

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97101728

※申請日期：97.1.17

※IPC 分類：

A61K 31/726 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

玻尿酸之甲基酯

METHYL ESTERS OF HYALURONIC ACID

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

諾佛酵素生化聚合物公司 / NOVOZYMES BIOPOLYMER A/S

代表人：(中文/英文)

彼得 沃滋 林登 / LINDUM, PETER WÜRTZ

住居所或營業所地址：(中文/英文)

丹麥 DK-2880 貝格史法爾德 克洛格史維耶 36 號

Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, DENMARK

國籍：(中文/英文)

丹麥 / DENMARK

三、發明人：(共 4 人)

姓名：(中文/英文)

1. 維尼特 谷瑪 / KUMAR, VINEET

2. 芬妮 隆金 / LONGIN, FANNY

3. 卡迪亞 舒華 艾德拉維 / SCHWACH-ABDELLAOUI, KHADIJA

4. 李察 A. 格羅斯 / GROSS, RICHARD A.

國籍：(中文/英文)

1. 印度 / India

2. 法國 / France

3. 法國 / France

4. 美國 / USA

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國 、 2007.01.25 、 60/886,549

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於產生玻尿酸（hyaluronic acid, HA）之甲基酯之方法。

【先前技術】

玻尿酸（HA）為屬於非硫酸化葡萄糖胺聚糖類之天然直鏈碳水化合物聚合物。其由 β -1,3-*N*-乙醯葡萄糖胺及 β -1,4-葡萄糖醛酸重複雙糖單元構成，分子量（molecular weight, MW）達 6 MDa。HA 存在於透明軟骨、關節滑液及皮膚組織真皮及表皮中。HA 可自包括脊椎動物結締組織在內之天然組織，自人類臍帶及自雞冠提取。然而，當今其較佳係藉由微生物法製備，以最小化轉移傳染性劑之潛在風險，且增加產物均一性、品質及可用性（美國專利第 6,951,743 號；WO 03/0175902）。

已鑑定體內 HA 之許多作用。其作為諸如皮膚、腱、肌肉及軟骨之許多組織之細胞的機械支撐物，在生物有機體中起重要作用。HA 涉及關鍵生物過程，諸如組織之濕潤及潤滑。亦猜測其在諸如貼附、發育、細胞活動、癌症、血管生成及創口癒合之許多生理功能中具有作用。由於 HA 之獨特物理及生物學性質（包括黏彈性、生物相容性及生物降解能力），HA 被廣泛用於化妝品、眼科學、風濕病學、藥物及基因傳遞、創口癒合及組織工程中之當前及正在開發中的應用。HA 在一些該等應用中之使用因以下情

形受到限制：HA 甚至在室溫下，亦即約 20°C 下於水中可溶，其藉由體內之玻尿酸酶快速降解，且其難以加工成生物材料。因此已引入 HA 之化學改質，以改良 HA 之物理及機械性質及其活體內 (*in vivo*) 滯留時間。

有文獻中描述藉由自人類臍帶提取而獲得之具有高分子量的玻尿酸甲基酯 (Jeanloz R W 及 Forcheilli E J (1950), *J. Biol. Chem.* 186, 495-511; 及 Jager K E 及 Winkler U K (1979) *J. Bacteriology* 1065-1067)。該酯係藉由用重氮甲烷在醚溶液中處理游離玻尿酸獲得，且證明實質上所有羧基被酯化。亦已描述具有約 5 與 15 個之間的雙糖單元之 HA 寡聚物甲基酯 (Christener J E, Brown M L, Dziwiatkowski D D (1977) *Biochem. J.* 167, 711-716)。亦描述用甲醇在一部分羥基醇基中醚化之玻尿酸甲基酯 (Jeanloz, 1952, *J. Biol. Chem.* 194, 141-150; 及 Jeanloz R W (1952) *Helvetica Chimica Acta* 35, 262-271)。

基於皮膚水合研究，已觀察到，與天然玻尿酸相比，玻尿酸甲基酯之皮膚水合能力增強 (美國專利 4,851,521)。

為了建立玻尿酸與其衍生物之間的比較，della Valle F 及 Romeo A 已經進行了一些實驗 (美國專利 4,851,521)。基於該等實驗，確認玻尿酸甲基酯之水合能力比天然化合物好。

由 della Valle 及 Romeo (EP 專利 216 453 B1) 描述了製備玻尿酸之酯的方法，其中先在兩個步驟中將 HA 轉化成四級銨鹽，以使其可溶於有機溶劑中，且隨後與脂族、

芳脂族、芳族、環狀及雜環系列之醇衍生物反應。此舉產生在 HA 羧基處完全或部分酯化之化合物。

在 EP 專利 1 401 876 B1 中，Mariotti 及同事描述了羥基部分或完全酯化且羧基完全或部分經醇酯化或呈鹽形式的新穎 HA 衍生物。

Ferlini 在專利申請案 WO 2005/092929 A1 中揭示具有低取代度之玻尿酸丁酸酯的製備及用途。HA 之四級銨鹽與醯化試劑反應，引起羥基之部分酯化。

Toida 描述了一種產生烷基酯化葡萄糖胺聚糖之方法（美國專利申請案 2006/0172967 A1）。該方法包含使三烷基矽烷基重氮烷與玻尿酸在二甲亞砷及甲醇中反應之步驟。烷基酯化發生在羧基處且可為部分或全部酯化。

皮膚及其滋養物之水合作用似乎與皮膚組織之玻尿酸含量密切相關。事實上已證明，HA 之外源施用明顯促進皮膚組織之水合狀態。在根據本發明之 HA 酯化衍生物中，亦發現該等特定特徵，且達到更高之程度，並且鑒於該原因，其可在很大程度上用於化妝品領域。

玻尿酸之酯可藉由本身已知用於羧酸酯化的方法來製備，例如藉由在催化物質，諸如強無機酸或酸型離子交換劑存在下，用所要醇處理游離玻尿酸，或在無機或有機鹼存在下，用能夠引入所要醇殘基之醚化劑處理游離玻尿酸。作為醚化劑，可能使用文獻中已知者，包括各種無機酸或有機磺酸之酯、氫酸，亦即烴基鹵化物、碘甲烷或碘乙烷，或中性硫酸酯或烴基酸、alfites、碳酸酯、矽酸酯、

亞磷酸酯或烴基磺酸酯、甲苯或對甲苯磺酸酯或氯磺酸甲酯或乙酯。反應可在適合溶劑，例如醇，較佳為相應於欲引入羧基中之烴基之醇中進行。但反應亦可在非極性溶劑，諸如酮，醚，諸如二噁烷或，非質子性溶劑，諸如二甲亞砷中進行。作為鹼，可能使用例如鹼金屬或鹼土金屬或鎂或銀氧化物或鹼式鹽或該等金屬之一（諸如碳酸鹽）之水合物，及有機鹼三級氮化鹼（諸如吡啶或三甲基吡啶）之水合物。亦可能使用鹼型離子交換劑來替代鹼。

玻尿酸之甲基酯亦可有利地根據另一通常用於製備具有羧基之酸性多醣之羧酸酯的方法製備。該方法基於用醚化劑，較佳在非質子性有機溶劑中處理含有羧基之酸性多醣之四級銨鹽。作為起始酸性多醣，可能使用（例如）除玻尿酸以外的其他來源於動物或植物之酸性多醣及其合成修飾衍生物，諸如可自某些植物之鹼性萃取物且在木聚糖沈澱後獲得，其雙醣組分由 D-葡萄糖醛酸及 D-吡喃木糖（D-xylopyranose）組成之酸半纖維素（參見 W. Pigman 之 “The Carbohydrates”，第 668-669 頁 -R. L. Whistler, W. M. Corbett），可自其獲得之果膠及酸性多醣，亦即，聚半乳糖醛酸苷，可自植物膠（泌出物），諸如阿拉伯膠、黃耆膠獲得之酸性多醣，及最後得自海藻，諸如瓊脂及角叉菜膠之酸性多醣。作為起始物質，當然亦可能使用藉由上述所有多醣降解而獲得的分子部分。

已知之酯化方法常常藉由逐步將酯化劑添加至上述銨鹽中至上述溶劑之一中，例如二甲亞砷中來進行。作為烷

化劑，可能使用上述烷化劑，尤其為鹵代烴，例如鹵代烷。作為起始四級銨鹽，較佳使用低級四烷銨，其中烷基較佳具有 1 到 6 個碳原子。通常，使用四丁基銨玻尿酸鹽。可能藉由使酸性多醣之金屬鹽，較佳上述之一，尤其為鈉或鉀鹽，在具有鹽化磺酸樹脂之水溶液中與四級銨鹼反應來製備該等四級銨鹽。

在近期報導中，使用三甲基矽烷基重氮甲烷 (TMSD, Hirano K, Sakai S, Ishikawa T, Avci F Y, Linhardt R J 及 Toshihiko Toida 2005, Carbohydrate Research 340, 2297) 製備了羧基完全酯化之低分子量玻尿酸之甲基酯。甲基酯係藉由先將玻尿酸之鈉鹽轉化成其酸形式來製備。在該方法中，將玻尿酸溶於水中且施用於 Dowex 50X8 陽離子交換管柱，且收集酸性溶離份且隨後冷凍乾燥。將經製備玻尿酸 (H^+) 溶於 DMSO-甲醇 (20:1) 混合物中。所使用之玻尿酸具有低分子量 (平均分子量 20,000 Da)，以使能在所使用濃度溶於 DMSO 中。將三甲基矽烷基重氮甲烷添加至反應混合物中。反應在室溫下進行 60 分鐘。向所得反應混合物添加乙酸，以移除 TMSD。另外在 $0^{\circ}C$ 下用以無水乙酸鈉飽和之乙醇處理 1 小時。離心反應混合物且將沈澱物溶於水中，且隨後添加乙酸，有力混合且在 1000 g 下離心。將離心後獲得之水層對水透析且冷凍乾燥。所得產物經表徵為玻尿酸之甲基酯。然而，Hirano 及同事所開發之該方法已被應用於低分子量 HA，僅「使其在所使用濃度溶於 DMSO 中」。此外，其需要許多繁瑣步驟來達到

甲基酯以及使用諸如 DMSO 之有毒溶劑。

玻尿酸甲基酯對如玻尿酸酶及甲基酯酶之酶更為穩定。除此之外，新穎化合物之水合性質比天然玻尿酸更好（Hirano K, Sakai S, Ishikawa T, Avci F Y, Linhardt R J 及 Toshihiko Toida 2005, Carbohydrate Research 340, 2297）。

因此，此項技術領域中存在對使用簡單易行之方法製備玻尿酸之甲基酯的需要。又，該等方法應適用於低分子量及高分子量 HA。然而，文獻中已知之方法太複雜及/或涉及一系列步驟來獲得最終化合物。

如先前所討論，重氮甲烷（ CH_2N_2 ）為用於甲基化反應之熟知試劑（Black TH, 1983 Aldrichimica Acta 16, 3），但其具高毒性、熱不穩定性及爆炸性。重氮甲烷之使用具有以下主要缺點：（a）重氮甲烷之製備相當耗時且繁瑣；（b）用於製備重氮甲烷之前驅物為強突變劑且在 EU 中歸為致癌物質；（c）重氮甲烷自身亦為致癌性以及爆炸性，由此使其操作複雜化。當使用重氮甲烷時，不可能控制酯化度，原因在於試劑具有極高揮發性，使得實際上難以量測反應之重氮甲烷之莫耳數，因而導致低再現性。由於實際困難，迄今還未使用重氮甲烷製備偏酯。使用四丁基銨鹽及再用鹵基化合物處理之方法導致涉及許多複雜過程及有毒化學品之使用。

重氮甲烷之缺點可藉由用三甲基矽烷基置換 CH_2N_2 之一個氫來克服。所得安全穩定三甲基矽烷基重氮甲烷（TMSD）最初主要用於分析目的（Hashimoto N, Aoyama T,

Shioiri T, 1981, *Cnem Phatm Bull* 29, 1475)。在開發大規模製備 TMSD 之方法期間，該取代物日益用於合成應用（Shioiri T, Aoyama T, 1993, *Adv Use Synthons Org Chem* 1, 51）。TMSD 由於 C-Si $p\pi-d\pi$ 共振而為熱穩定化合物。其為重氮甲烷之方便替代物且展現重氮甲烷之許多反應，包括與羧酸反應產生甲基酯，及在一碳同系化中，如在阿恩特-埃斯特爾特（Arndt-Eistert）反應中（Aoyama and Shirori, 1980, *Tetrahedron Letters*, 21, 4619），羰基化合物之同系化（Aoyama and Shirori, 1980, *Tetrahedron Letters*, 21,4619；Hashimoto N, Aoyama T, Shirori T, 1981, *Heterocycles*, 15, 975）及羧酸、酚及醇之 O-甲基化。Aoyama 及其同事已成功將其用於先前由重氮甲烷支配之許多反應中。TMSD 化學已由 Shiori 及 Aoyama。（Shiori T, Aoyama T, 1993, in: Dondoni, A. (編), *Advances in the Use of Synthons in Organic Chemistry*, 1, 51-101）評論。藉由與 TMSD 反應所產生之酯甲基之碳係得自帶有重氮基之碳。然而，必須存在甲醇來引起向甲基酯之轉化。其為安全的市售試劑。

Lappert 及 Lorberth 在 1967 報導了 TMSD 之首次製備（Lappert MF, Lorberth J, 1967, *Chem Commun* 16: 836）。然而，此後已公開若干種製備 TMSD 之合成方法。該等方法當中，氯化三甲基矽烷基甲基鎂與二苯基磷醯基疊氮化物（DPPA）之重氮-轉移反應（Shioiri T, Aoyama T, Mori S, 1993, *Org Synth Coll* 第 8 卷: 612）為優選方法，因為該

方法最實用且能進行高產率大規模製備。DPPA 有市售。然而，該前驅物亦可以如 Shioiri 及 Yamada 所述之合成之修飾方式製備 (Shioiri T, Yamada S, 1984, Org Synth 62: 187)。TMSD 之大規模合成之特徵為，極廣泛之純化，接著溶劑系統自 Et_2O 改變至正己烷 (Shioiri T, Aoyama T, Mori S, 1993, Org Synth Coll 第 8 卷: 612)。Presser 及 Hufner 觀察到並非必須轉移為正己烷，因為原始 Et_2O 溶液亦具反應性且可儲存數月而無分解 (Presser A 及 Hufner A, 2004, Monatshefte fur Chemie, 135, 1015)。TMSD 由於其商業可用性及其與甲醇之相容性而成為最有吸引力之試劑。用 TMSD 甲基化與用重氮甲烷相比，更易標準化，因此傳遞更具再現性之結果。

在 Hirano 等人之近期方法中，藉由將低分子量玻尿酸溶於 DMSO 中，接著用 TMSD 處理來製備甲基酯。所得化合物藉由繁瑣的沈澱及萃取法分離。

用於 HA 之甲基酯化及後續純化之已知方法仍費時且複雜。

此項技術領域中存在對用於製備及純化 HA 之甲基酯之簡單方法的需要。

【發明內容】

發明概要

本發明之方法由於所使用酯化試劑之極高反應性而極為快速。使用該簡單快速方法，可在 6 小時內完成酯化。

在本發明之方法中存在很少副產物，且所產生之副產物與先前報導之方案相比，易於移除。在第一方面中，本發明係關於產生玻尿酸之甲基酯之方法，該方法包含之步驟為：

(a) 提供包含於甲醇中之玻尿酸之酸形式的懸浮液；

(b) 向懸浮液添加三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液且混合，藉以產生玻尿酸之甲基酯；及

(c) 回收玻尿酸甲基酯。

【實施方式】

發明之詳細說明

本發明係關於產生玻尿酸之甲基酯之方法，其包含以下步驟：

(a) 提供包含於甲醇中之玻尿酸之酸形式的懸浮液；

(b) 向懸浮液添加三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液且混合，藉以產生玻尿酸之甲基酯；及

(c) 回收玻尿酸甲基酯。

利用本發明方法，HA 可受控制地經甲基酯化，而具有適合不同應用之廣泛範圍之性質。該等應用包括：(i) 局部化妝品調配物，(ii) 高級傳遞系統，諸如用於化妝品、生物醫學及藥物應用之微米及奈米粒子、微米及奈米膠囊、聚合微胞，(iii) 呈各種形式（敷料、薄膜、纖維等）之創口癒合及組織工程化支架結構，及廣泛範圍之其他生物醫學應用。

甲基-酯化 HA 亦可與其他生物聚合物一起組合應用，以改良（例如）其對於技術、生物醫學及藥物應用之乳化性質。

術語「玻尿酸」或「HA」在本文中定義為未經硫酸化葡萄糖胺聚糖，其由藉由交替 β -1,4 及 β -1,3 糖苷鍵連接在一起之 *N*-乙醯葡萄糖胺（GlcNAc）及葡萄糖醛酸（GlcUA）之重複雙糖單元構成，天然存在於細胞表面中，脊椎動物之結締組織之基本細胞外物質中，關節之滑液中，眼睛之球內液體中，人類臍帶組織及雞冠中。玻尿酸（Hyaluronic acid）亦稱之為玻尿酸（hyaluronan）、玻尿酸鹽（hyaluronate）或 HA。術語玻尿酸（hyaluronan）及玻尿酸（hyaluronic acid）可在本文中交替使用。

在本文中應瞭解，術語「玻尿酸」涵蓋具有變化分子量之 *N*-乙醯基-D-葡萄糖胺及 D-葡萄糖醛酸之多糖或甚至其降解部分之群。

本發明描述用於製備 HA 之甲基酯之簡單方法，其避免利用使用四丁基衍生物之冗長方法或使用毒性重氮甲烷，其為即刻製備以用於反應。欲藉由本發明解決之問題為如何在極簡單易行之方法中，可控制地製備玻尿酸之甲基酯。

本發明中使用之 HA 可為任何可用 HA，包括得自包括脊椎動物結締組織在內之天然組織、人類臍帶及得自雞冠之 HA。在一特定具體實例中，玻尿酸或其鹽較佳藉由革蘭氏陽性菌（Gram-positive bacterium）或宿主細胞，更佳

藉由桿菌屬 (genus *Bacillus*) 之細菌重組產生。在另一具體實例中，HA 係自鏈球菌細胞 (*Streptococcus cell*) 獲得。

宿主細胞可為任何適於重組產生玻尿酸之桿菌細胞。桿菌宿主細胞可為野生型桿菌細胞或其突變體。適用於本發明之施行之桿菌細胞包括 (但不限於)，*Bacillus agaraderhens*、嗜鹼芽孢桿菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢桿菌 (*Bacillus brevis*)、環狀芽孢桿菌 (*Bacillus circulans*)、克勞氏芽孢桿菌 (*Bacillus clausii*)、凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*)、堅強芽孢桿菌 (*Bacillus firmus*)、燦爛芽孢桿菌 (*Bacillus lautus*)、緩慢芽胞桿菌 (*Bacillus lentus*)、苔癬桿菌 (*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢桿菌 (*Bacillus megaterium*)、短小芽胞桿菌 (*Bacillus pumilus*)、嗜熱脂肪芽孢桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 及蘇力桿菌 (*Bacillus thuringiensis*) 細胞。尤其適於重組表現之突變枯草桿菌細胞描述於 WO 98/22598 中。非囊封桿菌細胞尤其適用於本發明。

在一較佳具體實例中，桿菌宿主細胞為解澱粉芽孢桿菌、克勞氏芽孢桿菌、緩慢芽胞桿菌、苔癬桿菌、嗜熱脂肪芽孢桿菌或枯草桿菌細胞。在一更佳具體實例中，桿菌細胞為解澱粉芽孢桿菌細胞。在另一更佳具體實例中，桿菌細胞為克勞氏芽孢桿菌細胞。在另一更佳具體實例中，桿菌細胞為緩慢芽胞桿菌細胞。在另一更佳具體實例中，桿菌細胞為苔癬桿菌細胞。在另一更佳具體實例中，桿菌

細胞為枯草桿菌細胞。在一最佳具體實例中，桿菌宿主細胞為枯草桿菌 A164 Δ 5 (參見美國專利第 5,891,701 號) 或枯草桿菌 168 Δ 4。

玻尿酸之平均分子量可使用此項技術領域中之標準方法，諸如藉由 Ueno 等人，1988, Chem. Pharm. Bud. 36, 4971-4975；Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272, 1-40；及 Wyatt Technologies, 1999, “Light Scattering University DAWN Course Manual” 及 “DAWN EOS Manual” Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California 描述之方法來測定。

在一較佳具體實例中，本發明之玻尿酸或其鹽具有約 500 至約 10,000,000 Da 之分子量；較佳為約 10,000 至約 1,500,000 Da。在另一更佳具體實例中，玻尿酸或其鹽具有在約 10,000 與 50,000 Da 之間的平均分子量。在另一更佳具體實例中，玻尿酸或其鹽具有在約 50,000 與 500,000 Da 之間，較佳在約 80,000 與 300,000 Da 之間的平均分子量。在另一更佳具體實例中，玻尿酸或其鹽具有在約 500,000 與 1,500,000 Da 之間的平均分子量；或較佳在約 750,000 與 1,000,000 Da 之間的平均分子量。

在本發明之方法中，所使用之三甲基矽烷基重氮甲烷可為任何可用三甲基矽烷基重氮甲烷，TMSD，TMSD 之結構如圖 3 所示。TMSD 為在阿恩特-埃斯特爾特 (Arndt-Eistert) 合成及羰基化合物之同系化中，高毒性及爆炸性重氮甲烷之穩定安全取代物。其與羧酸在含有甲醇之溶液

中平穩反應，以得到良好產率之相應甲基酯。其為市售且比使用重氮甲烷安全得多。TMSD 為綠黃色液體，在烴熔液中穩定（Dietmar Seyferth 等人，1972, Journal of Organometallic Chemistry 44, 279）。已提出 TMSD 與羧酸之反應係藉由顯著不同於重氮甲烷與羧酸者之反應機制發生。該反應必須有甲醇存在，以得到良好產率之所要甲基酯（圖 4）。

所得甲基酯中質子之一來源於重氮甲烷衍生物，一個來自甲醇且剩餘一個為來自羧酸之捐贈酸性質子。

在本發明之方法中，HA 根據圖 5 中所示之反應與 TMSD 反應。

在本發明一特定具體實例中，a) 之水溶液係藉由將玻尿酸之鈉鹽轉化成其酸形式來製備。在該方法中，將玻尿酸溶於水中並施用於陽離子交換管柱，且收集酸性溶離份（ HA H^+ ）並接著冷凍乾燥。

在本發明之另一特定具體實例中，將玻尿酸之酸形式懸浮於質子或非質子性溶劑中。所選溶劑較佳為低沸點可混溶液體。低沸點可混溶液體可選自由以下者組成之群：乙醚、甲醇、二氯甲烷、四氫呋喃、二噁烷、二甲亞砜、二甲基甲醯胺、二甲基乙醯胺等。在本發明之一更特定具體實例中，反應之溶劑可較佳具有甲醇以作為反應期間之組分之一。

在本發明之一較佳具體實例中，將 TMSD 提供於包含乙醚或己烷之三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液中。

在本發明之一特定具體實例中，在將 HA 懸浮於反應混合物中之後，使反應之溫度降低至約 0°C 至 5°C，且在反應期間保持在 0°C 與 25°C 之間以避免 TMSD 蒸發。在本發明之一更特定具體實例中，反應溫度在反應期間保持在 0°C 與 5°C 之間。在第一方面之一較佳具體實例中，在添加有機溶液之前，包含於甲醇中之玻尿酸之酸形式的懸浮液具有在 -20°C 至 20°C 之範圍內，較佳在 -10°C 至 10°C 之範圍內，更佳在 -5°C 至 5°C 之範圍內且最佳在 0°C 至 5°C 之範圍內之溫度。

為達成反應，將酯化試劑添加至反應混合物中。酯化劑添加完成後，攪拌液體反應混合物以確保完全反應。一較佳具體實例係關於第一方面之方法，其中在攪拌懸浮液的同時，將三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液添加至懸浮液中。

另一較佳具體實例亦係關於第一方面之方法，其中藉由攪拌進行混合。較佳地，混合持續至少 5 分鐘，較佳為至少 10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、1 小時、2 小時、3 小時、4 小時、5 小時、6 小時、7 小時、8 小時、9 小時、10 小時、11 小時或最佳為至少 12 小時。

在另一較佳具體實例中，混合係在 -20°C 至 20°C 之範圍內，較佳在 -10°C 至 10°C 之範圍內，更佳在 -5°C 至 5°C 之範圍內且最佳在 0°C 至 5°C 之範圍內之溫度下進行。

本發明之一較佳具體實例係關於第一方面之方法，其中混合物中玻尿酸與三甲基矽烷基重氮甲烷之莫耳濃度比

率係在 1:0.01 至 1:100 之範圍內，較佳在 1:0.05 至 1:50 之範圍內，且最佳在 1:0.1 至 1:10 之範圍內。混合物中之 HA-TMSD 莫耳濃度比率最佳在 1:0.5 與 1:4 之間的範圍內。在一較佳具體實例中，用 125 μL 之 TMSD (於乙醚中之 2M 溶液，0.25 mmol)，以大致 1:1 之比率處理 100 mg 之於含有甲醇之溶劑中的 HA (0.25 mmol)，產生 HA 之約 50% 酯化。在另一較佳具體實例中，用更高量之酯化試劑 (250 μL)，以 1:2 之比率處理相同濃度之 HA (0.25 mmol)，產生 HA 之 80% 酯化。在一更佳具體實例中，用 500 μL 之 TMSD，以大致 1:4 之比率處理 0.125 mmol 之 HA，產生 HA 之 100% 酯化。

反應完成後，分離酯化 HA 產物，較佳地玻尿酸甲基酯藉由過濾回收；較佳地，用至少一體積之一或多種有機溶劑，較佳用甲醇及/或乙醚，將包含玻尿酸甲基酯之所得固體過濾物洗滌至少一次，較佳洗滌至少兩次；更佳地，將包含玻尿酸甲基酯之經洗滌固體過濾物乾燥、透析且冷凍乾燥。

為了純化衍生產物，將其離心，且用諸如乙醇、甲醇或丙酮之溶劑洗滌。產物可經透析以提供實質上純的甲基化 HA 產物。

酯化 HA 可 (例如) 藉由冷凍乾燥或藉由噴霧乾燥調配成乾粉。

在一特定具體實例中，本發明揭示具有如圖 6 所示之結構之甲基酯化 HA。

甲基酯化 HA 產物可藉由質子 NMR 表徵。酯化度或取代度 (DS, 以 % 計) 係由甲基酯質子 3.84 ppm (3H) 與玻尿酸之 N-乙醯基質子 (-NHCOCH₃, 3H, 2.0 ppm) 之積分值來確定。

本文中所述及主張之本發明的範疇不欲受所揭示之特定具體實例或實例所限制, 因為該等具體實例或實例欲主要作為本發明之說明。任何等價方面欲在本發明之範疇內。當然, 除本文中所示及所述者外, 本發明之各種修改對熟習此項技術者而言, 將自本文中之描述及實例而變得明顯。該等修改亦欲落在附加申請專利範圍之範疇內。

實施例

實施例 1

中等分子量玻尿酸 (750,000-1,000,000 道爾頓) 藉由通過陽離子交換樹脂 (Dowex 50 WX8-200) 而轉化成 H⁺ 形式。在冷凍乾燥機中將其冷凍乾燥。

在室溫下 (20°C) 下, 將所得產物 (50 mg, 0.125 mmol) 懸浮於甲醇 (10 mL) 中。隨後, 將反應混合物之溫度降低至 0°C。向上述反應混合物添加新鮮製備之重氮甲烷之醚溶液 (10 mL)。在低溫 (0-5°C) 下, 在攪拌下進行反應。玻尿酸與重氮甲烷之莫耳濃度比率為 1:8。4 h 後, 過濾反應混合物。用甲醇 (3×50 mL) 及乙醚 (3×50 mL) 洗滌。真空乾燥所得固體。將其溶於去離子水中且冷凍乾燥。產物之產率為 >90% (47 mg)。所得產物之取代度 (degree of substitution, DS) 為 1.0。

實施例 2

中等分子量玻尿酸 (750,000-1,000,000 道爾頓) 藉由通過陽離子交換樹脂 (Dowex 50 WX8-200) 而轉化成 H^+ 形式。在冷凍乾燥機中將其冷凍乾燥。

在室溫下 ($20^{\circ}C$) 下，將所得產物 (100 mg, 0.25 mmol) 懸浮於甲醇 (10 mL) 中。隨後，將反應混合物之溫度降低至 $0^{\circ}C$ 。向上述反應混合物，添加三甲基矽烷基重氮甲烷之醚溶液 (125 μ l, 0.25 mmol)。在低溫 ($0-5^{\circ}C$) 下，在攪拌下進行反應。玻尿酸與 TMSD 之莫耳濃度比率為 1:1。6 h 後，過濾反應混合物。用有機溶劑，即甲醇及乙醚 (各 3×50 mL) 洗滌。乾燥所得固體。將其透析且冷凍乾燥。產物之產率為 $>90\%$ (93 mg)。所獲得 DS 為約 0.5。

實施例 3

中等分子量玻尿酸 (750,000-1,000,000 道爾頓) 藉由用 0.6 N 乙醇 HCl 處理轉化成 H^+ 形式。在冷凍乾燥機中將其冷凍乾燥。

將所得產物 (100 mg, 0.25 mmol) 懸浮於甲醇 (10 mL) 中。隨後，將反應混合物之溫度降低至 $0^{\circ}C$ 。將 TMSD 之醚溶液之部分 (125 μ l, 0.25 mmol) 添加至上述反應混合物中。在低溫 ($0-5^{\circ}C$) 下，在攪拌下進行反應。玻尿酸與 TMSD 之莫耳濃度比率為 1:1。6 h 後，過濾反應混合物。用有機溶劑，即甲醇及乙醚洗滌。將所得固體乾燥、透析且冷凍乾燥。產物之產率為 $>90\%$ (94 mg)。所獲得 DS 為約 0.5。

使用上述方法，藉由用變化莫耳量之 TMSD 處理獲得具有變化酯化百分比之不同甲基酯化玻尿酸衍生物。酯化%係藉由比較在 2.02 (3H, -NHCOCH₃) 及 3.84 (玻尿酸之甲基酯之質子) 處之信號來計算。經修飾產物之產率為 >90%。

實施例 4

¹H NMR (Varian-300) 用以測定酯化玻尿酸 (於 D₂O 中) 之最終官能度及純度。²H₂O 用作分析溶劑且在 4.79 ppm 處之 ²HOH 峰用作參考線。甲基酯化玻尿酸之質子-NMR 在 3.84 ppm 處展現銳峰。修飾程度係由甲基酯與玻尿酸之 N-乙醯基質子 (-NHCOCH₃, 3H, 2.0 ppm) 之相對積分確定。

具有不同酯化度之甲基酯藉由如早先所討論，改變 HA-TMSD 莫耳濃度比率 (1:0.5 至 1:4) 而獲得。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示根據本發明之酯化玻尿酸之分子結構。

圖 2 顯示 HA 之鈉鹽之結構式。

圖 3 顯示三甲基矽烷基重氮甲烷或 TMSD 之結構。

圖 4 顯示 TMSD 與羧酸在含有甲醇之溶液中之反應流程，其產生良好產率之相應甲基酯。

圖 5 顯示，根據本發明，HA 與 TMSD 在含有甲醇之溶液中之反應流程。

圖 6 顯示根據本發明之甲基酯化 HA 之結構。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種產生玻尿酸之甲基酯之方法，該方法包含之步驟為：

- (a) 提供包含於甲醇中之玻尿酸之酸形式的懸浮液；
- (b) 向該懸浮液添加三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液且混合，藉以產生玻尿酸之甲基酯；及
- (c) 回收該玻尿酸甲基酯。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to a method of producing methyl esters of a hyaluronic acid, said method comprising the steps of:

- (a) providing a suspension comprising the acid form of the hyaluronic acid in methanol;
- (b) adding an organic solution of trimethylsilyldiazomethane to the suspension and mixing, whereby methyl esters of hyaluronic acid are produced; and
- (c) recovering the hyaluronic acid methyl esters.

十、申請專利範圍：

1. 一種產生玻尿酸之甲基酯之方法，該方法包含之步驟為：

(a) 提供包含於甲醇中之該玻尿酸之酸形式的懸浮液；

(b) 向該懸浮液添加三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液且混合，藉以產生玻尿酸之甲基酯；及

(c) 回收該玻尿酸甲基酯。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該玻尿酸具有在 500 與 10,000,000 Da 之間的平均分子量；較佳為在 10,000 與 1,500,000 Da 之間的平均分子量。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該玻尿酸具有在 10,000 與 50,000 Da 之間的平均分子量。

4. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該玻尿酸具有在 50,000 與 500,000 Da 之間，較佳為在 80,000 與 300,000 Da 之間的平均分子量。

5. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該玻尿酸具有在 500,000 與 1,500,000 Da 之間的平均分子量；較佳為在 750,000 與 1,000,000 Da 之間的平均分子量。

6. 如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中該三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液包含乙醚或己烷。

7. 如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中該混合物中玻尿酸與三甲基矽烷基重氮甲烷之莫耳濃度比率在 1:0.01 至 1:100 之範圍內，較佳在 1:0.05 至 1:50 之範圍

內，且最佳在 1:0.1 至 1:10 之範圍內。

8.如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中在添加該有機溶液之前，該包含於甲醇中之該玻尿酸之酸形式的懸浮液具有在 -20°C 至 20°C 之範圍內，較佳在 -10°C 至 10°C 之範圍內，更佳在 -5°C 至 5°C 之範圍內，且最佳在 0°C 至 5°C 之範圍內之溫度。

9.如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中在攪拌該懸浮液的同時，向該懸浮液添加該三甲基矽烷基重氮甲烷之有機溶液。

10.如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中藉由攪拌進行該混合。

11.如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中該混合持續至少 5 分鐘，較佳為至少 10 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、1 小時、2 小時、3 小時、4 小時、5 小時、6 小時、7 小時、8 小時、9 小時、10 小時、11 小時，或最佳為至少 12 小時。

12.如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中該混合係在 -20°C 至 20°C 之範圍內，較佳在 -10°C 至 10°C 之範圍內，更佳在 -5°C 至 5°C 之範圍內，且最佳在 0°C 至 5°C 之範圍內之溫度下進行。

13.如申請專利範圍第 1-5 項中任一項之方法，其中藉由過濾回收該玻尿酸甲基酯。

14.如申請專利範圍第 13 項之方法，其中用至少一體積之一或多種有機溶劑，較佳用甲醇及/或乙醚，將包含玻

尿酸甲基酯之該固體過濾物洗滌至少一次，較佳洗滌至少兩次。

15.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中將包含玻尿酸甲基酯之經洗滌固體過濾物乾燥、透析且冷凍乾燥。

十一、圖式：

如次頁

尿酸甲基酯之該固體過濾物洗滌至少一次，較佳洗滌至少兩次。

15.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中將包含玻尿酸甲基酯之經洗滌固體過濾物乾燥、透析且冷凍乾燥。

十一、圖式：

如次頁

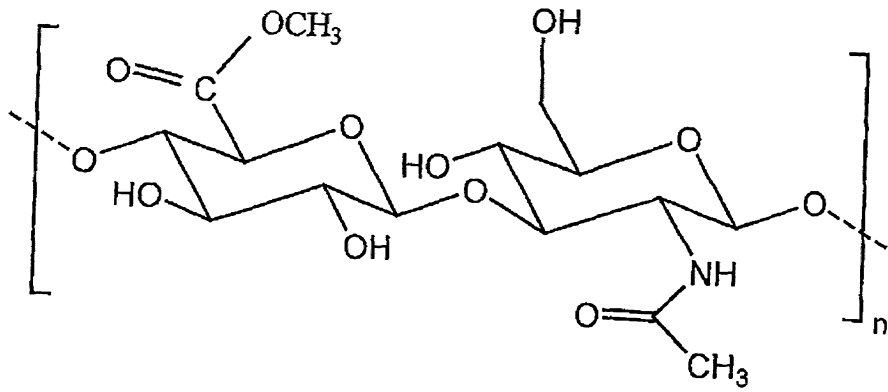


圖1

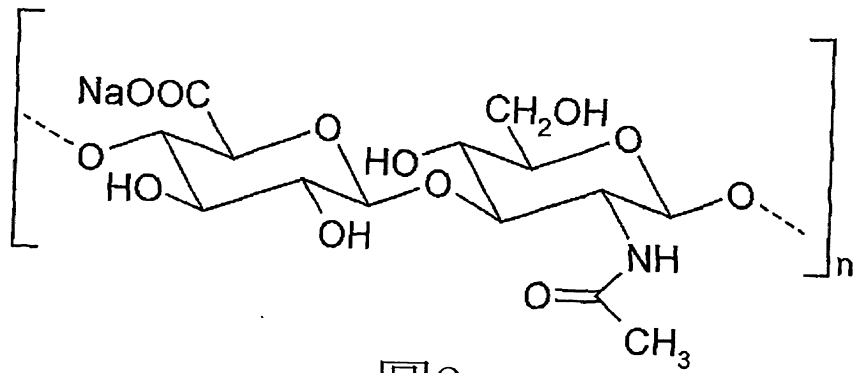


圖2

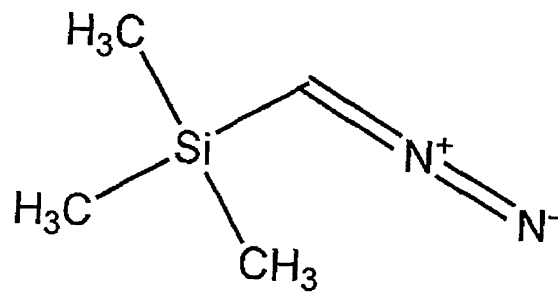


圖3

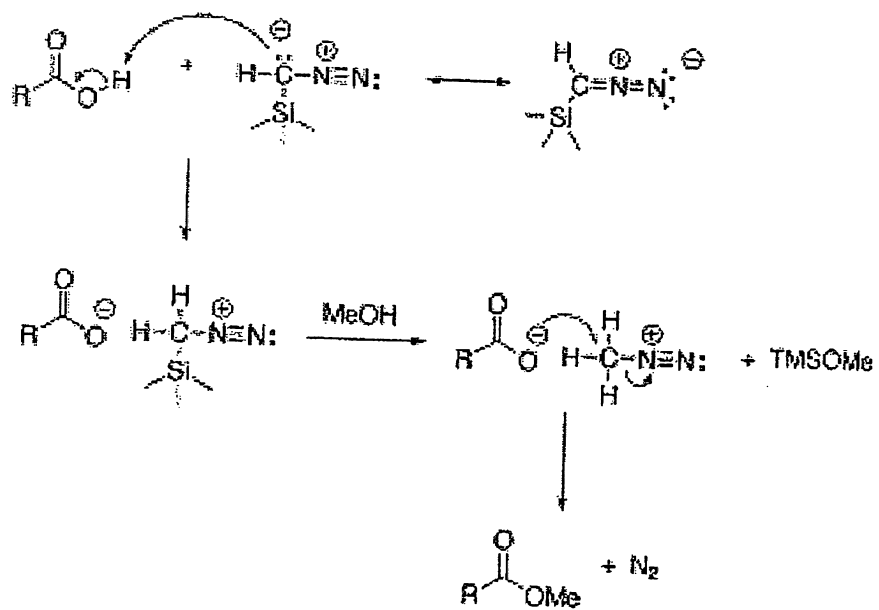


圖4

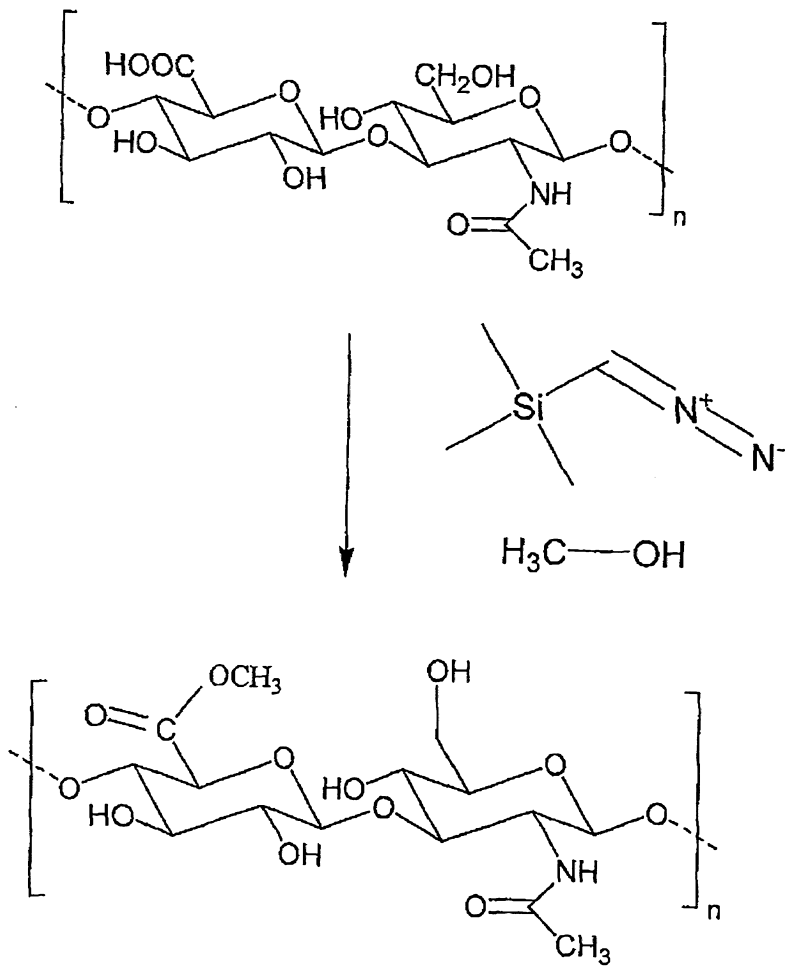


圖5

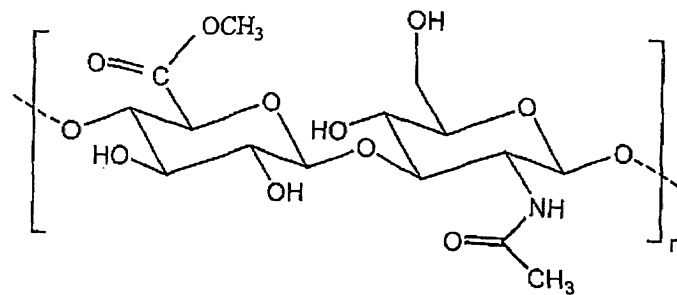


圖6

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無