，その溶液を 20 °C の温度で 15 分間攪拌した。その後，3.2 g（1 当量）の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後，その混合物を 20 °C の温度で 48 時間攪拌した。続いて，その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 2 リットルのイソプロパノールで洗浄し，20 時間真空乾燥した。DS 85 %（NMR から決定した）。NMR 溶液 (D_2O 0.7 ml 中の 7 mg の生成物) を，20 °C でさらに 5 日間放置した後に測定した。DS 値は 84 % と決定された。粉末の形態の固体部分は 20 °C で 100 日間放置し，その後，その試料を D_2O に溶解した。DS 値は 84 % と決定された。

【0044】

実施例 17

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 g のヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 250 ml の蒸留水に溶解した。続いて，2 ml の酢酸を添加し，その溶液を 20 °C の温度で 15 分間攪拌した。その後，3.2 g（1 当量）の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後，その混合物を 5 °C の温度で 72 時間攪拌した。続いて，その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 2 リットルのイソプロパノールで洗浄し，20 時間真空乾燥した。DS 64 %（NMR から決定した）。

【0045】

実施例 18

ヒアルロナンクロラミドの調製

5 g のヒアルロナン ($M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) を 250 ml の蒸留水に溶解した。続いて，2 ml の酢酸を添加し，その溶液を 20 °C の温度で 15 分間攪拌した。その後，3.2 g（1 当量）の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後，その混合物を 40 °C の温度で 5 時間攪拌した。続いて，その混合物を 2.5 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を，2 リットルのイソプロパノールで洗浄し，20 時間真空乾燥した。DS 75 %（NMR から決定した）。

【0046】

実施例 19

ヒアルロナン及びヨウ化カリウムを含む凍結乾燥物の調製

蒸留水 50 ml 中のヒアルロナン（1 g， $M_w 2200 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ ）の溶液を，蒸留水 5 ml 中のヨウ化カリウム 0.2 g の溶液と混合し，該混合物を 10 分間攪拌した。その後，最終溶液を -50 °C の温度で急速冷凍し凍結乾燥した。

【0047】

実施例 20

凍結乾燥物（ヒアルロナンクロラミド+ヒアルロナン+ヨウ化カリウム）の調製—ヨウ素発生剤

実施例 19 により調製された凍結乾燥物 15 mg 及び実施例 25 により調製された凍結乾燥物 15 mg を，交互に積み重ねるやり方（最下層は実施例 19 による凍結乾燥物である）で置き，20 °C で，対応する圧力を 1 分間加えて，平滑なガラスローラーによって機械的に共にプレスした。得られた材料を乾燥条件下で貯蔵した。

【0048】

実施例 20 a

凍結乾燥物（ヒアルロナンクロラミド+ヒアルロナン+ヨウ化カリウム）の調製—ヨウ素発生剤

実施例 19 により調製された凍結乾燥物 30 mg 及び実施例 25 により調製された凍結乾

10

20

30

40

50

乾燥物 3 mg を、交互に積み重ねるやり方（最下層は実施例 19 による凍結乾燥物である）で置き、20℃で、必要な圧力を 1 分間加えて、平滑なガラスローラーによって機械的に共にプレスした。得られた材料を乾燥条件下で貯蔵した。

【0049】

実施例 20b

凍結乾燥物（ヒアルロナンクロラミド+ヒアルロナン+ヨウ化カリウム）の調製—ヨウ素発生剤の調製

実施例 19 により調製された凍結乾燥物 3 mg 及び実施例 25 により調製された凍結乾燥物 30 mg を、交互に積み重ねるやり方（最下層は実施例 19 による凍結乾燥物である）で置き、20℃で、必要な圧力を 1 分間加えて、平滑なガラスローラーによって機械的に共にプレスした。得られた材料を乾燥条件下で貯蔵した。

10

【0050】

実施例 21

自己支持性フィルム（ヒアルロナンクロラミド+ヒアルロナンラウロイル+ヨウ化カリウム）—ヨウ素発生剤の製造

実施例 31 及び 32 により製造された自己支持性フィルムを交互に積み重ねるやり方（最下層はヒアルロナンラウロイル+ヨウ化カリウムである）で置き、20℃で、必要な圧力を 1 分間加えて、平滑なガラスローラーによって機械的に共にプレスした。得られた材料を乾燥条件下で貯蔵した。

【0051】

20

実施例 22

ヒアルロナンのエチルエステルのクロラミドの調製

実施例 1 によって調製したヒアルロナンエチルエステル 0.5 g を 25 ml の蒸留水に溶解した。続いて、0.2 ml の酢酸を添加し、その溶液を 20℃の温度で 15 分間攪拌した。その後、0.32 g（1 当量）の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を 20℃の温度で 24 時間攪拌した。続いて、その混合物を 250 ml のイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 0.2 リットルのイソプロパノールで洗浄し、20 時間真空乾燥した。DS 80%（NMR から決定した）。

【0052】

実施例 23

30

ヒアルロナンのベンジルエステルのクロラミドの調製

実施例 2 によって調製したヒアルロナンのベンジルエステル 0.5 g を、25 ml の蒸留水に溶解した。続いて、0.2 ml の酢酸を添加し、その溶液を 20℃の温度で 15 分間攪拌した。その後、0.32 g（1 当量）の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を 20℃の温度で 24 時間攪拌した。続いて、その混合物を 0.25 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 0.2 リットルのイソプロパノールで洗浄し、20 時間真空乾燥した。DS 78%（NMR から決定した）。

【0053】

実施例 24

40

ヒアルロナンのホルミルの調製

実施例 4 によって調製したヒアルロナンホルミル 0.5 g を 25 ml の蒸留水に溶解した。続いて、0.2 ml の酢酸を添加し、その溶液を 20℃の温度で 15 分間攪拌した。その後、0.32 g（1 当量）の量のジクロロイソシアヌル酸のナトリウム塩を添加した。その後、その混合物を 20℃の温度で 24 時間攪拌した。続いて、その混合物を 0.25 リットルのイソプロパノールによって沈殿させ濾過した。固体の部分を 0.2 リットルのイソプロパノールで洗浄し、20 時間真空乾燥した。DS 75%（NMR から決定した）。

【0054】

実施例 25

凍結乾燥したヒアルロナンクロラミドの調製

50

蒸留水 50 ml 中の実施例 16 により調製された 1 g のヒアルロナンクロラミドの溶液を直ちに均質化に続いて、 -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。DS 値は NMR によって 83 % として決定した。

【0055】

実施例 26

ヒアルロナンのエチルエステルの凍結乾燥したクロラミドの調製

蒸留水中 10 ml 中の実施例 22 により調製されたヒアルロナンのエチルエステルのクロラミド 0.2 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。DS 値は NMR によって 68 % と決定された。

【0056】

実施例 27

凍結乾燥したヒアルロナンのベンジルエステルのクロラミドの調製

蒸留水中 10 ml 中の実施例 23 により調製されたヒアルロナンのベンジルエステルのクロラミド 0.2 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。DS 値は NMR によって 67 % と決定された。

【0057】

実施例 28

ヒアルロナンクロラミドで製造されたステープルファイバーからの不織布の製造

2 % 溶液の調製は、NMR による置換度が 71 % のヒアルロナンクロラミド（実施例 14）の使用をベースとした。上記の成分を秤量し、必要な量を得るために蒸留水を添加した。全混合物を、室温で、攪拌機中、その規定速度を 500 rpm、攪拌時間を 24 時間として攪拌した。最終溶液は透明で僅かに粘性であった。ステープルファイバーの製造法は、100 % のイソプロパノールを含有する可動の凝固浴の液流中での高分子溶液の析出をベースとする。上記溶液を糸道ダクト（1 管／直径 8 mm）を通して供給される凝固浴の液流中へ押出ノズルにより室温でドーズした。この浴の制御された流速は 1.15 m/s であった。ステープルファイバーの形成は析出によって得られた。形成されたファイバーを浴流中に漂わせ、分離コーム（separation combs）に捕獲し、100 % イソプロパノールを含有する熟成浴に移した。熟成浴に入れた直後に、この粗ファイバー（raw fiber）を、ファイバーの量と浴の量の比率を 0.5 g / 350 ml として、攪拌機の回転ブレードにより粉碎した。最終的な繊維の分散液をフィルターフレームを通し多孔基材を通して濾過した。与えられた実験については、表面積 64 cm² のフィルターフレームを使用した。濾過した後に、PAD ニットファブリック（a PAD knitted fabric）を用いてファイバーを乾燥装置上に移した。該装置は不織布の固定のための手段を備えていた。乾燥装置上に置かれる前に、ローラーを用いて析出残渣をファイバーから取り除いた。この不織布を 40 °C の温度で 30 分間乾燥した。生じた層を、自己支持性層として基材から分離し、化学天秤によって秤量した。該布の面積重量は 50.2 g/m² であった。形成した不織布の置換度は NMR によって 64 % と決定された。

【0058】

実施例 29

ヒアルロナンクロラミドからのナノファイバー層の製造

ヒアルロン酸を含むナノファイバー層の製造のために、下記の組成の水溶液を調製した。実施例 5 により調製されたヒアルロナンクロラミドの濃度は乾燥分で 37.5 % であり、80 kg.mol⁻¹ の分子量の天然のヒアルロナンの濃度は 37.5 % であり、600 kg.mol⁻¹ の分子量のポリエチレンオキシドの量は 25 % であった。全乾燥分の濃度は 5 % であった。この溶液をシリンジに供給し、針なし線状ノズル（a needleless linear nozzle）を用いて、コレクタエミッタ間の電圧 50 kV 及び間隔 16 cm で、プレート型コレクター上の静電場で紡糸した。ファイバーの寸法は 110 ± 27 nm であった。DS 値は NMR によって 30 % と決定された。

【0059】

実施例 29 a

ヒアルロナンとヨウ化カリウムを含むナノファイバー層の製造

ヒアルロン酸を含むナノファイバー層の調製の目的で、下記の組成を有する水溶液を調製した。80 kg.mol⁻¹の分子量を有する天然のヒアルロナンの濃度は62.5%であり、600 kg.mol⁻¹の分子量を有するポリエチレンオキシドの量は25%であり、KIの量は12.5%であった。乾燥分の全濃度は5%であった。この溶液をシリンジに移し、針なし線状ノズルを用いて、コレクタエミッタ間の電圧及び間隔を各々56 kV及び18 cmとして、プレート型コレクター上の静電場で紡糸した。ファイバーの寸法は140 ± 35 nmであった。

【0060】

実施例30

ヒアルロナンクロラミドからの自己支持性フィルムの製造

該フィルムの調製を、密閉チャンバーでフィルムを乾燥する特別な乾燥装置中に行った。該装置は温度が制御可能な底板及び天板を装備していた。装置の詳細な説明は刊行物 (Foglarova et al., PV2015-166; Foglarova M. Et al., Carbohydrate Polymers 2016, 144, 68-75) に提供されている。実施例5に記載した秤量200 mgのヒアルロナンクロラミドを、20 mlの脱塩水に溶解し、生じた溶液を2時間攪拌した。その後、最終溶液を乾燥装置内のパッド（疎水化ガラス）上にドーズし、18時間密閉チャンバーで乾燥した。乾燥機の底板及び天板の温度は各々50℃及び20℃であった。乾燥した後に、フィルムをパッドから外し、将来の使用のために保管した。DS値はNMRによって60%と決定された。

【0061】

実施例31

ヒアルロナン及びヨウ化カリウム（10／1）からの自己支持性フィルムの製造

フィルムの調製は実施例30に記載した装置中で行なった。秤量160 mgのヒアルロン酸ナトリウム及び16 mgのヨウ化カリウムは、脱塩水16 mlの脱塩水に溶解し、生じた溶液を15分間攪拌した。その後、最終溶液を、乾燥装置のパッド（疎水化ガラス）上にドーズし、密閉チャンバー内で7時間乾燥した。該乾燥機の底板及び天板の温度は各々50℃及び20℃であった。乾燥した後に、フィルムをパッドから外し、将来の使用のために保管した。

【0062】

実施例32

ラウロイルヒアルロナン及びヒアルロナンクロラミド（3／1）からの自己支持性フィルムの製造

フィルムの調製は実施例30に記載した装置中で行なった。秤量150 mgのヒアルロン酸ナトリウムのラウロイル誘導体（実施例3に記載）を、2-プロパノールの水溶液（50重量%）15 mlに溶解し、生じた溶液を18時間攪拌した。秤量50 mgの実施例5に記載のヒアルロナンクロラミドを5 mlの脱塩水に溶解し、生じた溶液を2時間攪拌した。続いて、両方の溶液を30分間で混合した。その後、最終溶液を、乾燥装置のパッド（疎水化ガラス）上にドーズし、密閉チャンバー内で7時間乾燥した。乾燥機の底板及び天板の温度は各々50℃及び20℃であった。乾燥した後に、フィルムをパッドから外し、将来の使用のために保管した。最終材料中のヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって25%と決定された。

【0063】

実施例33

ナノファイバー層（ヒアルロナンクロラミド+ヒアルロナン+ヨウ化カリウム）-ヨウ素発生剤の製造

実施例29及び29aにより製造されたナノファイバー層を、互いに積み重ねるやり方（最下層はヒアルロナン+ヨウ化カリウム）で配置した。この材料を乾燥条件下で貯蔵した。

【0064】

10

20

30

40

50

実施例 3 4

溶液の形態の二成分混合物（ヒアルロナンクロラミド＋ヨウ化ナトリウム 1／1）の調製－ヨウ素発生剤

適用の直前に、蒸留水 3 ml 中の実施例 5 により調製されたヒアルロナンクロラミド 100 mg の溶液を、蒸留水 1 ml 中に 29 mg のヨウ化ナトリウムを含む溶液と静電ミキサー (a static mixer) により混合した。その直後、生じた混合物中にオレンジ色に着色した三ヨウ化物及びヨウ素が生じた。

【0065】

実施例 3 5

ゲルの形態の二成分混合物（ヒアルロナンクロラミド＋ヨウ化カルシウム 1／5）の調製－ヨウ素発生剤

適用直前に、蒸留水 6 ml 中の実施例 5 により調製されたヒアルロナンクロラミド 100 mg の溶液を、35 ml の蒸留水中に $1,900 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ の分子量を有する天然のヒアルロナン 758 mg 及びヨウ化カルシウム 142 mg を含む溶液と静電ミキサーにより混合した。その直後、生じた粘性の混合物中にオレンジ色に着色した三ヨウ化物及びヨウ素が生じた。

【0066】

実施例 3 6

酸化セルロース／ヒアルロナンクロラミド凍結乾燥物の調製

蒸留水 100 ml 中の酸化セルロース ($\text{Mw } 50 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) 0.3 g 及び実施例 5 により調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR によって 24 % と決定された。

【0067】

実施例 3 7

アルギナート／ヒアルロナンクロラミド凍結乾燥物の調製

蒸留水 100 ml 中のアルギナート ($\text{Mw } 40 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) 0.3 g 及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR によって 26 % と決定された。

【0068】

実施例 3 8

カルボキシメチルセルロース／ヒアルロナンクロラミド凍結乾燥物の調製

蒸留水中 100 ml のカルボキシメチルセルロース ($\text{Mw } 30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) 0.3 g 及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.03 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR によって 3 % と決定された。

【0069】

実施例 3 9

コンドロイチン硫酸／ヒアルロナンクロラミド凍結乾燥物の調製

蒸留水 100 ml 中のコンドロイチン硫酸 ($\text{Mw } 45 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) 0.3 g 及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR によって 25 % と決定された。

【0070】

実施例 4 0

ヒドロキシエチルセルロース／ヒアルロナンクロラミド凍結乾燥物の調製

蒸留水 100 ml 中のヒドロキシエチルセルロース ($\text{Mw } 35 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) 0.3 g 及び実施例 5 によって調製したヒアルロナンクロラミド 0.1 g の溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドの DS 値は NMR

10

20

30

40

50

によって25%決定された。

【0071】

実施例41

ホルミルヒアルロナン／ヒアルロナンクロラミド凍結乾燥物の調製

蒸留水100ml中の実施例4により調製されたヒアルロナンホルミル ($M_w 50 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) 0.3g及び実施例5により調製されたヒアルロナンクロラミド0.1gの溶液を、均質化に続いて直ちに -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって25%と決定された。

【0072】

実施例42

CaCl_2 で架橋したヒアルロナンクロラミドの凍結乾燥物の調製

蒸留水100ml中の実施例5によって調製したヒアルロナンクロラミド (0.1g) の溶液に0.01gの $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を添加し、その混合物を 20°C で1時間攪拌した。均質化に続いて、最終粘稠溶液を -50°C の温度で急速冷凍し、凍結乾燥した。ヒアルロナンクロラミドのDS値はNMRによって64%と決定された。

【0073】

実施例43

インビトロ抗菌活性試験 (図1A及び1B) :

試験する個々の微生物について、約 10^5 のCFU/mlの濃度を有する懸濁液を調製した。100 μl の量の懸濁液を、ペトリ皿中のトリプトンソイ寒天の表面に接種した (各皿に適用した微生物の概数は 10^4 CFUであった)。その懸濁液を、滅菌ループにより皿の全表面に一様に広げた。寒天に懸濁液を吸収させた後に、寒天の表面を試験のために選択された無菌の四角形の試料で覆った。試験する細菌株を有する皿を 37°C で24時間培養した。この試験は、重さ25~35mg、およそその大きさ15mm x 15mmの四角片の形態の実施例20により調製されたヒアルロナンクロラミド及びヨウ化カリウムの凍結乾燥物を含み、それぞれの対照材料は実施例19により調製されたヒアルロナンクロラミドを含まない類似の凍結乾燥物である。有効性試験については拡散プレート法 (2Dレイアウト) を選択した。培養のためには非選択的な基材 (トリプトンソイ寒天) を選択した。四角片の試料を下記の微生物に関して試験した: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*。図1は、ヒアルロナンクロラミドを含まない対照材料と比較して、本発明によるヨウ化物と共にヒアルロナンクロラミドを含む組成物が著しく高い効果を与えることを明確に示す。

10

20

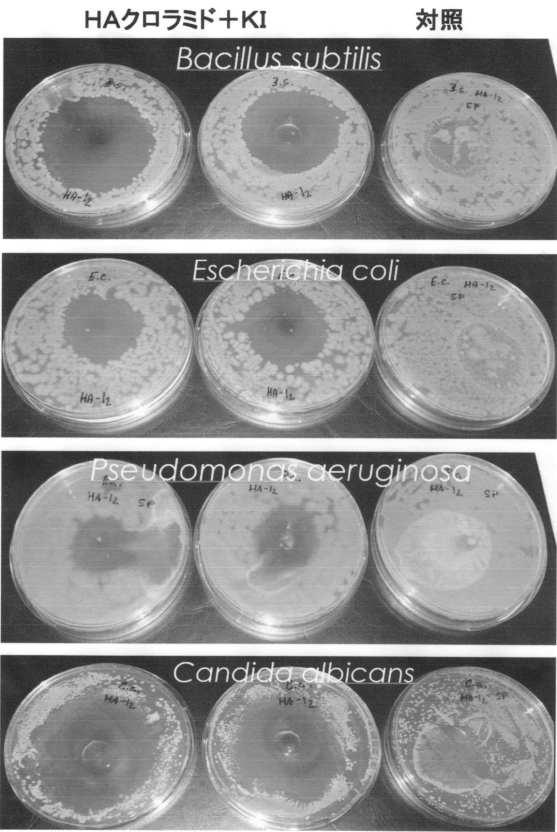
30

40

50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】

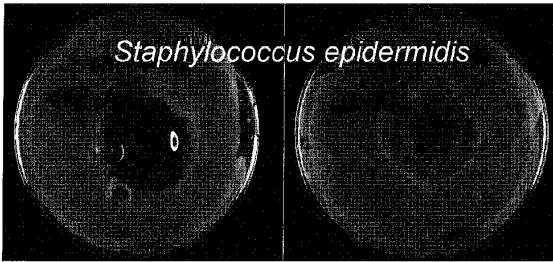


Fig. 1B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- モヅカ 248
- (72)発明者 ステパンコヴァ, ヴェロニカ
チェコ, 57001 ホチェノフ, ホチェノフ シー. ピー. 55
- (72)発明者 クルハネク, ヤロミール
チェコ, ビーレー プジエドムニェスティー, 53003 パルドゥビツェ, ダシツカー 1769
- (72)発明者 フメラシュ, ヨセフ
チェコ, ヒルヴァーティ, 56203 ウスチー ナト オルリツィー, ポッド レセム 472
- (72)発明者 マルホルドヴァ, ルーシー
チェコ, 56501 ホツェニ, ムホヴァ 1856
- (72)発明者 バサラボヴァ, イヴァナ
スロバキア, 06801 メジラボルツェ, マホヴァ 731/6
- (72)発明者 モラフコヴァ, ミカエラ
チェコ, 56401 ジャンベルク, ナメスティ ゲン. クノパ 811
- (72)発明者 クレイチャー, ヘレナ
チェコ, プジエドムニェスティー, 56802 スヴィタヴィー, パヴロヴォヴァ 1424/11
- (72)発明者 リプンスカ, クリスティーナ
チェコ, 56151 レトフラト, フソヴォ ナメスティ 386
- (72)発明者 ノヴォトニー, ヤロスラフ
チェコ, 56151 レトフラト, クンチツェ 169
- (72)発明者 ペペリアエフ, スタニスラフ
チェコ, 56002 チェスカ トレボヴァ, ロートカ 190
- (72)発明者 ソボツカ, ルボス
チェコ, マルショヴィツェ, 50009 フラデツ クラーローヴェー, ケー オサデ 730/7
- (72)発明者 ヴェレブニー, ヴラディミル
チェコ, 56401 ジャンベルク, サドヴァ 1466
- 審査官 伊藤 幸司
- (56)参考文献 国際公開第2012/092908 (WO, A1)
特表2005-514445 (JP, A)
Free Radical Biology and Medicine, 2013年, 56, pp.72-88
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K
A61L
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)