(19)日本国特許庁(JP)　(12)特 許 公 報(B2)　(11)特許番号
特許第6980974号
(P6980974)

(45)発行日　令和3年12月15日(2021.12.15)　(24)登録日　令和3年11月22日(2021.11.22)

(51)Int.Cl.			F I		
C12P	19/04	(2006.01)	C12P	19/04	C
C08B	37/08	(2006.01)	C08B	37/08	Z
A61K	31/728	(2006.01)	A61K	31/728	
A61P	19/02	(2006.01)	A61P	19/02	
A61P	19/00	(2006.01)	A61P	19/00	

請求項の数 15　(全 22 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-504949(P2019-504949)
(86)(22)出願日　平成29年7月27日(2017.7.27)
(65)公表番号　特表2019-528055(P2019-528055A)
(43)公表日　令和1年10月10日(2019.10.10)
(86)国際出願番号　PCT/IB2017/054577
(87)国際公開番号　WO2018/020458
(87)国際公開日　平成30年2月1日(2018.2.1)
審査請求日　令和2年4月7日(2020.4.7)
(31)優先権主張番号　102016000079633
(32)優先日　平成28年7月28日(2016.7.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
イタリア(IT)

前置審査

(73)特許権者　519027682
フィディア　ファーマチェウティチ　エス．ピー．エー．
イタリア国　アイ－３５０３１　パドヴァ　アーバノ　テルメ　ヴィア　ポンテ　デッラ　ファッブリカ　３／エー
(74)代理人　100079049
弁理士　中島　淳
(72)発明者　ピッタレッロ、　マーラ
イタリア国　アイ－３５０３１　パドヴァ　アーバノ　テルメ　ヴィア　ポンテ　デッラ　ファッブリカ　３／エー　フィディア　ファーマチェウティチ　エス．ピー．エー．内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒアルロン酸のナトリウム塩の調製及び精製プロセス

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の工程を含む、ストレプトコッカス属菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）の発酵ブロス若しくはバチルス属菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）の発酵ブロスから、又は雄鶏のとさかから、ヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するためのプロセス：
Ｂ．以下の工程を含む抽出：
Ｂ１．未精製ヒアルロン酸を含有するブロスにセライトを添加して、撹拌しながら少なくとも３０分間ヒアルロン酸と塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）とを錯体化させ、その後少なくとも３０分間沈殿させること；
Ｂ２．工程Ｂ１で形成された液相を除去すること；
Ｂ３．固相中に存在するヒアルロン酸をＮａＣｌの水溶液中で可溶化し、ヒアルロン酸のナトリウム塩として第１の抽出物を回収すること、ここで、この手順Ｂ３は１回～４回実施される；
Ｂ４．工程Ｂ３から得られる前記抽出物同士を合体させること；
Ｂ５．２００オングストローム～３００オングストロームの範囲の細孔半径を有する芳香族樹脂を、Ｂ４で合体させられた前記抽出物に添加し、少なくとも８時間撹拌下に放置すること、ここで前記芳香族樹脂は架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂が好ましい；
Ｂ６．工程Ｂ５から得られる混合物を濾過すること；
Ｃ．以下の工程を含む精製：

　Ｃ１．工程Ｂ６から得られる濾液にＮａＯＨ水溶液を添加すること；
　Ｃ２．８～９の範囲のｐＨに、好ましくはＨＣｌで、中和すること；
　Ｃ３．少なくとも１回、濾過すること；
　Ｃ４．エタノールで、工程Ｃ３で得られたヒアルロン酸のナトリウム塩の沈殿及び少なくとも１回の洗浄を行い、有機溶媒、好ましくはアセトン中で、最終洗浄すること；
　Ｃ５．ヒアルロン酸のナトリウム塩を、好ましくは２５℃～４０℃で１５時間以上、真空下で乾燥させること。
【請求項２】
　以下の工程を含む前記ブロスの不活性化工程である先行初期工程Ａを含み、ストレプトコッカス属菌又はバチルス属菌の発酵ブロスからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する、請求項１に記載のプロセス：
　Ａ１．前記ブロスをｐＨ４～５に、好ましくはＨＣｌで、酸性化すること；
　Ａ２．少なくとも一回の濾過により、ストレプトコッカス属菌由来のバイオマス又はバチルス属菌由来のバイオマスを除去すること；
　Ａ３．６．５～７．５の範囲のｐＨに、好ましくはＮａＯＨで、中和すること。
【請求項３】
　前記不活性化段階が、高粘度、中粘度又は低粘度のヒアルロン酸を製造するために加熱によって前記ブロスを熱処理することを含む、請求項２に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【請求項４】
　１７ｄｌ／ｇ～２４ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、ブロスの温度を６０℃プラスマイナス５℃まで５分間～４０分間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は６５℃で５分間～３０分間実施される、請求項３に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【請求項５】
　１０ｄｌ／ｇ～１５ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、ブロスの温度を７０℃プラスマイナス５℃まで５分間～４０分間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は７０℃で５分間～３０分間実施される、請求項３に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【請求項６】
　３ｄｌ／ｇ～６ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、ブロスの温度を９０℃プラスマイナス５℃まで１５０分間～３００分間上昇させることによって前記熱処理が実施される、請求項３に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を製造及び精製するプロセス。
【請求項７】
　高粘度、中粘度又は低粘度のヒアルロン酸を製造するため、前記抽出工程に先立って、加熱及び同時に行われる酵素消化によって雄鶏のとさかのホモジネートを熱処理する、雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する請求項１に記載のプロセス。
【請求項８】
　１７ｄｌ／ｇ～２４ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を調製するために、温度を５０℃～６０℃に２６時間～３０時間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は５５℃で２８時間実施される、請求項７に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【請求項９】
　１０ｄｌ／ｇ～１５ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を調製するために、温度を６０℃～６５℃に２８時間～３０時間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は６０℃で３０時間実施され

る、請求項７に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【請求項１０】
　３ｄｌ／ｇ～６ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、温度を６５℃～７０℃に４６時間～５０時間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は６５℃で４８時間実施される、請求項７に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【請求項１１】
　前記精製工程Ｃに先立って、前記抽出工程Ｂで得られたヒアルロン酸のナトリウム塩をエタノール中で沈殿し、溶媒を除去し、精製水中で沈殿を可溶化する、雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する請求項１又は請求項７～請求項１０のいずれか１項に記載のプロセス。
【請求項１２】
　以下の工程を含み、ストレプトコッカス属菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｕｓ）の発酵ブロス又はバチルス属菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）の発酵ブロスからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する、請求項１又は請求項２に記載のプロセス：
Ａ．以下の工程を含む前記ブロスの不活性化：
　Ａ１．前記ブロスをｐＨ４～５に、好ましくは１ＮのＨＣｌで、酸性化すること；
　Ａ２．撹拌下で前記ブロスを熱処理するか、又はしないこと；
　Ａ３．ブロス１Ｌあたり２０ｇ～６０ｇのセライトパッドで濾過することにより、ストレプトコッカス属菌又はバチルス属菌に由来するバイオマスを除去すること、ここで、好ましくは前記セライトパッドがブロス１Ｌあたり３０ｇ～４０ｇであり、濾過粒度０．５μｍのフィルターを用いた濾過が行われるか又は行われず、好ましくは前記フィルターはポリプロピレンフィルターである；
　Ａ４．６．５～７．５のｐＨに、好ましくは２０％のＮａＯＨ水溶液で、中和すること；
Ｂ．以下の工程を含む抽出：
　Ｂ１．工程Ａ３から得られる濾液にブロス１Ｌあたり２０ｇ～６０ｇの量のセライトを添加し、撹拌しながら少なくとも３０分間、４ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、好ましくは５ｇ／Ｌ～１５ｇ／Ｌの塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）と錯体化させ、その後少なくとも３０分間沈殿させること；
　Ｂ２．液相を除去すること；
　Ｂ３．４時間～２４時間攪拌しながら固相中に存在するヒアルロン酸を０．３ＭのＮａＣｌ水溶液中で可溶化し、濾過粒度３μｍのフィルターによって濾過し、ヒアルロン酸のナトリウム塩として第１の抽出物を回収すること、ここで、この手順Ｂ３は１回～４回実施される；
　Ｂ４．前記抽出物同士を合体させること；
　Ｂ５．２００オングストローム～３００オングストロームの範囲の気孔半径を有する芳香族樹脂を、抽出物１リットルあたり１０ｇ～６０ｇの量で、Ｂ４で合体させられた前記抽出物に添加し、少なくとも８時間撹拌下に放置すること、ここで前記芳香族樹脂は架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂が好ましい；
　Ｂ６．濾過布を用いて濾過を行うこと、ここで、さらに濾過粒度３μｍのフィルターを用いて濾過を行うか行わず、好ましくは前記フィルターはポリプロピレンフィルターである；
Ｃ．以下の工程を含む精製：
　Ｃ１．撹拌しながら、工程Ｂ６から得られる濾液に０．２Ｍ～０．４ＭのＮａＯＨ水溶液を添加すること；
　Ｃ２．８～９の範囲のｐＨに、好ましくはＨＣｌで、中和すること；
　Ｃ３．濾過すること、ここで、３μｍに等しい濾過粒度が好ましく、ポリプロピレンフィルターがより好ましい；
　Ｃ４．エタノールで、工程Ｃ３から得られるヒアルロン酸のナトリウム塩の沈殿及び少

なくとも１回の洗浄を行い、有機溶媒中、好ましくはアセトン中で、最終洗浄すること；
　Ｃ５．当業者に知られているように、ヒアルロン酸のナトリウム塩を、真空下で乾燥させること、ここで前記乾燥は好ましくは２５℃～４０℃で１５時間以上行う。
【請求項１３】
　以下の工程を含み、高粘度又は中粘度又は低粘度のヒアルロン酸を製造するために、前記抽出工程Ｂに先立って、加熱及び同時に行われる酵素消化によってとさかのホモジネートを熱処理する、雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する請求項１に記載のプロセス：
Ｂ．以下の工程を含む抽出：
　Ｂ１．酵素消化ホモジネートに、前記酵素ホモジネート１Ｌあたり２０ｇ～６０ｇの量のセライトを添加し、撹拌しながら少なくとも３０分間、４ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、好ましくは５ｇ／Ｌ～１５ｇ／ＬのＣＰＣと錯体化させ、その後少なくとも３０分間沈殿させること；
　Ｂ２．液相を除去すること；
　Ｂ３．固相中に存在するヒアルロン酸を０．３ＭのＮａＣｌ水溶液中で攪拌しながら４時間～２４時間で可溶化し、濾過粒度３μｍのフィルターによって濾過し、ヒアルロン酸のナトリウム塩として第１の抽出物を回収すること、ここで、この手順Ｂ３は１回～４回実施される；
　Ｂ４．工程Ｂ３から得られる前記抽出物同士を合体させること；
　Ｂ５．２００オングストローム～３００オングストロームの範囲の気孔半径を有する芳香族樹脂を、抽出物１リットルあたり１０ｇ～６０ｇの量で、Ｂ４で合体させられた前記抽出物に添加し、少なくとも８時間撹拌下に放置すること、ここで前記芳香族樹脂は架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂が好ましい；
　Ｂ６．濾過布を用いて濾過を行うこと、ここで、さらに濾過粒度３μｍのフィルターを用いて濾過を行うか行わず、好ましくは前記フィルターはポリプロピレンフィルターである；
Ｃ．以下の工程を含む精製：
　Ｃ１．撹拌しながら、工程Ｂ６から得られる濾液に０．２Ｍ～０．４ＭのＮａＯＨ水溶液を添加すること；
　Ｃ２．８～９の範囲のｐＨに、好ましくはＨＣｌで、中和すること；
　Ｃ３．濾過すること、ここで、３μｍに等しい濾過粒度が好ましく、好ましくはポリプロピレンフィルターが用いられる；
　Ｃ４．エタノールで、工程Ｃ３から得られるヒアルロン酸のナトリウム塩の沈殿及び少なくとも１回の洗浄を行い、有機溶媒中、好ましくはアセトン中で、最終洗浄すること；
　Ｃ５．ヒアルロン酸のナトリウム塩を、好ましくは２５℃～４０℃で１５時間以上、真空下で乾燥させること。
【請求項１４】
　前記精製工程Ｃに先立って、前記抽出工程Ｂで得られたヒアルロン酸のナトリウム塩をエタノール中で沈殿し、溶媒を除去し、精製水中で沈殿を可溶化する、請求項１３に記載の雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【請求項１５】
　収率が７５％～９０％の範囲にあり、得られるヒアルロン酸のナトリウム塩において、タンパク質の総量の最大値が０．０５％であり、毒素の最大値がエンドトキシン０．０２ＩＵ／ｍｇである、請求項１～請求項１４のいずれか１項に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ヒアルロン酸のナトリウム塩の調製及び精製プロセスに関する。
【背景技術】

【０００２】
ヒアルロン酸（ＨＡ）は、Ｄ－グルクロン酸及びＮ－アセチル－Ｄ－グルコサミンの残基を交互に含んでなる、硫酸基を含まない高分子量の線状アニオン性多糖である。
自然界では、ＨＡは細胞周囲のゲル、脊椎動物の結合組織の基本物質（の主要成分の１つである）、関節の滑液、硝子体液、及び臍帯に存在する。
ＨＡは、生物学的生物において、とりわけ、皮膚、腱、筋肉及び軟骨などの多数の組織の細胞の機械的支持として重要な役割を果たしている。
【０００３】
ＨＡはその膜受容体、特にＣＤ４４、ＣＤ５４及びＣＤ１６８を介して、例えば、増殖、移動、細胞分化及び血管新生など、細胞の生理学及び生物学に関連する多くの異なるプロセスを調節し、また、組織の水和及び関節の潤滑など、その他の機能をも発揮することも知られている。ＨＡは絶対的に生体適合性であり、その多数の特殊な特徴により、組織修復から粘性付加療法（ｖｉｓｃｏｕｓ　ａｄｄｉｔｉｏｎａｌ　ｔｈｅｒａｐｙ）、皮膚美容医学から眼内手術、組織工学から細胞療法、及びそれ以上の、様々な分野で広く使用されている。
【０００４】
ＨＡの物理化学的特徴及び生物学的特徴はその分子量（ＭＷ）と強く相関しており、これは極めて可変的である。　一般にＨＡの質量平均分子量は約２０，０００～１３×１０^{6}Ｄａである。この「約」は、該分子量がＨＡの単離に用いる発生源及び製造及び浄化法との関係で根本的に変動することから、必須である。
【０００５】
ＨＡを得るには基本的に２つの主な方法がある。
【０００６】
動物由来の産生：　歴史的には、ＨＡは、臍帯、硝子体液、又はウシ滑液などの動物組織、とりわけ、雄鶏のとさか（ｒｏｏｓｔｅｒ　ｃｏｍｂ）から抽出されている。動物源からのＨＡの製造には多くの制約がある。例えば、（出発組織の消化後の有機残渣の塊から出発して）様々な種類の不純物を除去するには、多くの濾過段階（ｐａｓｓａｇｅ）が必要であるため、費用がかかる。出発材料中に存在する可能性のある任意の汚染物質（ウイルスなど）の不活化及び除去を確実にする濾過段階が必要であることから、かなりの量の原料を入手可能である必要があり、大きな収率をもたらさない。
【０００７】
微生物の培養：　ある種の微生物、特にＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ又はＰａｓｔｅｕｒｅｌｌａ属の微生物は、適切に刺激及び／又は改変されると、ＨＡを産生することができ、このＨＡは、発酵ブロス中に分泌されて、当業者に公知の種々の方法によって単離される。また、この場合、例えば、使用された微生物の細胞壁の残渣、金属イオン、核酸、及び任意の他の望ましくないタンパク質様物質などの、存在する「不純物」を除去するために、多数の濾過段階が必要である。これらの制限にもかかわらず、この方法は、今日まで、最も開発され、広く使用されているＨＡの製造方法である。バイオテクノロジーを介したＨＡの産生のための新しい方法が研究されており、これはある種のＢａｃｉｌｌｕｓ（Ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ及びＳｉｂｔｉｌｉｓ）やＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉなどの適切な宿主細胞において、酵素であるＨＡシンターゼを発現する遺伝子をトランスフェクションすることによるものである。しかし、これらの製造方法においても、潜在的に有害な残留物を除去するのに適した全ての手順が必要である。
【０００８】
いずれにせよ、使用される方法にかかわらず、ＨＡの製造における重要な濾過段階は、明らかに多糖類の抽出及び精製の段階である。既知の方法は多数あり、極めて明瞭であり、ＨＡを得るための出発源に応じて明らかに調節されている。第一に、供給源の残渣を除去しなければならず、その結果として、動物組織からの抽出では、タンパク質を消化する段階、その後の濾過、遠心分離及び洗浄が行われ、培養では、遠心分離及び漸進的洗浄が通常使用される。いずれの場合も、液体画分が得られ、そこから多糖類が単離される。この

点に関して、最もよく知られ、そして確実に最も広範に適用される工程は、とりわけ、動物源からのＨＡについては、溶媒による沈殿である。要するに、上記の液状画分に対しての有機溶媒（エタノール、アセトン）を、濃度を漸増しながら適用して、ヒアルロン酸を沈殿させ、その後の可溶化及び沈殿の手段により精製する。

【０００９】
別のシステムでは、多糖類を錯化して沈殿させる目的で、第四級塩、セチルピリジニウム又はセチルトリメチルアンモニウムの使用を想定する。その後、最終生成物を得る前に、可溶化及び沈殿が再び必要となる。

【００１０】
技術の開発がなされてさらに、収率の点からプロセスを効率化し、純度の点から有効となるよう、上述の主要なステップが組み合わされた。しかしながら、今日まで、特にＨＡに基づく注射用医薬組成物の投与後に生じた有害事象が、依然として数百件のオーダーで所管官庁（ＦＤＡなど）に報告されている。

【００１１】
この多糖類は、保湿作用を有する化粧品用途（局所又は経口投与による）から、鎮静効果を有する局所皮膚化粧品用途まで、しわ又は瘢痕のいずれの皮膚欠損（皮内）を矯正するための注射デバイスから、骨及び関節疾患における関節内使用、又は硝子体液の代替物としての眼内使用などのより厳密な薬理学的用途まで、多種多様な分野及び病理において使用される。

【００１２】
損傷した組織を伴わない美容用途では、化粧品グレードのＨＡ（低純度）で十分であるが、注射可能医薬品の用途（特に、関節及び眼などの閉鎖腔内）の場合には、ある程度の絶対純度が必要であることは明らかである。核酸、タンパク質、及び／又は、リポテイコ酸ＬＴＡなどグラム陽性菌（例えば、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ及びＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ属）の細胞壁の残留細菌毒素、又はリポ多糖ＬＰＳなどグラム陰性菌（例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　Ｃｏｌｉ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ及びＳａｌｍｏｎｅｌｌａ）の細胞壁の残留細菌毒素等の様々なタイプの汚染物質の存在は、局所レベル及び全身レベルの両方でサイトカイン（特に、ＴＮＦ及びＩＬ－１）の放出を伴う顕著な炎症反応を引き起こし得、これは生物体全体の反響を伴う全身性炎症反応を引き起こし得、（最も深刻な場合においては）敗血症性ショックの形態に到達し得る。これは上記で引用された多くの有害事象の報告を説明する。実際、ＬＴＡ及びＬＰＳは、強力な免疫応答を引き起こし得る、脂質部分及び糖部分からなるポリマーであり、最も重篤な場合、関節炎、腎炎、髄膜炎、又は致命的でさえあり得る結果を伴う発熱及びショックを引き起こし得る。

【００１３】
また、前述したように、ＨＡのＭＷが供給源及び製造方法によって変動することも考慮に入れる必要がある。より具体的には、本明細書において示されるＭＷは、「固有粘度」法で測定される重量平均分子量を指す。ＭＷの変動性（ｖａｒｉａｂｉｌｉｔｙ）は、異なる分野におけるＨＡの使用を規定する。例えば、低ＭＷのものは皮膚科又は皮膚美容製剤（約２００ｋＤＡ；Ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｉｎｅ　（登録商標））に適用され、関節内適用では、１５００ｋＤＡを超えるＭＷまでのより高い分子量（通常、７００～１８００ｋＤＡ；Ｈｙａｌｇａｎ（登録商標）、Ｈｙａｌｂｒｉｘ（登録商標）、Ｏｒｔｈｏｖｉｓｃ（登録商標）のものが形成外科又は眼内適用で使用される。ＨＡのＭＷを完全に較正することは、これがポリマーの生物学的及び物理化学的特性を決定するだけでなく、３０，０００Ｄａ未満のＭＷを有するＨＡが用途にかかわらず絶対的に望ましくない強い炎症作用を有することが十分に実証されている（ＥＰＯ１３８５７２）ため、非常に重要である。このことは、ＨＡの製造及び浄化工程において、種々の因子を評価し、制御しなければならないことを意味する。

【００１４】
・プロセス収率：　選択した産生源から最大限可能な量のＨＡを抽出することが基本で

ある。

・精製ステップの集合の精度：得られる製品は、炎症プロセスを誘発する可能性のあるいかなる汚染物も含んではならない。

・ＭＷの分画：　所望のＭＷを有すること及び炎症性画分が除去されていることの確実性がなければならない。

【００１５】

これらの要件を組み合わせる多くの試みが、従来技術において知られている。これらのうち、以下のものを概略的に挙げることができる。

米国特許第５９２５６２６号は、エタノール沈殿及び２つのＭＷ画分（５０～１００ｋＤａ及び５００～７３０ｋＤａ）の形成による、雄鶏のとさかからの、炎症性画分を含まないＨＡの精製を記載する。

ＥＰ５３５２００は、第四級アミンによる塩化とそれに続く溶媒沈殿（エタノール又はアセトン）による、雄鶏のとさかからのＨＡの精製を記載する。７５０～１２３０ｋＤａの範囲のＭＷを有し、炎症性画分を含まず、特に眼科用途を目的とするＨＡが得られる。

米国特許第６４８９４６７号は、ＨＣｌを用いた強制酸性化によるＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓからのＨＡの精製、及びそれに続くｐＨの変動及び透析濾過により、約１７００ｋＤａのＭＷを有するＨＡが得られることを記載する。

Ｃｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ．　Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２０１４、１８、１－１０は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｚｏｏｅｐｉｄｅｍｉｃｕｓから透析濾過及びアセトン沈殿によりＨＡを精製することを記載する。９００～１１００ｋＤａの範囲のＭＷを有するＨＡが得られる。

ＥＰ２８７０２５５は、濾過及び限外濾過、６０～２４００ｋＤａの範囲のＭＷに達するｐＨ変動、及びエタノールでの最終沈殿による、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｚｏｏｅｐｉｄｅｍｉｃｕｓからのＨＡの精製を記載する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１６】

本発明の目的は、汚染物質を含まず非常に高い純度を有し、かつ正確で特定されたＭＷを有するＨＡのナトリウム塩を製造することを可能にする、ＨＡのナトリウム塩の調製及び精製ための新規なプロセスに関する。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

ヒアルロン酸及びそのナトリウム塩の新規な精製プロセスは、連結されかつ連続的である、調製されたＨＡの精製のための、当業者に広く知られた種々の工程を含む。生物学的供給源、特にＧａｌｌｕｓ属の鳥の頭頂部（ＥＰ０１３８５７２、以下、これらの頭頂部は鳥の性別にかかわらず、雄鶏のとさかとして示される）から得られたＨＡ、並びにＢａｃｉｌｌｕｓ　Ｓｕｂｔｉｌｉｓ及びＢａｃｉｌｌｕｓ　Ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍから分子工学技術で調製されたＨＡ（ＥＰ２６１４０８８、ＥＰ２６１４０８７）にも適用可能であるＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓの培養プロセスから得られたＨＡの両方に適用可能である。このプロセスは好ましくはＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓの発酵ブロスから得られたＨＡ、さらにより好ましくはＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｑｕｉ　ｓｕｂ－ｓｐ．ｅｑｕｉ、６８２２２、ｍｕｔａｎｔ　Ｈ－１（ＥＰ０７１６６８８）から得られたＨＡに適用可能である。本出願人はこのプロセスがどのようにして、欧州薬局方によって必要とされる全ての物理化学的仕様（ＨＡのモノグラフィー：Ｐｈ、Ｅｕｒ、５．０、０１／２００５：１４７２）に適合するＨＡのナトリウム塩の調製を可能にするかを、以下に実証したが、特に、いくつかの純度特性について、いかなる炎症誘発性及び発熱性成分も含まず、特に全ての注射可能な医薬組成物（関節内、皮内及び眼内）において完全に安全に使用可能な非常に高い純度を有するヒアルロン酸を保証するために、本出願人によって請求される仕様をさらに限定した。本発明の新規なプロセスの目的の手段により精製されたＨＡのナトリウム塩は例えば、重金属塩（ＥＰ０８２７５１４）、エステル（ＥＰ０２１６４５

３）、アミド（ＥＰ１０９５０６４）、スルホネート（ＥＰ０９４０４１０）及び架橋生成物、中でも自己架橋体（ＥＰ０３４１７４５）のような、当業者に公知の全ての誘導体の製造にも使用することができる。

【００１８】

本発明の目的は、正確な重量平均ＭＷを有するＨＡの異なる画分を得るための、さらに精製されるべきＨＡの特定の熱処理相、特にストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）（このＨＡを含む）の発酵ブロスにも関する。本出願人は実際に、発酵ブロスの不活性化段階に続くか、又は雄鶏のとさかの酵素消化と同時になされる、特定の熱処理について、温度及び処理時間（以下に詳細に記載される条件）を完全なものとした。これにより所望の固有粘度を有する最終生成物を得ることが可能となる。ＨＡの特定の重量平均ＭＷ値は固有粘度の特定の値に対応し、この粘度は、「固有粘度」法（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：　１４７２）に従って、欧州薬局方のＨＡの対応するモノグラフィーに記載されているものに従って計算される。

【００１９】

本発明のさらなる目的は、前記画分を含有する医薬組成物、化粧組成物及び栄養組成物に関し、より具体的には以下の通りである。

　－関節炎の関節の粘性補充、外傷性関節損傷、軟骨下損傷において使用される、非常に高い、高い、又は中程度の重量平均ＭＷを有するＨＡのナトリウム塩を含有する、関節内使用のための医薬組成物。

　－眼内使用のための、又は眼疾患治療のために眼内に投与するための、非常に高い、高い、中程度の、又は低い重量平均分子量を有するＨＡのナトリウム塩を含有する医薬組成物；

　－手術後の癒着の予防において使用される、非常に高い、高い、中程度又は低い重量平均分子量を有するＨＡのナトリウム塩を含有する医薬組成物。

　－皮膚潰瘍、床ずれ、火傷、傷あと、皮膚病変、ケロイド又は凹型（ｈｙｐｏｔｒｏｐｈｉｃ）／肥厚性（ｈｙｐｅｒｔｒｏｐｈｉｃ）瘢痕の治療、したがって無傷（ｉｎｔａｃｔ）皮膚又は損傷した皮膚を有するすべての種類の皮膚障害の治療、ならびに湿疹若しくは様々な皮膚炎などの皮膚疾患、特にアトピー性皮膚炎、おむつかぶれ、乾癬などの治療において使用される、非常に高い、高い、中程度又は低い重量平均ＭＷを有するＨＡのナトリウム塩、好ましくは中程度又は低い重量平均ＭＷを有するＨＡのナトリウム塩を含有する、皮内及び／又は筋肉内における局所又は注射用途のための医薬組成物。

　－特に間質性膀胱炎の治療のための、非常に高い、高い又は中程度の重量平均分子量を有するＨＡのナトリウム塩を含有する、膀胱内使用のための医薬組成物。

　－皮膚美容分野における充填剤、又は形成外科における注入材（ｂｏｄｙ　ｓｈａｐｉｎｇ）としての、非常に高い、高い又は中程度の重量平均分子量を有するＨＡのナトリウム塩を含有する注射用医薬組成物。

　－局所使用及び経口使用のための化粧組成物。

　－関節炎の関節の経口治療、腱への栄養補給、皮膚への栄養補給又は胃腸粘膜への栄養補給のための、非常に高い、高い、中程度又は低い重量平均ＭＷを有するＨＡのナトリウム塩を含有する医薬組成物又は栄養組成物。

【００２０】

本発明のさらなる目的は、パッド、織布、不織布、顆粒、フィルム、及びゲルの形態にあり、また様々な起源の細胞及び／又は血液成分、例えば血小板派生物（ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ）、などを伴っていてもよい、本発明により精製されたＨＡを用いて調製された派生物を含む二次元／三次元生体材料にも関する。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

本出願人は、主にタンパク質、核酸及び／又は他の／様々な種類の発熱物質によって代表される、ヒアルロン酸の選択された産生源に由来する全ての不純物を除去することを主目的として、以下の精製プロセスを完成した。特に、本発明の目的は例えばストレプトコッ

カス属菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）やバチルス属菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）（又は例えば、細菌（例えば、腸球菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｉ）及びブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ））のようなグラム陽性細菌、又は例えば大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　Ｃｏｌｉ）（又はパスツレラ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）若しくはサルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ））のようなグラム陰性細菌に由来する細菌毒素を完全に除去することであり、これらは発酵ブロス中には通常存在しない（供給源株から残存しない場合）が、その汚染の可能性は非常に重要な安全性の問題である。最終産物としてのＨＡの中における毒素（ＬＴＡ又はＬＰＳなど）の存在は、治療される関節又は組織の炎症／感染を引き起こし得る高度に炎症誘発性因子の産生、さらにはその全破壊又は壊死までも決定しうるので、ＨＡに必要な純度を実際に奪うであろう。

【００２２】

ＨＡのナトリウム塩の新しい精製プロセスは、以下のことを確実にする。

・高い工程収率
・生成物の全純度
・所望の固有粘度（したがって、ＭＷ）を有する画分の生産。

【００２３】

このプロセスは、２つ又は３つのステップからなる。

・不活化（この段階はＢａｃｉｌｌｕｓ及びＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓのブロスからのＨＡの生産にのみ存在する）；
・抽出；
・精製。

【００２４】

不活性化：この工程は、当業者に公知の条件下で適切な発酵ブロスを含有する特定の培養槽中で培養されるＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ（及びＢａｃｉｌｌｕｓ）からのＨＡの生産に関する。このプロセスに続いて、ブロスを好ましくはＨＣｌで酸性化してｐＨを４～５の値まで低下させることによる細菌の不活化段階が行われ、このｐＨ値では実際にＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓはその代謝活性を完全に停止する。

【００２５】

これに続いて、高粘度若しくは中粘度を有するＨＡ又は低粘度を有するＨＡを製造するための、加熱（以下に記載）による不活性ブロスの熱処理が行われるが、この処理は、非常に高い粘度を有するＨＡを製造する場合には行われない。上記のように、実際、特定のＭＷ範囲は特定の粘度範囲に対応するものであり、このようにして、出願人は以下に実証されるように、絶対的精度を有する所望の画分の製造を可能にするプロセスを開発した。

【００２６】

セライト（珪藻土、化学名：二酸化シリカ）のパッド上で不活化ブロスを濾過し、その後０．５μｍに等しい濾過粒度（プロピレンフィルターが好ましい）のフィルターを通してさらに濾過することにより、バイオマスが除去される。ブロスは、好ましくは６．５～７．５のｐＨでソーダ（ＮａＯＨ）で中和される。

【００２７】

抽出：このフェイズはＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ及びＢａｃｉｌｌｕｓからのＨＡの産生、及び雄鶏のとさかから得られるＨＡの産生の両方に共通である。後者の場合、本発明によるプロセスは、ＥＰ０１３８５７２に記載されている事項に従ってとさかから得たホモジネートから出発する。より詳細には、ホモジネートが高粘度、中粘度又は低粘度を有するＨＡを製造するための加熱（以下に記載）による熱処理に供される。この熱処理は、当業者に知られているように、リン酸緩衝液中で調製された酵素パパインによる酵素消化（このホモジネート（以下、酵素消化ホモジネートと定義する））と同時に行われる。中和された濾液中に存在するか、又は熱処理に供された酵素消化物の混合物中に存在する、非精製ヒアルロン酸（以下、非精製ＨＡを含有するブロスと定義する）は、その後、セライトをさらに撹拌しながら添加した後、ＣＰＣ（塩化セチルピリジニウム、ＣＰＣ－ＨＡ塩が形成される）と錯体化される。この錯体を静置して、固体を沈降させ、液相から分離

し、これを除去する。次いで、固相中に存在するＨＡを、ＮａＣｌ生理食塩水溶液と共に撹拌しながら可溶化し、得られた生成物（この溶媒に可溶であるＨＡのナトリウム塩）を、濾過布の手段によるさらなる濾過／精製に付して残留セライトを分離し、濾過粒度３μｍのフィルター（ポリプロピレンフィルターが好ましい）により濾液を回収する。この特定の手順は、未精製ＨＡのナトリウム塩の「抽出」として定義され、１～４回行うことができる。濾過された生成物同士を回収して合体させた後、このように「抽出された」生成物は、２００～３００オングストロームの範囲の細孔半径を有することで、大きなサイズの分子を吸収するのに適した芳香族系の特定の樹脂で処理され、それらは多糖類が精製された源の系に由来するＨＡの全不純物及び上記のプロセスで使用される物質に由来するＨＡの全不純物を低減することに決定的に寄与する。架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂が好ましく使用され、樹脂ＤＩＡＩＯＮ　ＨＰ２０（又はＨＰ２０Ｌ）（三菱化学）が特に効率的であることが判明した。前記処理は、樹脂及び抽出物を撹拌下に一定時間放置することからなる。次いで、得られた生成物を、好ましくはポリプロピレン製のフィルター／布の手段によって（ＨＡナトリウム塩から樹脂を分離するために）濾過し、場合によってはさらに濾過粒度３μｍのフィルター上で濾過する。

【００２８】

精製：この最終工程はおそらく、抽出フェイズで得られたＨＡナトリウム塩のエタノール中沈殿により先行されうる（この工程は多糖類をさらに精製するために、特にそれが雄鶏のとさかに由来する場合に、導入されうる）。上記溶媒の除去に続いて、水中での沈殿の再可溶化が行われ、続いて、以下の「精製」工程に進む。残留毒素を完全に除去するためのＮａＯＨ水溶液の添加、好ましくはＨＣｌ（３７質量％）によるｐＨ８～９の範囲までの中和（このフェイズにおいて用語「中和」は、ｐＨを中性に近い値まで下げるという出願人の意図を単に示すために使用される）、好ましくは３μｍの濾過粒度を有するフィルターによる濾過、沈殿及び少なくともエタノールを用いた洗浄、有機溶剤、好ましくはアセトン中での最終洗浄。こうして製造され精製されたＨＡのナトリウム塩は、当業者に知られているように乾燥される。

【００２９】

従って、本発明の目的は、以下に概略的に示すＨＡのナトリウム塩の調製及び精製プロセスに関する。

【００３０】

Ａ．（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ及びＢａｃｉｌｌｕｓの培養から生産されるＨＡの精製のための）不活性化：

Ａ１．　発酵ブロスをｐＨ４～５に酸性化すること、ここで１ＮのＨＣｌ用いることが好ましい；

Ａ２．　撹拌下でのブロスの熱処理（この処理は、非常に高い粘度を有するＨＡを生成する場合には行われない）；

Ａ３．　セライト（化学名：二酸化ケイ素、ブロス１リットル当たり２０ｇ～６０ｇ、好ましくは３０ｇ～４０ｇ）のパッドでの濾過によるバイオマスの除去、さらに、濾過粒度０．５μｍのフィルター、好ましくはポリプロピレンフィルターで、濾過してもよい；

Ａ４．　ｐＨ６．５～７．５への中和、好ましくは２０％のＮａＯＨ水溶液による中和。

【００３１】

Ｂ．　抽出：

とさか由来のホモジネートの場合、対応する熱処理が最初に、酵素的消化と同時に行われ、その後濾過が行われ（未消化の生物学的残渣を除去するために）、続いて、以下の共通フェイズが行われる。

Ｂ１．　セライトを添加（酵素消化液１リットルあたり、すなわち非精製ＨＡを含むブロス１リットルあたり、２０ｇ～６０ｇの量）して、撹拌しながら少なくとも３０分間、ＨＡと塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）（酵素消化液１リットルあたり４ｇ～２０ｇ

、好ましくは５ｇ～１５ｇ）との錯体化を行い、その後少なくとも３０分間沈降させる；
Ｂ２．　液相の除去；
Ｂ３．　４時間～２４時間撹拌しながら、固相中に存在するＨＡをＮａＣｌ（０．３Ｍ水溶液を用いることが好ましい）で可溶化し、残留セライトを分離するための濾過布及び濾過粒度３μｍのフィルター（ポリプロピレンフィルターが好ましい）により濾過し、ＨＡのナトリウム塩として第１の抽出物を回収すること。この手順を１回～４回繰り返す；
Ｂ４．　抽出物同士を合体させること
Ｂ５．　細孔半径２００オングストローム～３００オングストロームの芳香族系樹脂（抽出物１リットル当たり１０～６０ｇの量）を前記合体させられた抽出物に添加すること、ここで前記樹脂は架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂であることが好ましく、樹脂ＤＩＡＩＯＮ　ＨＰ２０（又はＨＰ２０Ｌ）であることがさらに好ましく、この処理は少なくとも８時間撹拌下で行われる；
Ｂ６．　少なくとも濾過布（好ましくはポリプロピレン製）により濾過し、ＨＡのナトリウム塩から樹脂を分離し、場合によっては少なくとも、濾過粒度３μｍのフィルター（この濾過にはポリプロピレンフィルターが好ましい）で濾過する。
【００３２】
Ｃ．　精製：
雄鶏のとさかから得られるＨＡのナトリウム塩の場合、この工程はおそらく、前の工程で得られたＨＡのナトリウム塩のエタノール中での沈殿、上記の溶媒の除去及び精製水中での沈殿物の再可溶化を伴い（Ｐｈ．Ｅｕｒ．８．０，０１／２００９：０００８）、出発体積を回復することに先行されうる。この工程では続いて、選択された供給源にかかわらず、以下の精製段階に進むことができる。
Ｃ１．　撹拌しながらＮａＯＨ水溶液（好ましくは０．２～０．４Ｍ溶液）を添加すること；
Ｃ２．　８～９の範囲のｐＨへの中和、好ましくはＨＣｌ（３７％）による中和；
Ｃ３．　濾過すること、濾過粒度３μｍのフィルターが好ましい（ポリプロピレンフィルターが好ましい）；
Ｃ４．　エタノールで、工程Ｃ３から得られるＨＡナトリウム塩のナトリウム塩の沈殿及び少なくとも１回の洗浄を行い、有機溶媒、好ましくはアセトン中で最終洗浄すること；
Ｃ５．　当業者に知られているようにＨＡのナトリウム塩を真空下で乾燥させること、好ましくは２５℃～４０℃で１５時間以上の乾燥。
【００３３】
ＨＡのナトリウム塩の重量平均ＭＷの測定
本発明の熱処理対象物は、以下に記載される特定の範囲（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０．０１／２００５；Ｐｈ．Ｅｕｒ．１４７２に記載される方法に従って測定されるＩＶ）に入る固有粘度（ＩＶ）を有するＨＡのナトリウム塩の製造を可能にする。
【００３４】
Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ又はＢａｃｉｌｌｕｓの発酵ブロスから得られたＨＡの熱処理：
６０℃プラスマイナス５℃で５～４０分：これは高粘度を有するＨＡ、従って、１７～２４ｄｌ／ｇの範囲内の最終ＩＶを有するＨＡのナトリウム塩の製造を可能にする。上記の熱処理は好ましくは６５℃で５～３０分間行われる。
７０℃プラスマイナス５℃で５～４０分：これは中程度の粘度を有するＨＡ、従って、１０～１５ｄｌ／ｇの範囲内の最終ＩＶを有するＨＡのナトリウム塩の製造を可能にする。上記の熱処理は好ましくは７０℃で５～３０分間行われる。
９０℃プラスマイナス５℃で１５０～３００分：これは、低粘度のＨＡ、したがって３～６ｄｌ／ｇの範囲内の最終ＩＶを有するＨＡのナトリウム塩の製造を可能にする。
熱処理が行われない場合、本発明の目的に従って精製されたＨＡのナトリウム塩の最終Ｉ

Ｖは２９ｄｌ／ｇ以上であり、従って、精製された生成物は、非常に高い粘度を有するＨＡのナトリウム塩である。

【００３５】

雄鶏のとさかから得られたＨＡの熱処理：

５０～６０℃で２６～３０時間：これは高粘度を有するＨＡ、従って、１７～２４ｄｌ／ｇの範囲内の最終ＩＶを有するＨＡのナトリウム塩の製造を可能にする。上記の熱処理は好ましくは５５℃で２８時間実施される。

６０～６５℃で２８～３０時間：これは中程度の粘度を有するＨＡ、従って、１０～１５ｄｌ／ｇの範囲内の最終ＩＶを有するＨＡのナトリウム塩の製造を可能にする。上記の熱処理は好ましくは６０℃で３０時間実施される。

６５～７０℃で４６～５０時間：これにより、低粘度のＨＡ、したがって３～６ｄｌ／ｇの範囲内の最終ＩＶを有するＨＡのナトリウム塩の製造が可能になる。上記の熱処理は好ましくは６５℃で４８時間実施される。

【００３６】

処理の終わりに、当業者はサンプルを回収し、得られた粘度を確認することができ、到達した結果に基づいて、所望の粘度に達するために、操作を繰り返すか、処理の時間及び／又は温度を（依然として記載された範囲内で）変更することができる。上記のＩＶの範囲に達するための処理時間及び温度は、実際、最初のブロス／消化物中に存在するＨＡの濃度及びＭＷに依存する。

【００３７】

対応する平均ＭＷを特定するためにＭａｒｋ－Ｈｏｕｗｉｎｋ方程式（Ｔｅｒｂｏｊｅｖｉｃｈ　Ｍ．ら、Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９８６，１４９，３６３－３７７；Ｔｅｒｂｏｊｅｖｉｃｈ　Ｍ．ら、Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９８６，１５７，２６９－２７２）が使用される。この方程式はＶＩをＭＷに関連付ける。従って、粘度範囲は特定のＭＷ範囲に対応する。

２９ｄｌ／ｇは約１８８５ｋＤａに相当する

１７～２４ｄｌ／ｇは、約９２０～１４５０ｋＤａの範囲に相当する

１０～１５ｄｌ／ｇは、約４５０～７８０ｋＤａの範囲に相当する

３～６ｄｌ／ｇは、約９０～２３１ｋＤａの範囲に相当する。

【実施例】

【００３８】

以下の実験により、本出願人は、得られたＨＡのナトリウム塩の純度に関して、本発明の目的とするプロセスの効力を実証した。

【００３９】

Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓから産生されたＨＡのナトリウム塩の精製

欧州特許第０７１６６８８号の実施例３に従い培養したＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｑｕｉ　６８２２２突然変異体Ｈ－１の培養工程の終わりに、約５リットルのブロスを回収し、ブロス１ｍＬ当たり$１０^{９}$個の細菌細胞の量の大腸菌ＡＴＣＣ８７３９で汚染する。次いで、このブロスを開放容器中に放置し（細菌からの、又は胞子が空気中に存在し得る酵母／真菌からの、さらなる汚染に好都合なように）、室温で１６時間以上放置する。次に、これを２つのサンプルに分割する：２．５リットル（試料Ａ）は、本発明の目的とする完全な精製プロセスにかけられ、残りの２～５リットル（試料Ｂ）は、以下に記載されるように、単純な沈殿にかけられる。ブロスの試料を、存在する微生物及び／又は真菌性の充填物の定性的分析及び定量的分析（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０；２．６．１２に従って実施したＡＰＩ系の手段による）による微生物学的制御に供する。結果を表Ａに示す。

【００４０】

試料Ａ：ブロスを１ＮのＨＣｌで酸性化してｐＨ４．３とし、撹拌しながら６５℃で１０分間熱処理することにより不活性化する。セライト（４０ｇ／ｌ）での濾過によりバイオマスを除去し、２０％ＮａＯＨ水溶液でｐＨ６．５に中和する。これに続いて、セライト（２０ｇ／ｌブロス）を添加する抽出フェイズ、３０分間撹拌しながらのＣＰＣ（１０ｇ

／ｌブロス）との錯化を行い、その後１時間沈殿させる。次いでサイフォン処理して液相を除去し、固相中に存在するＨＡを０．３ＭＮａＣｌ水溶液中に、依然として２０時間撹拌しながら可溶化する。このプロセスに続いて濾過布上で濾過し、さらに濾過粒度３μｍのフィルターを用いて第１の抽出物を回収する。この手順を２回繰り返し、２回分の抽出物を合体させる。続いて、芳香族型樹脂であるＤＩＡＩＯＮ　ＨＰ２０を添加し（４０ｇ／ｌ、この処理は撹拌下で８時間行う）、ポリプロピレン濾過布を用いて濾過し、ＨＡから樹脂を分離する。精製は、０．４ＭのＮａＯＨ水溶液を（撹拌下で）添加し、続いてＨＣｌ（３７％）でｐＨ８．５に中和し、濾過粒度３μｍのポリプロピレンフィルターで濾過することによって行う。ＨＡのナトリウム塩を１００％エタノールで沈殿させ、８０％エタノールで洗浄し、最終洗浄をアセトン中で行い、得られたＨＡのナトリウム塩の最終乾燥を真空下、２５℃で２０時間行う。

【００４１】
試料Ｂ：試料Ａとまったく同様に、試料を１ＮのＨＣｌで酸性化してｐＨ４．３とし、撹拌しながら６５℃で１０分間熱処理することにより不活化する。セライトで濾過してブロスからバイオマスを除去した後、濾液をエタノールで沈殿させ、沈殿したＨＡ（未精製）を２５℃で２０時間乾燥させた。

【００４２】
精製されたＨＡは非発熱性でなければならない、すなわち、その投与後に体温の上昇を引き起こし得る要素が存在してはならない。非発熱性を評価するための試験は、ＬＡＬ試験（ヒアルロン酸ナトリウムに関するモノグラフィーでＥｕｒ．５．０により要求される、グラム陰性体由来のエンドトキシンＬＰＳのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの特異的測定）、発熱性試験（発熱性物質の性質に関するｉｎ　ｖｉｔｒｏでの無差別解析）、及びエンドセーフ（登録商標）ＩＰＴ試験（Ｐｈａｒｍａｃｏｐｏｅｉａが必要としないｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験）など、種々の方法で実施することができる。

【００４３】
ＬＡＬ試験：ＬＡＬ試験の基礎は、主に発熱物質の作用に関与するグラム陰性菌由来の細菌性エンドトキシンの存在下で、カブトガニ（Ｌｉｍｕｌｕｓ　ｐｏｌｙｐｈｅｍｕｓ）の血液から抽出されたアメーバ細胞がゲル化する能力である。この試験は、Ｐｈ．Ｅｕｒ５．０，２．６．１４に従って行われる。

【００４４】
発熱性試験：この試験は発熱物質の存在を決定するために最も広く使用されている分析方法であり、少量の製品を外耳静脈に注射したウサギの使用を意図している。注射の３時間後にベースライン温度を取る。温度の上昇は、生成物の発熱性の徴候である。この試験は、Ｐｈ．Ｅｕｒ５．０，２．６．８に従って行われる。

【００４５】
Ｅｎｄｏｓａｆｅ（登録商標）ＩＰＴ（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ｉｎｃ．）：高度に炎症誘発性であるサイトカインＩＬ－１βの産生を刺激することができるので、任意のタイプの発熱物質の存在を検出することができる試験である。この試験は、内毒性（ＬＰＳ）又は非内毒性（ＬＴＡ及び／又はタンパク質及び／又は発熱物質誘導体、例えばウイルス又は酵母／カビ由来のもの）の両方の発熱物質の同定を可能にする。本試験は２つのステップからなり、第１のステップはサンプルをヒト血液と共にインキュベートすること（存在する場合、発熱物質は血液の単球によるＩＬ－１βの産生を刺激する）、第２のステップは４５０ｎｍで読み取られた特異的試験ＥＬＩＳＡによって産生されたＩＬ－１βの存在を検出することからなる（Ｓｃｈｉｎｄｌｅｒ　Ｓ．ら、ＡＬＴＥＸ，２００９，２６，２６５－２７７）。

【００４６】
ＬＡＬ試験ではエンドトキシンＬＰＳ以外の発熱剤の存在の可能性を評価することができないため、試料Ａ及びＢについては、発熱剤の解析は発熱剤試験及びエンドサフェ（登録商標）－ＩＰＴを用いて実施したが、２つの方法は感度が異なるものの、いかなる性質の発熱剤も明らかにした。実際、ＩＰＴ試験はグラム陽性及びグラム陰性の両方に由来する

細菌残渣を同定することを可能にし、感度に関する限り、発熱性試験を上回る。さらに、ＩＰＴはヒト組織における汚染物質の毒性を評価するので、ウサギにおける試験よりも特異的である（Ｈａｒｔｕｎｇ　Ｔ．ｅｔ　ａｌ、ＡＴＬＡ、２００１、２９、９９～１２３）。両方のサンプルについて、総タンパク質含量を、Ｐｈ．Ｅｕｒ５．０、０１／２００５；１４７２から測定し、評価した。試験結果を表Ｂに示す。
結果
【００４７】
【表１】
表Ａ：本表では、非病原体生物および*B. Cereus, Coli*および*Candida*などの病原体生物に関して、重要な細菌および真菌の負荷量があることを観察することができる。

細菌の負荷量 (Microbial charge)	*Bacillus Cereus*	4.6 x 10^7 /ml
	Streptococcus	2.2 x 10^7 /ml
	E. Coli	9.8 x 10^6 /ml
	負荷量の総計	**7.8 x 10^7 /ml**
真菌の負荷量 (Mycotic charge)	かび(Mold)	9.4 x 10^7 /ml
	酵母 (*Candida Lusitaniae*)	2.5 x 10^7 /ml
	負荷量の総計	**1.2 x 10^8 /ml**

【００４８】
表は、特に汚染された最初のブロスが、Ｃａｎｄｉｄａの派生物などの様々な種類の発熱物質に加えて、グラム陽性及びグラム陰性の両方からの発熱物質要素を、どれだけ含んでいるかを示す。
【００４９】
【表２】
ＮＲ：検出不能（０．０５ＥＥＵ／ｍｇ未満）

	発熱性試験	IPT	タンパク質含有量
試料A	0.9 ° C	N.R.	0.04%
試料 B	4.1 ° C	>5 EU/mg	10%

【００５０】
これらの結果は、新しい精製プロセスが様々な種類の発熱物質からＨＡを精製することができることを示している。

【００５１】
表Ｂから、試料ＢがＩＰＴ試験で、ＨＡ　Ｐｈ．Ｅｕｒ５．０、０１／２００５：１４７２のモノグラフィーである発熱性毒素について非常に高い値を示すことがわかる。実際、ＨＡの注射投与について許容されるエンドトキシンの最大限界は０．０５ＩＵ／ｍｇ（すなわち、０，０５ＥＵ／ｍｇ）未満である。したがって、試料Ｂでは、発熱物質濃度がこの限界より少なくとも１００倍高いことになる。発熱性物質試験のために処置した３匹のウサギでは、この濃度は４．１℃の全体的な温度上昇を引き起こす。Ｐｈ．　Ｅｕｒ．５．０、２．６．８によれば、３回の昇温の合計が１．１５°を超えない場合、この生成物は発熱性試験を満足することになるので、試料Ｂは強い発熱性を示し、ＩＰＴ試験のデータを確認するものであった。最後に、このサンプルはＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓの培養に使用されるブロスに由来する非常に高い総タンパク質％を有し、同細菌からは完全には除去されない。ＨＡのモノグラフィーであるＰｈ．　Ｅｕｒ．　５．０、０１／２００５：１４７２は非経口投与についてタンパク質全体量の最大値を０．１％を超えない値に制限しており、従って、この場合も、試料Ｂは、制限値より約１００倍高いタンパク質値を有する。

【００５２】
本発明の目的に従って精製されたサンプルＡは、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける発熱物質による温度上昇が１．１５℃未満である、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるが毒素０．０５ＥＵ／ｍｇ未満である、及び、全タンパク質含量が０．１％未満である、とのＨＡのナトリウム塩の注射投与のための要件（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：１４７２）を全て満たす。

【００５３】
エンドトキシン及び様々な種類の発熱物質の両方で特に汚染された試料からさえも、ＨＡのナトリウム塩の完全な精製を確実にし、このようにして、より限定された純度に関してもすべての要件を満たす生成物の安全性を以下に実証されるように保証するので、この結果は、本発明のプロセスの目的の有効性を実証するものである。

【００５４】
実施例１：１０～１５ｄｌ／ｇの範囲内のＩＶを有するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ由来のＨＡのナトリウム塩の調製及び精製
ＥＰ０７１６６８８の実施例３に従い培養させたＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｑｕｉ（６８２２２変異体Ｈ－１）の培養プロセスの終わりに、５リットルのブロスを、１ＮのＨＣｌでｐＨ４．５に酸性化することによって不活性化する。これに続いて、温度を７０℃に上昇させ、撹拌しながら２０分間、ブロスを熱処理する。次いで、ブロスを濾過し、濾過布上に２００ｇのセライトを準備したブフナーフィルターに注ぐ。濾過の最後に、生成物を２０％ＮａＯＨ水溶液で中和し、ｐＨを７．０に固定する。１００ｇの珪藻土、続いて１１ｇ（／Ｌブロス）等量のＣＰＣを、撹拌下で３０分間かけて、濾過したブロスに添加する。混合物全体を４０分間静置し、新たに形成されたＣＰＣ－ＨＡ錯体を沈殿させる。液相はサイフォン処理によって除去される。固相中に存在するＨＡを、０．３ＭのＮａＣｌ水溶液により、１０時間攪拌しながら可溶化する。ＨＡのナトリウム塩を最終的に濾過布及び濾過粒度３μｍの濾過カートリッジ（Ｐａｌｌ）で濾過する。２００ｇのＤｉａｉｏｎ　ＨＰ２０樹脂を抽出物に加え、１０時間撹拌する。混合物全体をプロピレン布で濾過し、次いで、順次、濾過粒度３μｍのフィルター（Ｐａｌｌ）を通して濾過する。抽出物の溶液にＮａＯＨ水溶液を加え、これをＨＣｌ（３７％）で中和し、ｐＨを８．５の値にする。次いで、抽出物を濾過粒度３μｍのフィルターを通して濾過する。ＨＡのナトリウム塩の溶液をエタノールで沈殿させ、３０分間撹拌し続ける。生成物を１０分間沈降させ、上清をサイフォン処理により除去する。生成物をエタノールで（１０分間撹拌することで）洗浄し、次いで、上清をサイフォン処理によって除去する（又は、ブロス量が５リットルより多い場合、固体生成物を濾過布上での濾過によって回収する）。アセトンによる最後の洗浄を行い、濾過布上での濾過により固体を回収する。得られた生成物を適切なステンレス鋼トレイ上に置き、真空下で２５℃の温度で２２時間乾燥させる。

【００５５】
得られた生成物の分析（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：１４７２に準拠）：
ＩＶ：１４．５ｄｌ／ｇ（重量平均分子量：７４８，０００ダルトン）
タンパク質：０．０２％
細菌性エンドトキシン（ＬＡＬ試験）：０．０１２ＥＵ／ｍｇ
収率：本発明の目的であるプロセスの全収率の決定のために、培養の終わりにブロス中に存在するカルバゾール中のＨＡの濃度を測定し（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：１４７２）、精製プロセスの終わりに得られるＨＡの最終濃度と関連付ける（すなわち、培養の終わりにおけるブロスのリットル数に対しての最終産物のグラム数の比を計算し（次いで、精製に供される）、単純な割合を算出して、精製される最初のＨＡに対しての精製されたＨＡのパーセンテージとして表される収率値を得る）。
【００５６】
この場合、３．３ｇ／ＬのＨＡが培養終了時のブロス中で測定され、３．０ｇ／ＬのＨＡが精製産物として測定された。したがって、最終収率は９０％よりも高かった。
【００５７】
実施例２：１０～１５ｄｌ／ｇの範囲のＩＶを有する雄鶏のとさか由来のＨＡのナトリウム塩の調製及び精製
欧州特許第０１３８５７２号の実施例１の記載に従って雄鶏のとさかから調製した乾燥粉末２５０ｇを、１０リットルの二塩基性リン酸ナトリウム／リン酸二水和ナトリウム／ＥＤＴＡ緩衝液（ｐＨ６．５）中で、１０分間撹拌しながら、パパイン０．２９ｇと混合する。次いで、この混合物を、その温度を６０℃に３０時間上昇させることによる熱処理に付す。次いで、得られたホモジネートを濾過し、中にポリプロピレン濾過布上に２００ｇのセライトを準備してあるブフナー内に排出した。２００ｇのセライトを撹拌下で濾過製品に添加し、次いで２リットルのＣＰＣ水溶液（２９ｇ／ｌ）を前記濾過産物に添加し、撹拌下で３０分間放置する。次いで、混合物を４０分間静置させて、新たに形成されたＣＰＣ－ＨＡ錯体を沈殿させ、液相をサイフォン処理によって除去する。固相中に存在するＨＡを、４リットルの０．３ＭのＮａＣｌ水溶液で１０時間撹拌しながら可溶化する。最後に、ＨＡのナトリウム塩を、濾過布及び濾過粒度３μｍの濾過カートリッジ（Ｐａｌｌ）で濾過する。この時点で、２００ｇのＤｉａｉｏｎ　ＨＰ２０Ｌ樹脂を抽出物に添加し、混合物を撹拌下に１０時間放置する。次いで、混合物全体をポリプロピレン布上で濾過し、続いて、濾過粒度３μｍのフィルター（Ｐａｌｌ）で順次濾過する。ＨＡのナトリウム塩を３０分間撹拌しながら１．８容量のエタノールで沈殿させ、生成物を沈降させ、上清をサイフォン処理により除去する。沈殿した生成物を５リットルの精製水で撹拌しながら再可溶化する。
【００５８】
得られた溶液に０．２ＭのＮａＯＨ水溶液を加え、これをＨＣｌ（３７％）で中和し、ｐＨを８．２にする。濾過粒度３μｍのフィルターを用いて濾過を続ける。次いで、得られたＨＡのナトリウム塩を３０分間撹拌しながらエタノールで沈殿させ、生成物を１０分間沈降させ、上清をサイフォン処理によって除去する。生成物をエタノールで洗浄し、生成物を１０分間沈降させ、上清をサイフォン処理によって除去する（又は、ブロス量が５リットルより多い場合、固体生成物を濾過布上での濾過によって回収する）。最後にアセトンで洗浄し、濾過布で濾過して固体を回収する。得られた生成物を適切なステンレス鋼トレイ上に置き、真空下４０℃の温度で２２時間乾燥させる。
【００５９】
得られた生成物の分析（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：１４７２に準拠）：
ＩＶ：１４ｄｌ／ｇ（重量平均分子量：７１４，０００ダルトン）
タンパク質：０．０４％
細菌性エンドトキシン（ＬＡＬ試験）：０．０１２ＥＵ／ｍｇ
収率：この場合、総プロセス収率の決定のために、酵素消化物１リットル当たりのカルバゾール中のＨＡの濃度を決定し、精製プロセスの最後に得られたＨＡの最終濃度と関連付

ける（すなわち、酵素消化物のリットル量に対しての最終生成物のグラム数の比を計算し（次いで、精製に供される）、単純な割合を計算して、精製される最初のＨＡに対しての精製されたＨＡのパーセンテージとして表される収率値を得る）。
この場合、ＨＡの最終収率は８５％よりも高かった。
【００６０】
実施例３：３～６ｄｌ／ｇの範囲のＩＶを有するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ由来のＨＡのナトリウム塩の調製及び精製
手順は実施例１に記載したものと同じであるが、熱処理は９０℃で２５０分間行った。最終生成物を真空下、４０℃で２５時間乾燥させる。
【００６１】
得られた生成物の分析（Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：１４７２に準拠）：
ＩＶ：5ｄｌ／ｇ（重量平均分子量：１８１，０００ダルトン）
タンパク質：０．０１５％
細菌性エンドトキシン（ＬＡＬ試験）：０．００７５ＥＵ／ｍｇ
収率：この場合、３．３ｇ／ＬのＨＡが培養終了時のブロス中で測定され、２．５ｇ／Ｌが精製産物として測定された。従って、最終収率は７５％より高かった。
【００６２】
この理由のために、本発明のさらなる目的はＨＡの精製プロセスに関し、ここで、当該プロセスの終わりにおける総収率に加え、ＨＡのナトリウム塩について請求されるタンパク質の総量及び毒素の最大値は下記のとおりである。
タンパク質は、Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：１４７２で確立された量が０．１％であるところ、本プロセスでは－０．０５％。
エンドトキシンは、ＩＵ／ｍｇのエンドトキシン対Ｐｈ．Ｅｕｒ．５．０、０１／２００５：１４７２で許容される最大限界が０．０５ＩＵ／ｍｇであるところ、本プロセスでは－００２ＩＵ／ｍｇ。
収率：７５～９０％。
　本発明は、以下の態様を含む。
＜１＞　以下の工程を含む、ストレプトコッカス属菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）の発酵ブロス若しくはバチルス属菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）の発酵ブロスから、又は雄鶏のとさかから、ヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するためのプロセス：
Ｂ．以下の工程を含む抽出：
　Ｂ１．未精製ヒアルロン酸を含有するブロスにセライトを添加して、撹拌しながら少なくとも３０分間ヒアルロン酸と塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）とを錯体化させ、その後少なくとも３０分間沈殿させせること；
　Ｂ２．工程Ｂ１で形成された液相を除去すること；
　Ｂ３．固相中に存在するヒアルロン酸をＮａＣｌの水溶液中で可溶化し、ヒアルロン酸のナトリウム塩として第１の抽出物を回収すること、ここで、この手順Ｂ３は１回～４回実施される；
　Ｂ４．工程Ｂ３から得られる前記抽出物同士を合体させせること；
　Ｂ５．２００オングストローム～３００オングストロームの範囲の細孔半径を有する芳香族樹脂を、Ｂ４で合体させられた前記抽出物に添加し、少なくとも８時間撹拌下に放置すること、ここで前記芳香族樹脂は架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂が好ましい；
　Ｂ６．工程Ｂ５から得られる混合物を濾過すること；
Ｃ．以下の工程を含む精製：
　Ｃ１．工程Ｂ６から得られる濾液にＮａＯＨ水溶液を添加すること；
　Ｃ２．８～９の範囲のｐＨに、好ましくはＨＣｌで、中和すること；
　Ｃ３．少なくとも１回、濾過すること；
　Ｃ４．エタノールで、工程Ｃ３で得られたヒアルロン酸のナトリウム塩の沈殿及び少なくとも１回の洗浄を行い、有機溶媒、好ましくはアセトン中で、最終洗浄すること；

Ｃ５．ヒアルロン酸のナトリウム塩を、好ましくは２５℃～４０℃で１５時間以上、真空下で乾燥させること。

＜２＞　前記ストレプトコッカス属菌の発酵ブロスが、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｑｕｉ　ｓｕｂ　ｓｐｅｃｉｅｓ　ｅｑｕｉ　６８２２２突然変異体Ｈ－１の発酵ブロスである、＜１＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜３＞　以下の工程を含む前記ブロスの不活性化工程である先行初期工程Ａを含み、ストレプトコッカス属菌又はバチルス属菌の発酵ブロスからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する、＜１＞又は＜２＞に記載のプロセス：

Ａ１．前記ブロスをｐＨ４～５に、好ましくはＨＣｌで、酸性化すること；

Ａ２．少なくとも一回の濾過により、ストレプトコッカス属菌由来のバイオマス又はバチルス属菌由来のバイオマスを除去すること；

Ａ３．６．５～７．５の範囲のｐＨに、好ましくはＮａＯＨで、中和すること。

＜４＞　前記不活性化段階が、高粘度、中粘度又は低粘度のヒアルロン酸を製造するために加熱によって前記ブロスを熱処理することを含む、＜３＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜５＞　１７ｄｌ／ｇ～２４ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、ブロスの温度を６０℃プラスマイナス５℃まで５分間～４０分間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は６５℃で５分間～３０分間実施される、＜４＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜６＞　１０ｄｌ／ｇ～１５ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、ブロスの温度を７０℃プラスマイナス５℃まで５分間～４０分間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は７０℃で５分間～３０分間実施される、＜４＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜７＞　３ｄｌ／ｇ～６ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、ブロスの温度を９０℃プラスマイナス５℃まで１５０分間～３００分間上昇させることによって前記熱処理が実施される、＜４＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を製造及び精製するプロセス。

＜８＞　高粘度、中粘度又は低粘度のヒアルロン酸を製造するため、前記抽出工程に先立って、加熱及び同時に行われる酵素消化によって雄鶏のとさかのホモジネートを熱処理する、雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する＜１＞に記載のプロセス。

＜９＞　１７ｄｌ／ｇ～２４ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を調製するために、温度を５０℃～６０℃に２６時間～３０時間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は５５℃で２８時間実施される、＜８＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜１０＞　１０ｄｌ／ｇ～１５ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を調製するために、温度を６０℃～６５℃に２８時間～３０時間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は６０℃で３０時間実施される、＜８＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜１１＞　３ｄｌ／ｇ～６ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有するヒアルロン酸のナトリウム塩を製造するために、温度を６５℃～７０℃に４６時間～５０時間上昇させることによって前記熱処理が実施され、好ましくは前記熱処理は６５℃で４８時間実施される、＜８＞に記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜１２＞　前記精製工程Ｃに先立って、前記抽出工程Ｂで得られたヒアルロン酸のナトリウム塩をエタノール中で沈殿し、溶媒を除去し、精製水中で沈殿を可溶化する、雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する＜１＞又は＜８＞～＜１１＞のいずれか１つに記載のプロセス。

＜１３＞　以下の工程を含み、ストレプトコッカス属菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｕｓ）の

発酵ブロス又はバチルス属菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）の発酵ブロスからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する、＜１＞～＜３＞のいずれか１つに記載のプロセス：
Ａ．以下の工程を含む前記ブロスの不活性化：
　Ａ１．前記ブロスをｐＨ４～５に、好ましくは１ＮのＨＣｌで、酸性化すること；
　Ａ２．撹拌下で前記ブロスを熱処理するか、又はしないこと；
　Ａ３．ブロス１Ｌあたり２０ｇ～６０ｇのセライトパッドで濾過することにより、ストレプトコッカス属菌又はバチルス属菌に由来するバイオマスを除去すること、ここで、好ましくは前記セライトパッドがブロス１Ｌあたり３０ｇ～４０ｇであり、濾過粒度０．５μｍのフィルターを用いた濾過が行われるか又は行われず、好ましくは前記フィルターはポリプロピレンフィルターである；
　Ａ４．６．５～７．５のｐＨに、好ましくは２０％のＮａＯＨ水溶液で、中和すること；
Ｂ．以下の工程を含む抽出：
　Ｂ１．工程Ａ３から得られる濾液にブロス１Ｌあたり２０ｇ～６０ｇの量のセライトを添加し、撹拌しながら少なくとも３０分間、４ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、好ましくは５ｇ／Ｌ～１５ｇ／Ｌの塩化セチルピリジニウム（ＣＰＣ）と錯体化させ、その後少なくとも３０分間沈殿させること；
　Ｂ２．液相を除去すること；
　Ｂ３．４時間～２４時間撹拌しながら固相中に存在するヒアルロン酸を０．３ＭのＮａＣｌ水溶液中で可溶化し、濾過粒度３μｍのフィルターによって濾過し、ヒアルロン酸のナトリウム塩として第１の抽出物を回収すること、ここで、この手順Ｂ３は１回～４回実施される；
　Ｂ４．前記抽出物同士を合体させること；
　Ｂ５．２００オングストローム～３００オングストロームの範囲の気孔半径を有する芳香族樹脂を、抽出物１リットルあたり１０ｇ～６０ｇの量で、Ｂ４で合体させられた前記抽出物に添加し、少なくとも８時間撹拌下に放置すること、ここで前記芳香族樹脂は架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂が好ましい；
　Ｂ６．濾過布を用いて濾過を行うこと、ここで、さらに濾過粒度３μｍのフィルターを用いて濾過を行うか行わず、好ましくは前記フィルターはポリプロピレンフィルターである；
Ｃ．以下の工程を含む精製：
　Ｃ１．撹拌しながら、工程Ｂ６から得られる濾液に０．２Ｍ～０．４ＭのＮａＯＨ水溶液を添加すること；
　Ｃ２．８～９の範囲のｐＨに、好ましくはＨＣｌで、中和すること；
　Ｃ３．濾過すること、ここで、３μｍに等しい濾過粒度が好ましく、ポリプロピレンフィルターがより好ましい；
　Ｃ４．エタノールで、工程Ｃ３から得られるヒアルロン酸のナトリウム塩の沈殿及び少なくとも１回の洗浄を行い、有機溶媒中、好ましくはアセトン中で、最終洗浄すること；
　Ｃ５．当業者に知られているように、ヒアルロン酸のナトリウム塩を、真空下で乾燥させること、ここで前記乾燥は好ましくは２５℃～４０℃で１５時間以上行う。
＜１４＞　以下の工程を含み、高粘度又は中粘度又は低粘度のヒアルロン酸を製造するために、前記抽出工程Ｂに先立って、加熱及び同時に行われる酵素消化によってとさかのホモジネートを熱処理する、雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製する＜１＞に記載のプロセス：
Ｂ．以下の工程を含む抽出：
　Ｂ１．酵素消化ホモジネートに、前記酵素ホモジネート１Ｌあたり２０ｇ～６０ｇの量のセライトを添加し、撹拌しながら少なくとも３０分間、４ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、好ましくは５ｇ／Ｌ～１５ｇ／ＬのＣＰＣと錯体化させ、その後少なくとも３０分間沈殿させること；
　Ｂ２．液相を除去すること；

　Ｂ３．固相中に存在するヒアルロン酸を０．３ＭのＮａＣｌ水溶液中で攪拌しながら４時間～２４時間で可溶化し、濾過粒度３μｍのフィルターによって濾過し、ヒアルロン酸のナトリウム塩として第１の抽出物を回収すること、ここで、この手順Ｂ３は１回～４回実施される；

　Ｂ４．工程Ｂ３から得られる前記抽出物同士を合体させること；

　Ｂ５．２００オングストローム～３００オングストロームの範囲の気孔半径を有する芳香族樹脂を、抽出物１リットルあたり１０ｇ～６０ｇの量で、Ｂ４で合体させられた前記抽出物に添加し、少なくとも８時間攪拌下に放置すること、ここで前記芳香族樹脂は架橋ポリスチレンマトリックスからなる樹脂が好ましい；

　Ｂ６．濾過布を用いて濾過を行うこと、ここで、さらに濾過粒度３μｍのフィルターを用いて濾過を行うか行わず、好ましくは前記フィルターはポリプロピレンフィルターである；

Ｃ．以下の工程を含む精製：

　Ｃ１．攪拌しながら、工程Ｂ６から得られる濾液に０．２Ｍ～０．４ＭのＮａＯＨ水溶液を添加すること；

　Ｃ２．８～９の範囲のｐＨに、好ましくはＨＣｌで、中和すること；

　Ｃ３．濾過すること、ここで、３μｍに等しい濾過粒度が好ましく、好ましくはポリプロピレンフィルターが用いられる；

　Ｃ４．エタノールで、工程Ｃ３から得られるヒアルロン酸のナトリウム塩の沈殿及び少なくとも１回の洗浄を行い、有機溶媒中、好ましくはアセトン中で、最終洗浄すること；

　Ｃ５．ヒアルロン酸のナトリウム塩を、好ましくは２５℃～４０℃で１５時間以上、真空下で乾燥させること。

＜１５＞　前記精製工程Ｃに先立って、前記抽出工程Ｂで得られたヒアルロン酸のナトリウム塩をエタノール中で沈殿し、溶媒を除去し、精製水中で沈殿を可溶化する、＜１４＞に記載の雄鶏のとさかからヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜１６＞

　収率が７５％～９０％の範囲にあり、得られるヒアルロン酸のナトリウム塩において、タンパク質の総量の最大値が０．０５％であり、毒素の最大値がエンドトキシン０．０２ＩＵ／ｍｇである、＜１＞～＜１５＞のいずれか１つに記載のヒアルロン酸のナトリウム塩を調製及び精製するプロセス。

＜１７＞　２９ｄｌ／ｇ以上の最終固有粘度（ＩＶ）を有する、＜１＞～＜３＞、＜１３＞及び＜１６＞のいずれか１つに記載のプロセスで調製及び精製されたヒアルロン酸のナトリウム塩。

＜１８＞　１７ｄｌ／ｇ～２４ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有する、＜５＞、＜９＞、＜１２＞及び＜１４＞～＜１６＞のいずれか１つに記載のプロセスで調製及び精製されたヒアルロン酸のナトリウム塩。

＜１９＞　１０ｄｌ／ｇ～１５ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有する、＜６＞、＜１０＞、＜１２＞及び＜１４＞～＜１６＞のいずれか１つに記載のプロセスで調製及び精製されたヒアルロン酸のナトリウム塩。

＜２０＞　３ｄｌ／ｇ～６ｄｌ／ｇの範囲内の最終固有粘度（ＩＶ）を有する、＜７＞、１１、１２及び１４～１６のいずれか１つに記載のプロセスで調製及び精製されたヒアルロン酸のナトリウム塩。

＜２１＞　ａ．関節炎の関節、外傷性関節損傷、軟骨下損傷の治療において；

　ｂ．眼疾患の治療において；

　ｃ．手術後の癒着の治療において；

　ｄ．皮膚潰瘍、床ずれ、火傷、傷あと、皮膚病変、ケロイド、凹型（ｈｙｐｏｔｒｏｐｈｉｃ）／肥厚性瘢痕、無傷又は損傷した皮膚を有するすべての種類の皮膚障害の治療において；

　ｅ．湿疹若しくは様々な種類の皮膚炎などの皮膚疾患、特にアトピー性皮膚炎、おむつかぶれ、乾癬の治療において；又は

ｆ．間質性膀胱炎の治療において
使用するための、＜１７＞～＜２０＞のいずれか１つに記載の医薬組成物、化粧組成物又は栄養組成物。
＜２２＞　皮膚美容分野における使用、又は形成外科における注入材（ｂｏｄｙ　ｓｈａｐｉｎｇ）としての使用のための、＜１７＞～＜２０＞のいずれか１つ以上に記載の医薬組成物又は化粧組成物。
＜２３＞　局所使用及び経口使用のための、＜１７＞～＜２０＞のいずれか１つ以上に記載の化粧組成物又は栄養組成物。
＜２４＞　関節炎の関節の経口治療、腱への栄養補給、皮膚への栄養補給又は胃腸粘膜への栄養補給における使用のための、＜１７＞～＜２０＞のいずれか１つ以上に記載の医薬組成物又は栄養組成物。
＜２５＞　好ましくは重金属塩、エステル、アミド、スルホネート又は架橋生成物であり、中でも自己架橋体であることが好ましい、ヒアルロン酸誘導体の調製のための＜１７＞～＜２０＞のいずれか１つ以上に従って調製及び精製されたヒアルロン酸のナトリウム塩。
＜２６＞　様々な起源の細胞及び／又は血液成分、例えば血小板派生物、を伴っていてもよい、パッド、織布、不織布、顆粒、フィルム又はゲルの形態にある二次元又は三次元の生体材料を調製するための、＜１７＞～＜２０＞及び＜２５＞のいずれか１つ以上に従って調製及び精製されたヒアルロン酸のナトリウム塩。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.　　　　　　　　　　　ＦＩ

Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ	*17/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/02	
Ａ６１Ｐ	*17/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/04	
Ａ６１Ｐ	*37/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08	
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06	
Ａ６１Ｐ	*13/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/10	
Ａ６１Ｋ	*35/12*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12	
Ａ６１Ｋ	*35/14*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/14	Ｚ
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５
Ａ６１Ｋ	*9/70*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/70	
Ａ６１Ｋ	*9/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/16	
Ａ６１Ｋ	*9/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/06	
Ａ２３Ｌ	*33/125*	*(2016.01)*	Ａ２３Ｌ	33/125	

(72)発明者　ボリーレ、　フランチェスコ
イタリア国　アイー３５０３１　パドヴァ　アーバノ　テルメ　ヴィア　ポンテ　デッラ　ファッブリカ　３／エー　フィディア　ファーマチェウティチ　エス．ピー．エー．内
(72)発明者　コルサ、　ビンチェンツァ
イタリア国　アイー３５０３１　パドヴァ　アーバノ　テルメ　ヴィア　ポンテ　デッラ　ファッブリカ　３／エー　フィディア　ファーマチェウティチ　エス．ピー．エー．内

審査官　大久保　智之

(56)参考文献　特表平０５－５０８１８３（ＪＰ，Ａ）
特表昭６２－５０１４７１（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００２／０１２０１３２（ＵＳ，Ａ１）
特開平０１－２６６１０２（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１５／０１５２４５９（ＵＳ，Ａ１）
特表２００５－５３６２０４（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５２２８５１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ
Ａ６１Ｋ
Ａ２３Ｌ
ＣＡｐｌｕｓ／ＷＰＩＤＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）