

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4264671号
(P4264671)

(45) 発行日 平成21年5月20日 (2009. 5. 20)

(24) 登録日 平成21年2月27日 (2009. 2. 27)

(51) Int. Cl.

F I

C O 8 B 37/08 (2006. 01)

A 6 1 K 31/728 (2006. 01)

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

A 6 1 P 29/00 (2006. 01)

A 6 1 K 8/73 (2006. 01)

C O 8 B 37/08 Z

A 6 1 K 31/728

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 29/00

A 6 1 K 8/73

請求項の数 23 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-533769

(86) (22) 出願日 平成8年5月8日 (1996. 5. 8)

(65) 公表番号 特表平11-504668

(43) 公表日 平成11年4月27日 (1999. 4. 27)

(86) 国際出願番号 PCT/EP1996/001979

(87) 国際公開番号 W01996/035720

(87) 国際公開日 平成8年11月14日 (1996. 11. 14)

審査請求日 平成15年5月6日 (2003. 5. 6)

(31) 優先権主張番号 PD95A000090

(32) 優先日 平成7年5月10日 (1995. 5. 10)

(33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(73) 特許権者

フィディア ファルマチェウティチ ソシ
エタ ペル アチオニ
イタリア国、アバノ テルメ、ヴィア ポ
ンテ デッラ ファップリカ 3/エイ

(74) 代理人

弁理士 山下 穰平

(72) 発明者 カーン リアズ

イギリス バークシャー アールジー4
6ティーエイ ソーニング オールド バ
ス ロード (番地なし) “ラムジー”

(72) 発明者 コノウイツ エイ ポール

イギリス サリー ジーユー9 Oアール
2 ファーナム フォーリー ヒル アン
ブルサイド クレッセント 12

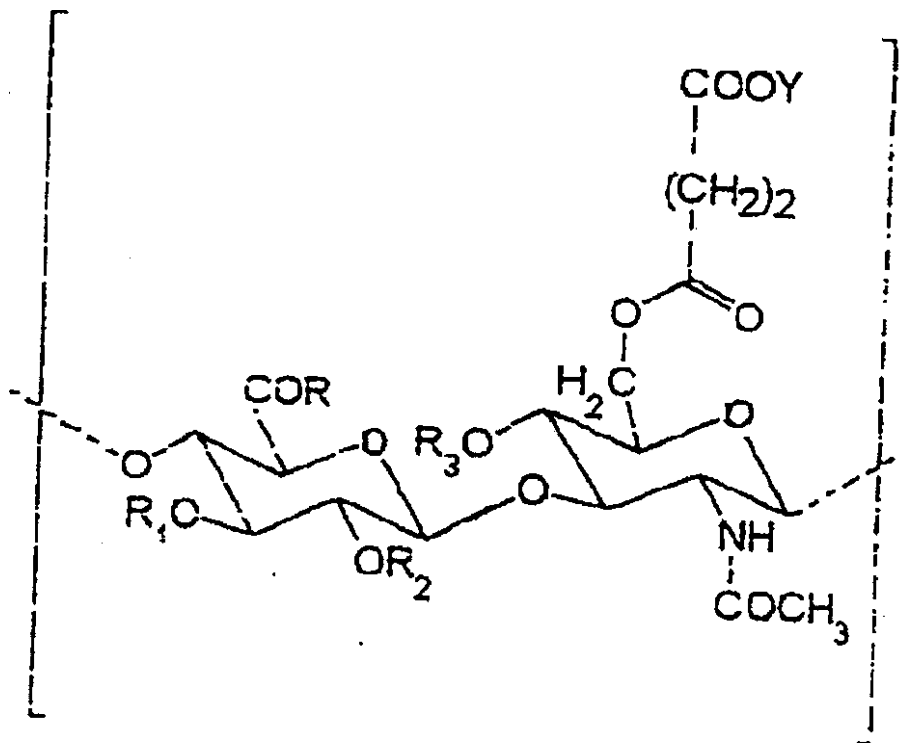
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩類、それらの製造方法及びその医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の繰り返しユニット (I) を有する、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステル：



10

20

(I)

(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ同一でも異なってもよく、 H 又は $CO(CH_2)_2 - COOY$ であり、その式中、 Y は、陰電荷又は H であり、 R は、 OH 、 $O-$ 又はアルコール残部である)。

【請求項2】

30

繰り返しユニット(I)において、 $R_1 = R_2 = R_3 = H$ である請求項1に記載のコハク酸ヘミエステル。

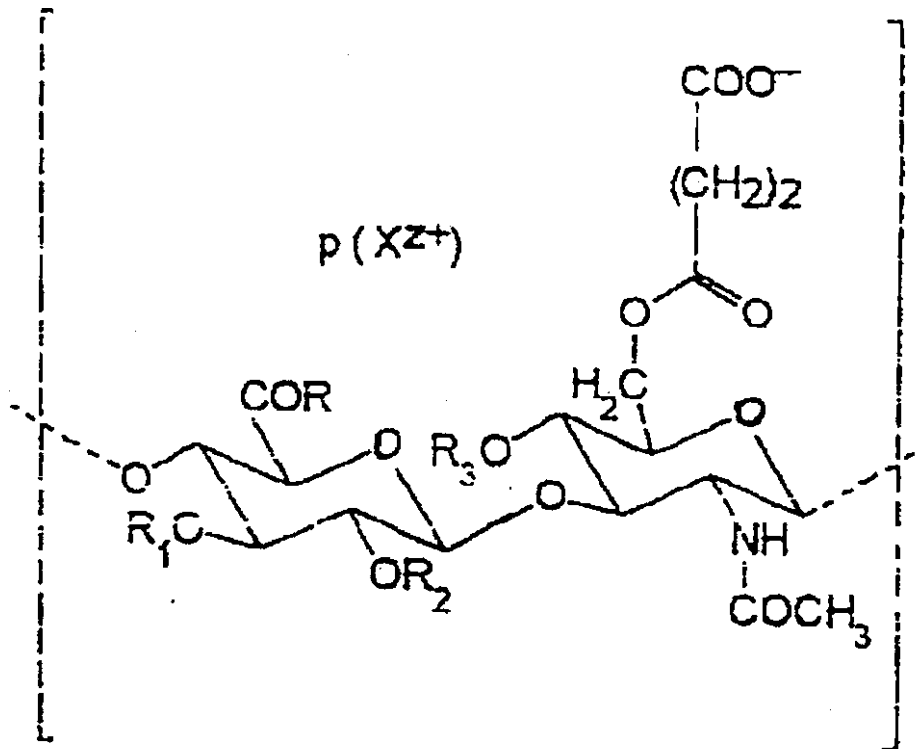
【請求項3】

少なくとも1種の繰り返しユニット(I) ($R_1 = R_3 = H$ であり、 $R_2 = CO(CH_2)_2 - COOY$ である)、及び少なくとも1種の繰り返しユニット(I) ($R_2 = R_3 = H$ であり、 $R_1 = CO(CH_2)_2 - COOY$ である)を有する請求項1に記載のコハク酸ヘミエステル。

【請求項4】

以下の繰り返しユニット(II)を有する、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩：

40



10

20

(II)

(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ同一でも異なってもよく、 H 又は $CO(CH_2)_2COO^-$ であり、 R は、 O^- 又はアルコール残部であり、 (X^{Z+}) は、重金属のカチオン(Z は1~6である)であり、 p は、0.1~5の数であり、但し、 $p(X^{Z+})$ は、該繰り返しユニット中に存在するアニオン基 COO^- の数と等しい)。

【請求項5】

X が Ag 、 Cu 、 Zn 、 Au 、 Ce 、 W からなる群から選択された請求項4に記載の重金属塩。

30

【請求項6】

$R_1 = R_2 = R_3 = H$ であり、 X が銀、金、銅、亜鉛からなる群から選択され、 Z が1~3の整数であり、 p が0.3~2からなる請求項4又は5に記載の重金属塩。

【請求項7】

少なくとも1種の繰り返しユニット(II)($R_1 = R_3 = H$ であり、 $R_2 = CO(CH_2)_2COO^-$ である)、及び少なくとも1種の繰り返しユニット(II)($R_2 = R_3 = H$ であり、 $R_1 = CO(CH_2)_2COO^-$ である)を有し、 X が銀、金、銅、亜鉛からなる群から選択され、 Z が1~3であり、 p が0.6~3からなる請求項4、5又は6のいずれか1項に記載の重金属塩。

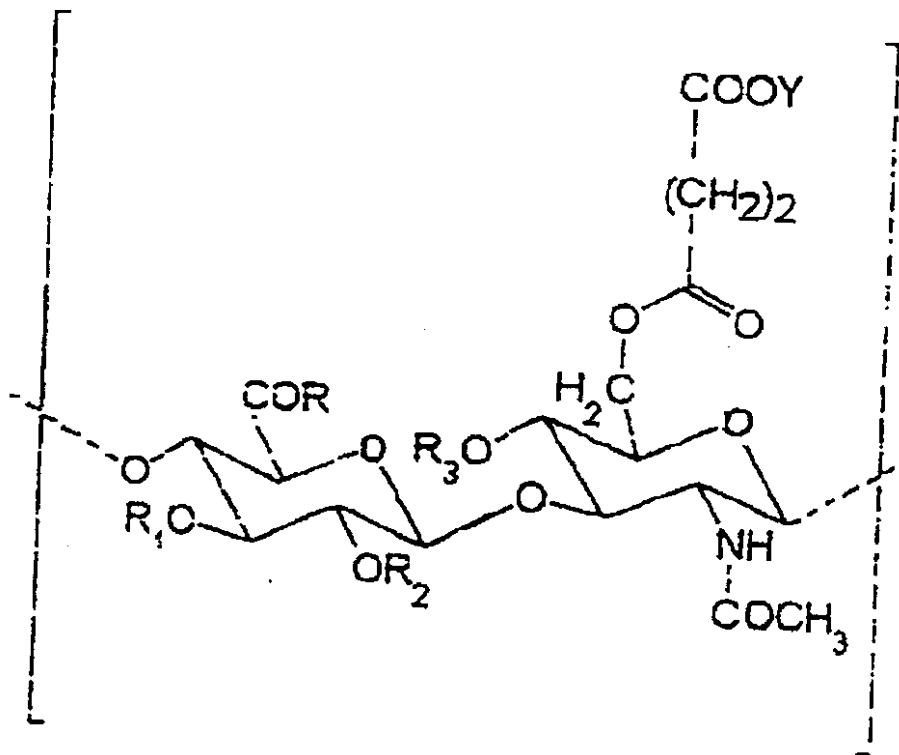
【請求項8】

40

以下の工程を含む請求項4、5、6又は7のいずれか1項に記載の、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩の製造方法：

a) ヒアルロン酸ナトリウム塩を、水及び非プロトン性溶媒の存在下で、ピリジニウム、テトラアルキルアンモニウム、テトラアリールアンモニウム、テトラアルキルホスホニウム、テトラアリールホスホニウム塩からなる群から選択された塩に転化すること、

b) 工程(a)で得た溶液を、触媒としての有機塩基の存在下においてコハク酸無水物を用いて処理し、ピリジニウム、テトラアルキルアンモニウム、テトラアリールアンモニウム、テトラアルキルホスホニウム、又はテトラアリールホスホニウムカチオンを透析により除去し、それにより、少なくとも1種の繰り返しユニット(I)



10

20

(I)

(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 はそれぞれ同一でも異なってもよく、 H 又は $CO(CH_2)_2 - COOY$ であり、その式中、 Y は、陰電荷又は H であり、 R は、 OH 、 O^- 又はアルコール残部であり、但し、1種の繰り返しユニット(I)においては、少なくとも、 R が OH 又は O^- である)

30

を有する、ヒアルロン酸との又はそれらの部分エステルとのコハク酸ヘミエステルを得ること、及び任意に、得られた生成物を凍結乾燥により回収すること、

c) 前述の工程で得た溶液、又は前述の工程で得た回収固形生成物の水溶液を重金属の無機塩の水溶液で処理し、濾過及び減圧乾燥により生成物を回収すること。

【請求項9】

工程(a)において、ヒアルロン酸を、以下の作業条件を用いることにより、そのピリジニウム塩に転化する請求項8に記載の方法：

i) 水及びジメチルホルムアミドの混合物中において、ヒアルロネートナトリウム塩を溶解させること、

40

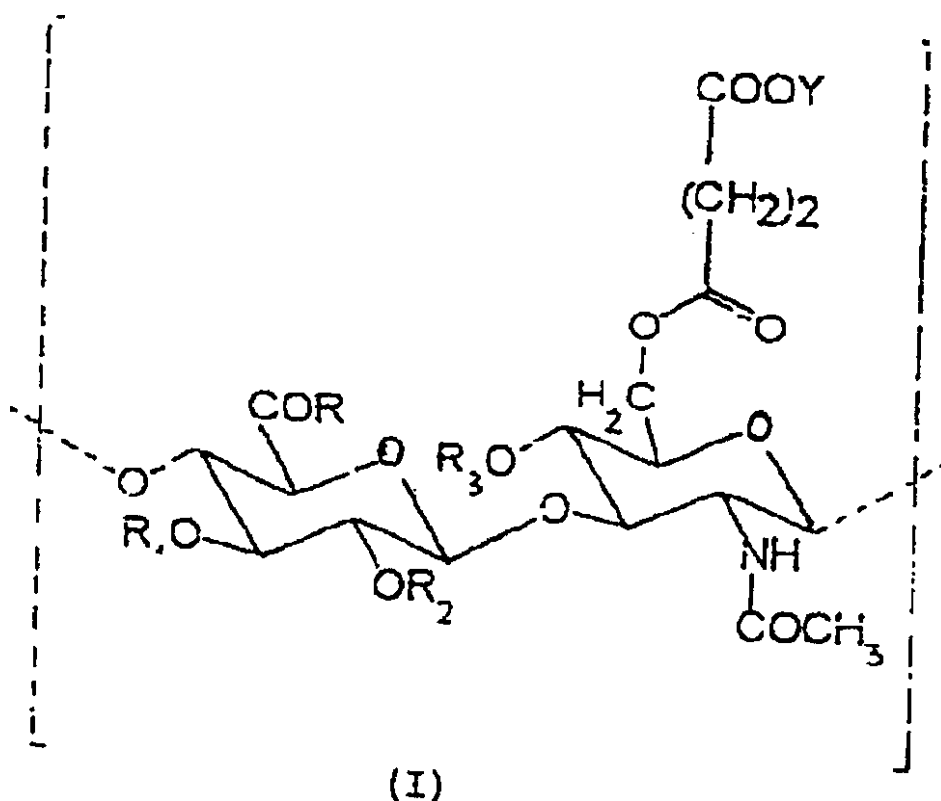
ii) カチオン交換樹脂で処理して、その遊離ヒアルロン酸を得ること、

iii) 反応混合物をピリジンにより中和し、それにより、ピリジニウム塩を得ること。

【請求項10】

以下の工程を含む、ヒアルロン酸の全エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩を製造する方法：

b') 水及び非プロトン性溶媒の混合物中に溶解又は懸濁されたヒアルロン酸エステルを、有機塩基の存在下においてコハク酸無水物を用いて処理し、それにより、以下の繰り返しユニット(I)を有するコハク酸ヘミエステルを得ること、及び任意に、得られた生成物を凍結乾燥により回収すること：



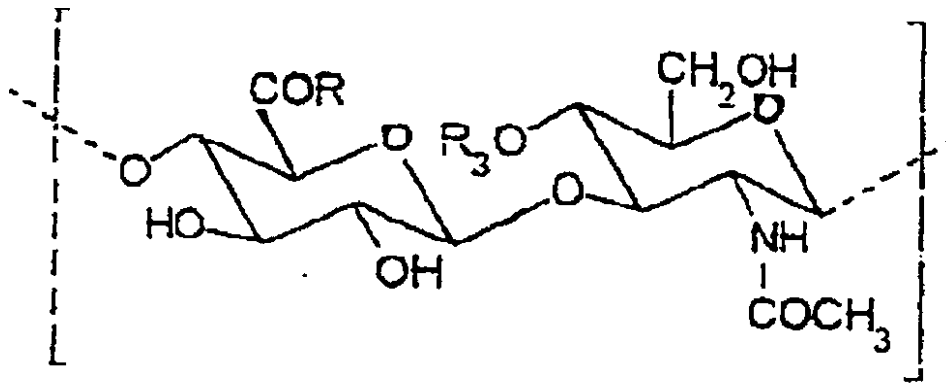
(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ同一でも異なってもよく、 H 又は $CO(CH_2)_2COOY$ であり、その式中、 Y は、陰電荷又は H であり、 R は、アルコールの残部である)

c') 前述の工程で得た溶液、又は前述の工程で得た回収固形生成物の水溶液を重金属の無機塩の水溶液で処理し、濾過及び減圧乾燥により生成物を回収すること。

【請求項 11】

請求項 8 又は 9 に記載のヒアルロン酸との若しくはヒアルロン酸の部分エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩の製造方法、又は請求項 10 に記載のヒアルロン酸の全エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩を製造する方法であって、

工程 (b) 又は (b') を、以下の出発材料ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の部分エステルの繰り返しユニット (III) におけるコハク酸無水物 / 遊離 OH 基のモル比を 15 ~ 90 とし、70 で行い、その触媒を、4-ジメチルアミノピリジン、ピリジン又はそれらの混合物からなる群から選択する



10

(III)

(式中、Rは、OH、O - 又はアルコール残部であり、 R_3 は、H又は $\text{CO}(\text{CH}_2)_2 - \text{COOY}$ であり、その式中、Yは、陰電荷又はHである)ことを特徴とする方法。

20

【請求項12】

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルのAg塩を製造するための、請求項8、9、10又は11のいずれか1項に記載の方法であって、工程(c)又は(c')において、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステル又はヒアルロン酸の部分又は全エステルとのコハク酸ヘミエステルを、硝酸銀の水溶液で処理する該方法。

【請求項13】

ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルのZn塩を製造するための、請求項8、9、10又は11のいずれか1項に記載の方法であって、工程(c)又は(c')において、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分又は全エステルとのコハク酸ヘミエステルを、 ZnCl_2 で処理する該方法。

30

【請求項14】

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルのCu塩を製造するための、請求項8、9、10又は11のいずれか1項に記載の方法であって、工程(c)又は(c')において、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステル又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルを、 CuCl_2 の水溶液で処理する該方法。

【請求項15】

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルのAu塩を製造するための、請求項8、9、10又は11のいずれか1項に記載の方法であって、工程(c)又は(c')において、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステル又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルを、 HAuCl_4 の水溶液で処理する該方法。

40

【請求項16】

活性成分として、請求項4、5、6又は7のいずれか1項に記載のヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分又は全エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩を少なくとも1種を含む治療組成物。

【請求項17】

火傷、傷又は眼炎の治療用の、請求項16に記載の治療組成物。

【請求項18】

軟膏、クリームジェルの形態である請求項16又は17に記載の治療組成物。

【請求項19】

50

活性成分として、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の部分又は全エステルとのコハク酸ヘミエステルのA g 塩を含む請求項 1 6、1 7 又は 1 8 に記載の治療組成物。

【請求項 2 0】

骨関節炎の治療用の、請求項 1 6 に記載の治療組成物。

【請求項 2 1】

活性成分として、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩少なくとも 1 種であって、A u、C u 及び Z n 又はそれらの混合物の塩からなる群から選択された塩を含む請求項 1 6 又は 2 0 に記載の治療組成物。

【請求項 2 2】

化粧クリーム及び軟膏、シェイピング及びアフターシェイピングローション及びヘアーローションを調製するための殺菌剤としての、請求項 4、5、6 又は 7 のいずれか 1 項に記載の重金属塩の使用。

【請求項 2 3】

請求項 4、5、6 又は 7 のいずれか 1 項に記載の重金属塩を少なくとも 1 種含み、膜、不織組織及びガーゼから選択される生体材料。

【発明の詳細な説明】

発明の技術分野

本発明は、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステル、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩、それらの製造方法、及びこれらの塩類を活性成分として含む医薬組成物に関するものである。

発明の技術背景

ヒアルロン酸は、1, 4 - β - D - グルクロン酸及び 1, 3 - β - N - アセチル - D - グルコサミンのユニットが交互に配列された鎖を有するポリサッカライドである。ヒアルロン酸は、例えば、動物の皮膚及び軟骨に存在する結合組織の主要成分である。それは、また、ヘその緒、滑液及び目の硝子体液中に高濃度で存在することが知られている。現在、連鎖球菌培養によるヒアルロン酸の産生が広まってきているとはいえ、ヒアルロン酸源は、好ましくは、とさかから抽出される (T.J.Lieselang.Survey of Ophthalmology 34,268-293,1990)。

ヒアルロン酸は、結合組織の主要成分であるので、それは、生体適合性であり、生体吸着性であり、抗原でない。従って、それは組織の水分補強、軟骨におけるプロテオグリカンの構築、組織回復、胚の発達、及び関節軟骨 (joint cartilage) の潤滑及び保護等の多くの生物学的機能において重要な役割を果たす。このポリサッカライドは、通常、数種の関節病 (リウマチ様関節炎等) の治療の際に使用される。それは、また、微粘性手術 (microviscosurgery)、特に目の手術の際に使用される。

関節の炎症のケースでは、ヒアルロン酸が、スーパーオキシドラジカルにより崩壊される (Greenwald R.A.らのInflammation,10,15-30,1986)。この崩壊により、滑液の流動学的及び粘弾性的特性についての著しい低減、特に顕著には、軟骨上におけるヒアルロン酸が有する潤滑性及び保護作用の低減が測定される。スーパーオキシドジムスターゼは、炎症の際に生じるスーパーオキシドラジカルにより引き起こされるダメージに対するメインディフェンスと事実上同等であると仮定されている。銅及び亜鉛が、スーパーオキシドジムスターゼの成分であり、その作用は、内因性スーパーオキシドラジカルの毒作用から細胞を保護することであると思われる。

リウマチ様関節炎は、亜鉛の欠乏と関連しており、亜鉛自身の炎症活性が仮定されている (A.Frigoらの "Copper and Zinc in Inflammation", Inflammation and drug therapy series, Vol. IV, Kluwer Academic Publishers, pp.133-142, 1989)。硫酸亜鉛での治療は、乾癬の患者の関節炎により引き起こされる関節障害の制御に有効であることが証明されている。

同様に、銅濃度の変化が、関節炎症の患者に観察されている (C.W.Denko, "Copper and Zinc in Inflammation", Inflammation and drug therapy series, Vol. IV, Kluwer Academi

10

20

30

40

50

c Publishers, pp.1-5, 1989)。銅ベースの化合物が、リウマチ様関節炎の治療に使用されており、それらの活性は、銅イオンによるものである。

また、金塩が、公知のステロイド及び非ステロイドタイプの抗炎症剤と共に、関節炎の治療に使用される(US 4,746,504)。

フッ化銀、ヨウ化銀及び乳酸銀等の多くの銀塩は、局所用の抗菌性物質として使用されている。それらの抗菌作用は、 Ag^+ イオンの作用によるものである。

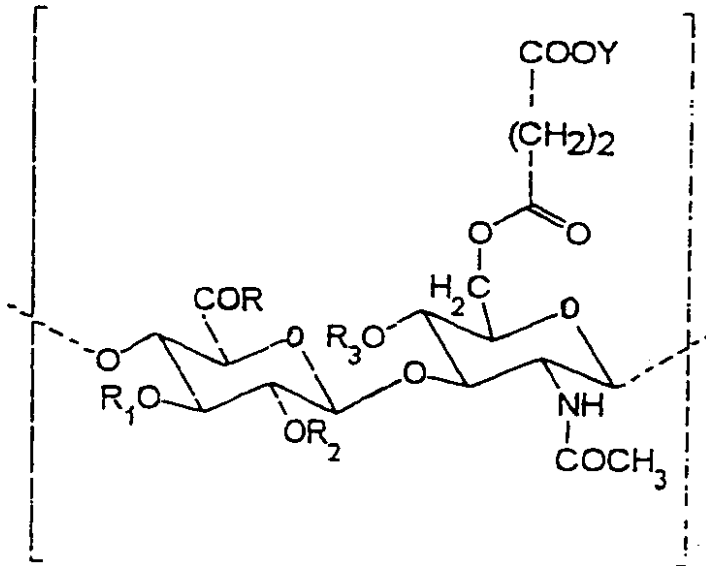
ヒアルロン酸の重金属塩(銀、金、セリウム及びタングステン等のもの)は、既に、当該技術分野において知られている。ヒアルロン酸ナトリウム水溶液と硝酸銀溶液環の反応により、ヒアルロン酸の銀塩が得られる。これらの全化合物を含む医薬調製物が使用されて、火傷、傷及び数種の目の感染(淋菌誘導結膜炎等)の治療が促進される(A.Nimrod and B.Greenman, USP No.4,746,504 (1988年5月24日))。

しかしながら、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステル誘導体(その1, 4- β -D-グルクロン酸及び1, 3- β -N-アセチル-D-グルコサミン交互繰り返しユニットの1以上のヒドロキシ官能基が、コハク酸のカルボキシル基でエステル化されて、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルのコハク酸ヘミエステルが形成される)のいずれも、当該技術分野において知られていない。

本発明の概要

本発明は、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステル、及び重金属とのその無機塩に関するものである。

具体的には、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステルは、以下の繰り返しユニット(I)を有することにより特徴付けられる：

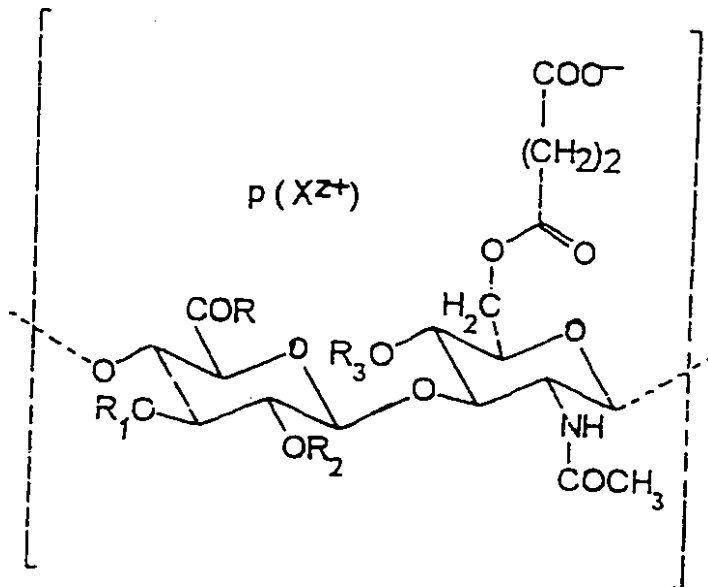


(I)

(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ同一でも異なっていてもよく、H又は $CO(CH_2)_2-COOY$ であり、その式中、Yは、陰電荷又はHであり、Rは、OH、 O^- 又はアルコール残部である)。

コハク酸ヘミエステルを調製することが意図されたヒアルロン酸エステルは、脂肪族又は脂環式アルコールとの部分又は全エステルである(それは、それ自体、USP 4,851,521に開示された注目すべき作用を有さず、かかる文献は、本件明細書に含まれるものとする)。

ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステルの重金属塩は、具体的には、以下の繰り返しユニット(II)を有することにより特徴付けられる：



10

(II)

(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ同一でも異なっていてもよく、 H 又は $CO(CH_2)_2 - COO^-$ であり、 R は、 O^- 又はアルコール残部であり、 (X^{Z+}) は、重金属のカチオン(Z は1~6である)であり、 p は、0.1~5の整数又は少数であり、但し、 $p(X^{Z+})$ は、該繰り返しユニット中に存在するアニオン基 COO^- の数と等しい)。本発明の重金属塩は、出発物質ヒアルロネートのその重金属塩より、かなり高い陰電荷密度を有することにより特徴付けられる。実際、新規な置換基(即ち、コハク酸)は、理論的に、繰り返しユニットの全アルコール官能基に結合可能であり、1つの繰り返しユニットあたり4つまでのコハク酸基、従って、塩の形成に利用可能な陰電荷を4つ多く含むポリサッカライドが提供される。

20

30

更に、本発明は、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分若しくは全エステルとのコハク酸ヘミエステル、及びその重金属塩を調製するための製造方法に関するものである。

この方法は、具体的には、以下の工程を含む：

a) ヒアルロン酸ナトリウム塩を、水及び非プロトン性溶媒の存在下で、ピリジニウム、テトラアルキルアンモニウム、テトラアリアルアンモニウム、テトラアルキルホスホニウム、テトラアリアルホスホニウム塩からなる群から選択された塩に転化すること、

b) 工程(a)で得た溶液を、触媒としての有機塩基の存在下においてコハク酸無水物を用いて処理し、ピリジニウム、テトラアルキルアンモニウム、テトラアリアルアンモニウム、テトラアルキルホスホニウム、又はテトラアリアルホスホニウムカチオンを透析により除去し、それにより、繰り返しユニット(I)を有するコハク酸ヘミエステル(但し、該繰り返しユニット(I)の少なくとも1種は、 $R = OH$ 又は O^- を有する)を得ること(更に、得られた生成物を凍結乾燥により回収してもよい)、

40

c) 前述の工程から得られた溶液、又は前述の工程から得られた回収固形生成物の水溶液を重金属の無機塩の水溶液で処理し、濾過及び減圧乾燥により生成物を回収すること。

ヒアルロン酸の全エステルのコハク酸ヘミエステルとの重金属塩の製造では、本発明の方法には、以下の工程が意図される：

b') 水及び非プロトン性溶媒の混合物中に溶解又は懸濁されたヒアルロン酸エステルを、触媒としての有機塩基の存在下においてコハク酸無水物を用いて処理し、それにより、繰り返しユニット(I)(式中、 R は、アルコールの残部である)を有するコハク酸ヘミエステルを得ること(更に、得られた生成物を凍結乾燥により回収してもよい)、

50

c') 前述の工程から得られた溶液、又は前述の工程から得られた回収固形生成物の水溶液を重金属の無機塩の水溶液で処理し、濾過及び減圧乾燥により生成物を回収すること。本発明のヒアルロン酸との又は部分的又は全体的なヒアルロン酸エステルとのコハク酸の重金属塩を、抗菌剤や殺菌剤として使用して、傷、火傷及び眼炎の治療を有効に進めることができ、又はそれらを、同様の治療作用を有する他の薬理学的に活性な物質1以上と共に、適切な医薬形態のものに導入することができる。

また、それらは、望ましくは、薬剤の製造用の殺菌剤として使用可能であるばかりでなく、化粧クリーム及び軟膏、シェイビング及びアフターシェイビングローション及びヘアローション等のいわゆるヘルスケア製品、生体材料（膜不織組織（membranes non-woven tissue）、ガーゼ等）の製造用の活性成分として使用することができる。また、望ましくは、ヒアルロン酸のスクシニルモノエステルの重金属の塩は、同様の治療作用を有する、他の医薬的活性成分との組合せで、関節に影響する関節炎及び炎症の治療用抗炎症剤として使用することができる。

本発明の詳細な説明

用語“重金属”は、周期表の第4～6周期の全医薬活性金属を含む。

本発明で好ましい重金属塩は、カチオンが、亜鉛、銀、銅、金、セリウム及びタングステンであるヒアルロン酸のコハク酸誘導体の塩である。

事実、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分エステルとのその塩についての比較では、これらの塩により、重金属塩を含む公知化合物より優れた利点が提供される。なぜなら、本発明の塩は、多くの重金属カチオンに結合可能であるからである。確かに、ヒアルロン酸は、繰り返しユニットあたりカウンターイオン（counter-ion）を1つのみに結合し得るが、本発明の塩は、繰り返しユニットあたり少なくとも2倍のカウンターイオンと結合する。

従って、次に定義及び記載した治療のための、高濃度の金属とのこれらの重金属塩を使用することが望ましく、なぜなら、これが、製造において最も有効な成分であるからである。

いかなる分子量のヒアルロン酸又はヒアルロン酸エステルも、それらのスクシニル誘導体を製造するために使用することができる。本発明においては、3,000～760,000ドルトンの分子量を有するヒアルロン酸のサンプルを使用した。この範囲は、本発明の目的のためには臨界的なものではない。

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸エステルとの好ましいコハク酸ヘミエステルは、少なくとも1種の繰り返しユニット（I）（ $R_1 = R_2 = R_3 = H$ である）及びその金属塩（そのユニット（II）において、Xが、銀、金、銅、亜鉛からなる群から選択され、Zが、1～3からなり、pが、0.3～2からなる）を有するものである。

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸エステルとの、他の好ましいコハク酸ヘミエステルは、少なくとも1種の繰り返しユニット（I）（ $R_1 = R_3 = H$ であり、 $R_2 = CO - (CH_2)_2 - COOY$ である）及び少なくとも1種の繰り返しユニット（ $R_2 = R_3 = H$ であり、 $R_1 = CO - (CH_2)_2 - COOY$ であり、上述のもの）を有するものであり、その重金属塩は、少なくとも1種の繰り返しユニット（II）（ $R_1 = R_3 = H$ であり、 $R_2 = CO(CH_2)_2 - COO^-$ である）及び少なくとも1種の繰り返しユニット（II）（ $R_2 = R_3 = H$ であり、 $R_1 = CO(CH_2)_2 - COO^-$ である）を有するものであり、Xは銀、金、銅、亜鉛からなる群から選択され、Zは1～3からなり、Pは0.6～3からなる。

ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸の部分エステルとのコハク酸ヘミエステルを製造するための本発明の方法では、工程（a）において、好ましくは、ヒアルロン酸を、そのピリジニウム塩に転化する。具体的には、この転化は、水及びジメチルホルムアミドの混合物中におけるヒアルロン酸ナトリウム塩の溶解（先に記載）、及びその遊離ヒアルロン酸を得るためのカチオン交換樹脂での処理を包含する。樹脂の除去後、溶液を、ピリジンで中和し、ピリジニウム塩を得る。工程（b）及び（b'）の両方の工程において、コハク酸無水物の量は、臨界的なものではないが、ヒアルロン酸については過剰量（high excess）で添加するのが好ましい。事実、最良の結果は、出発材料ヒアルロン酸又はヒアルロン

10

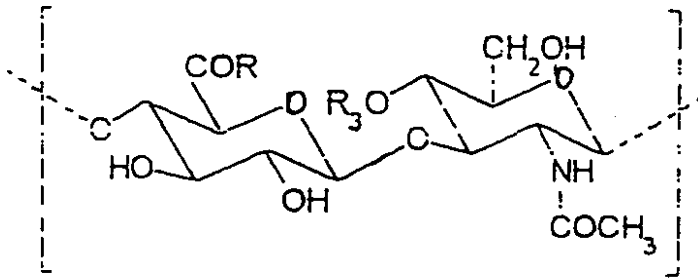
20

30

40

50

酸の部分エステルを繰り返すユニット (III) 中に存在するコハク酸無水物 / 遊離 OH 基のモル比が 15 ~ 90 である場合に得られる：



10

(III)

(式中、Rは上述のものである)。温度は臨界的なものではないが、最良の結果は、工程 (b) 又は (b') の両方の工程を 70 で行う場合に得られる。工程 (b) 又は (b') の両方の工程において触媒として使用する有機塩基の好ましいものは、4 - ジメチルアミノピリジン、ピリジン又はそれらの混合物からなる群から選択されたものである。多量の 4 - ジメチルアミノピリジンを用いることにより、スクシニル化 (succinylation) の程度が高い、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルが得られ、ピリジンを単独又は少量の 4 - ジメチルアミノピリジンと組合せて使用することにより、スクシニル化の程度の低い、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステルが得られる。反応条件 (温度、反応時間等) を強くすればするほど、形成される誘導体のエステル化の程度が高くなる。

20

ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの Ag 塩の製造について、工程 (c) 又は (c') において、好ましくは、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステル又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルを硝酸銀で処理して、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの銀塩を形成する。本発明の Ag 塩は、溶液から沈殿し、濾過又は遠心分離により回収される。沈殿物は、その後、エタノールを用いて洗浄され、40 で減圧乾燥される。スクシニル誘導体の銀化合物は、完全な黒色である。硝酸銀溶液を製造するための、及びスクシニルシルバーヒアルロネートを製造するための全ての作業は暗下で行い、得られる生成物は、光源から遠ざけて貯蔵した。

30

ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの Cu 塩の製造について、工程 (c) 又は (c') の両方において、好ましくは、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステル又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルを CuCl_2 水溶液で処理して、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの Cu 塩を形成する。

ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの Zn 塩の製造について、工程 (c) 又は (c') の両方において、好ましくは、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステル又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルを ZnCl_2 水溶液で処理して、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの Zn 塩を形成する。

40

ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの Au 塩の製造について、工程 (c) 又は (c') の両方において、好ましくは、ヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステル又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルを HAuCl_4 水溶液で処理して、ヒアルロン酸との又はヒアルロン酸エステルとのコハク酸ヘミエステルの Au 塩を形成する。

火傷、傷及び眼炎の治療用の、本発明の医薬組成物は、好ましくは、本発明の Ag 塩を含

50

み、かつ更に、軟膏、クリームジェルの形態である。

骨関節炎の治療用の医薬組成物は、好ましくは、A u、Z n、C u 塩又はそれらの混合物を含む。

以下に、o - スクシニルヒアルロネート及びその重金属塩の製造の実施例を幾つか記載するが、これらの実施例で具体的に記載していない変更も、本発明の範囲を逸脱しないとされるであろう。

繰り返しユニット (I) を有するヒアルロン酸とのコハク酸ヘミエステルの製造方法の例
実施例 1 :

蒸留水 (35m l) 中のヒアルロン酸ナトリウム (H A - N a、1 g、M W 160,000) 及び N , N - ジメチルホルムアミド (D M F、100m l) の溶液を、10分間、イオン交換樹脂 (3 G、I R 120 H +) の存在下において攪拌し、その後その樹脂を、D M F (100m l) での更なる希釈後に、濾過により除去した。溶液を、その後、過剰量のピリジン (10m l) を用いて中和して、ヒアルロン酸のピリジン塩 (H A - P y) を得た。粘稠溶液を、その後、減圧下において慎重に蒸発させて、存在する水を除去した (溶液の全量が、約 100m l 未満とならないように注意した)。この手順を 3 度繰り返し、各々において、D M F (20m l) を加えた。溶液を、その後、室温で 24 時間攪拌しながら、コハク酸無水物 (3 g) 及びピリジン (10m l) で処理した。その後、反応混合物を濃縮し、蒸留水 (20m l) を用いて集め、蒸留水で透析し (750m l で 3 度)、凍結乾燥させて、ヒアルロン酸スクシニレートを得た (930m l)。

表 1 は、サンプル 1 の ^{13}C .n.m.r. (50.3MHz) スペクトルの化学シフト値を示す。

10

20

表 1

δ ppm における化学シフト	非改質HA	改質HA	他の基
101.49	N-1		
55.19	N-2		
83.30	N-3		
69.30	N-4		
76.23	N-5		
61.99	N-6		
103.82	G-1		
73.21	G-2		
79.98	G-3		
80.81	G-4		
76.23	G-5		
173.84	G-6		
175.63	N=C=O		
102.50		N-1	
83.00		N-3	
73.85		N-5	
64.08		N-6	
71.74		G-2	
29.79 29.91			CH ₂ スクシネート
173.35 177.71			C=Oスクシネート

N . M . R . 分析により、N - アセチルグルコサミンの炭素 6 (N - 6) のスクシニル化の程度0.2が示される (ポリマーのコハク酸のモル / 繰り返しユニットのモル) 。

実施例 2 :

蒸留水 (35m l) 中のヒアルロン酸ナトリウム (HA - Na、1 g、MW30,000) 及び N , N - ジメチルホルムアミド (DMF、100m l) の溶液を、10分間、イオン交換樹脂 (3 G、I R 120 H +) の存在下において攪拌し、その後、その樹脂を、DMF (100m l) での更なる希釈後に、濾過により除去した。溶液を、その後、過剰量のピリジン (10m l) を用いて中和して、ヒアルロン酸のピリジン塩 (HA - Py) を得た。粘稠溶液を、その後、減圧下において慎重に蒸発させて、存在する水を除去した (溶液の全量が、約10

0m l 未満とならないように注意した)。この手順を3度繰り返し、各々において、DMF (20m l) を加えた。溶液を、その後、24時間70 で攪拌しながら、コハク酸無水物 (3 g) 及びピリジン (10m l) で処理した。その後、反応混合物を濃縮し、蒸留水 (20m l) を用いて集め、蒸留水で透析し (750m l で3度)、凍結乾燥させて、ヒアルロン酸スクシニレートを得た (900m l)。

表2は、サンプル2の ^{13}C ;n.m.r. (50.3MHz) スペクトルの化学シフト値を報告するものである。

表2

δ ppm における化学シフト	非改質HA	改質HA	他の基
101.77	N-1		
54.33	N-2		
82.91	N-3		
69.93	N-4		
76.31	N-5		
60.95	N-6		
102.77	G-1		
72.58	G-2		
73.88	G-3		
80.94	G-4		
74.13	G-5		
170.00	G-6		
171.83	N=C=O		
102.50		N-1	
83.00		N-3	
73.85		N-5	
63.36		N-6	
70.73		G-2	
28.79			CH ₂ スクシネート
168.98 173.00			C=Oスクシネート

N . M . R . 分析により、N - アセチルグルコサミンの炭素6 (N - 6) のスクシニル化の程度0.45が示される (コハク酸のモル / 繰り返しユニットのモル)。

実施例 3 :

蒸留水 (35m l) 中のヒアルロン酸ナトリウム (H A - N a、0.5 g、MW160,000) 及び N, N - ジメチルホルムアミド (D M F、100m l) の溶液を、10分間、イオン交換樹脂 (3 G、I R 120 H +) の存在下において攪拌し、その後、その樹脂を、D M F (75m l) での更なる希釈後に、濾過により除去した。溶液を、その後、過剰量のピリジン (6 m l) を用いて中和して、ヒアルロン酸のピリジン塩 (H A - P y) を得た。粘稠溶液を、その後、減圧下において慎重に蒸発させて、存在する水を除去した (溶液の全量が、約50 m l 未満とならないように注意した)。この水除去手順を3度繰り返し、各々において、D M F (10m l) を加えた。その後、溶液を48時間70 で攪拌しながら、コハク酸無水物 (2 g)、4 - ジメチルアミノピリジン (10m l) 及びピリジン (10m l) で処理した。追加のコハク酸無水物 (1 g) を添加し、ピリジン (2.5m l) 及び混合物を、更に、24 時間攪拌した。反応混合物を、その後、濃縮し、蒸留水 (20m l) を用いて集め、蒸留水で透析し (750m l で3度)、凍結乾燥させて、ヒアルロン酸スクシニレートを得た (450 m l)。その生成物は、水に溶解された時の高粘性で特徴付けられ、具体的な n . m . r . スペクトルは、そのサンプルの高粘性による幅広いピークで特徴付けられる。改質の程度は、電位差アッセイにより測定し、1.8 (コハク酸のモル / 繰り返しユニットのモル) であることが分かった。

10

実施例 4 :

蒸留水 (60m l) 中のヒアルロン酸ナトリウム (H A - N a、0.5 g、MW240,000) 及び N, N - ジメチルホルムアミド (D M F、60m l) の溶液を、10分間、イオン交換樹脂 (1 G、I R 120 H +) の存在下において攪拌し、その後、その樹脂を、D M F (50m l) での更なる希釈後に、濾過により除去した。溶液を、その後、過剰量のピリジン (6 L) を用いて中和して、ヒアルロン酸のピリジン塩 (H A - P y) を得た。粘稠溶液を、その後、減圧下において慎重に蒸発させて、存在する水を除去した (溶液の全量が、約100m l 未満とならないように注意した)。この水除去手順を3度繰り返し、各々において、D M F (20m l) を加えた。ゼラチン様溶液を、その後、18時間70 で攪拌しながら、コハク酸無水物 (2 g)、ピリジン (5 m l) で処理した。追加のコハク酸無水物 (2.5 g) を添加し、4 - ジメチルアミノピリジン (200m g) を添加し、混合物を、更に、24時間攪拌した。反応混合物を、その後、濃縮し、蒸留水 (20m l) を用いて集め、凍結乾燥させて、ヒアルロン酸スクシニレートを得た (450m l)。その生成物は、水に溶解された時の高粘性で特徴付けられ、具体的な n . m . r . スペクトルは、そのサンプルの高粘性によるかなり幅広いピークで特徴付けられる。改質の程度は、電位差アッセイにより測定し、2.5 (コハク酸のモル / 繰り返しユニットのモル) であることが分かった。

20

30

実施例 5 :

蒸留水 (60m l) 中のヒアルロン酸ナトリウム (H A - N a、1 g、MW40,000) 及び N, N - ジメチルホルムアミド (D M F、60m l) の溶液を、10分間、イオン交換樹脂 (1 G、I R 120 H +) の存在下において攪拌し、その後、その樹脂を、D M F (50m l) での更なる希釈後に、濾過により除去した。溶液を、その後、過剰量のピリジン (10m l) を用いて中和して、ヒアルロン酸のピリジン塩 (H A - P y) を得た。粘稠溶液を、その後、減圧下において慎重に蒸発させて、存在する水を除去した (溶液の全量が、約50m l 未満とならないように注意した)。この水除去手順を3度繰り返し、各々において、D M F (20m l) を加えた。その後、溶液を18時間70 で攪拌しながら、コハク酸無水物 (3 g)、ピリジン (10m l) で処理した。追加のコハク酸無水物 (2.5 g) を添加し、4 - ジメチルアミノピリジン (200m g) を添加し、混合物を、更に、24時間攪拌した。反応混合物 (茶色であった) を、その後、濃縮し、蒸留水 (20m l) を用いて集め、蒸留水で透析し (750m l で3度)、凍結乾燥させて、ヒアルロン酸スクシニレートを得た (850m l)。スクシニレート化の程度を、電位差アッセイにより測定したところ、3.5であった (コハク酸のモル / 繰り返しユニットのモル)。

40

実施例 6 :

蒸留水 (60m l) 中のヒアルロン酸ナトリウム (H A - N a、0.5 g、MW760,000) 及び

50

N, N - ジメチルホルムアミド (DMF、60ml) の溶液を、10分間、イオン交換樹脂 (1G、IR120H+) の存在下において攪拌し、その後、その樹脂を、DMF (50ml) での更なる希釈後に、濾過により除去した。溶液を、その後、過剰量のピリジン (6ml) を用いて中和して、ヒアルロン酸のピリジン塩 (HA-Py) を得た。粘稠溶液を、その後、減圧下において慎重に蒸発させて、存在する水を除去した (溶液の全量が、約50ml 未満とならないように注意した)。この水除去手順を3度繰り返し、各々において、DMF (20ml) を加えた。ゼラチン様溶液を、その後、コハク酸無水物 (2g)、4 - ジメチルアミノピリジン (200mg) 処理し、混合物を、更に、24時間攪拌した。反応混合物を、その後、濃縮し、蒸留水 (20ml) を用いて集め、蒸留水で透析し (750ml で3度)、凍結乾燥させて、ヒアルロン酸スクシニレートを得た (430ml)。その生成物は、水に溶解された時の高粘性で特徴付けられ、具体的な n・m・r・スペクトルは、そのサンプルの高粘性によるかなり幅広いピークで特徴付けられる。改質の程度は、電位差アッセイにより測定し、2.5 (コハク酸のモル / 繰り返しユニットのモル) であることが分かった。

10

o - スクシニルヒアルロネートの銀塩の製造の例

実施例 7 :

実施例 1 に記載したように製造した o - スクシニルヒアルロネート 100mg を、10ml の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液に、その後、1N の AgNO_3 溶液 10ml を追加した。そのようにして得た白色沈殿物を、2時間一定に攪拌しながら、懸濁状態で維持し、その後、ブフナー漏斗での濾過により集め、エタノールで数回洗浄し、40℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。これらの全ての作業を暗下において行って、酸化銀の形成を避けた。原子吸光分析により、23.5重量%の銀含量が示され、これは、理論計算量の87%に相当する。

20

実施例 8 :

実施例 3 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 70mg を、14ml の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液に、その後、1N の AgNO_3 溶液 14ml を追加した。グレーの沈殿物が直ちに形成され、それを2時間一定に攪拌しながら、懸濁状態で維持し、その後、ブフナー漏斗での濾過により集めた。それを、エタノールで数回洗浄し、40℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。これらの全ての作業を暗下において行って、酸化銀の形成を避けた。原子吸光分析により、27重量%の銀含量が示され、これは、理論計算量の71%に相当する。

30

実施例 9 :

実施例 4 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100mg を、20ml の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液 (高粘性のものであった) に、2N の AgNO_3 溶液 20ml を追加した。白色沈殿物が直ちに形成され、それを2時間一定に攪拌しながら、懸濁状態で維持した。それを、その後、ブフナー漏斗での濾過により集め、エタノールで数回洗浄し、40℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。これらの全ての作業を暗下において行って、酸化銀の形成を避けた。原子吸光分析により、28.8重量%の銀含量が示され、これは、理論計算量の70.5%に相当する。

40

実施例 10 :

実施例 5 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100mg を、10ml の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液 (高粘性のものであった) に、1N の AgNO_3 溶液 10ml を追加した。やや褐色を帯びた沈殿物が直ちに形成され、それを2時間一定に攪拌しながら、懸濁状態で維持し、その後、ブフナー漏斗での濾過により集め、エタノールで数回洗浄し、40℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。これらの全ての作業を暗下において行って、酸化銀の形成を避けた。原子吸光分析により、31重量%の銀含量が示され、これは、理論計算量の70.2%に相当する。

実施例 11 :

実施例 6 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100mg を、10ml の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液 (高粘性のものであった) に、1N の AgNO_3 溶液 10ml

50

1 を追加した。やや褐色を帯びた沈殿物が直ちに形成され、それを 2 時間一定に攪拌しながら、懸濁状態で維持し、その後、プフナー漏斗での濾過により集め、エタノールで数回洗浄し、40 ℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。これらの全ての作業を暗下において行って、酸化銀の形成を避けた。原子吸光分析により、27 重量 % の銀含量が示され、これは、理論計算量の 71 % に相当する。

ヒアルロン酸スクシニレートの亜鉛塩の製造の例

実施例 12 :

実施例 1 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100 m g を、10 m l の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液に、0.2 N の $ZnCl_2$ 溶液 10 m l を追加した。溶液を 2 時間一定に攪拌し、その後、3 容量のエタノールを添加して、溶解性亜鉛塩を沈殿させた。沈殿物を、3,000 r p m で 15 分間の遠心分離により回収し、エタノールで数回洗浄し、40 ℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。原子吸光分析により示された銀含量は、10 % であり、これは、理論計算量の 101 % に相当する。

10

実施例 13 :

実施例 3 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100 m g を、20 m l の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液（高粘性のものであった）に、2 N の $ZnCl_2$ 溶液 20 m l を追加した。亜鉛塩の添加後、粉状沈殿物が形成され、それを、3,000 r p m で 15 分間の遠心分離により回収し、エタノールで数回洗浄し、40 ℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。原子吸光分析により示された銀含量は、15.3 % であり、これは、理論計算量の 105 % に相当する。

20

実施例 14 :

実施例 4 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100 m g を、20 m l の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液（高粘性のものであった）に、2 N の $ZnCl_2$ 溶液 20 m l を追加した。亜鉛塩の添加後、粉状沈殿物が形成され、それを、3,000 r p m で 15 分間の遠心分離により回収し、エタノールで数回洗浄し、40 ℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。原子吸光分析により示された銀含量は、17.7 % であり、これは、理論計算量の 105 % に相当する。

ヒアルロン酸スクシニレートの銅塩の製造の例

実施例 15 :

実施例 5 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100 m g を、10 m l の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液（高粘性のものであった）に、2 N の $CuCl_2$ 溶液 10 m l を追加した。銅塩の添加後、青色沈殿物が形成され、それを、3,000 r p m で 15 分間の遠心分離により回収し、エタノールで数回洗浄し、40 ℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。原子吸光分析により示された銅含量は、21.4 重量 % であり、これは、理論計算量の 110 % に相当する。従って、少量の銅塩が、誘導体の沈殿の間にポリマーにより導入されたことが確認できる。

30

ヒアルロン酸スクシニレートの金塩の製造の例

実施例 16 :

実施例 3 に記載したように製造したヒアルロン酸スクシニレート 100 m g を、20 m l の蒸留水に溶解した。ポリマー溶液（高粘性のものであった）に、0.5 N の $HAuCl_4$ 溶液 20 m l を追加した。金塩の添加後、沈殿物が形成され、それを、3,000 r p m で 15 分間の遠心分離により回収し、エタノールで数回洗浄し、40 ℃ にセットした減圧オープンにおいて乾燥させた。原子吸光分析により示された銅含量は、13 重量 % であり、これは、理論計算量の 44 % に相当する。

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 Q 17/00	(2006.01)	A 6 1 Q 17/00
D 0 6 M 15/03	(2006.01)	D 0 6 M 15/03
A 6 1 L 15/16	(2006.01)	A 6 1 L 15/01

(72)発明者 フライバニ アントネーラ
 イタリア イ - 3 3 1 0 0 ウディネ ヴィア プラダマーノ 1 5

(72)発明者 ゴムバック ヴァレンティーナ
 イタリア イ - 3 4 1 2 5 トリエステ ヴィア パラーディオ 3

審査官 刈野 留香

(56)参考文献 特開平 0 2 - 0 7 3 8 0 1 (J P , A)
 特表昭 6 3 - 5 0 2 6 7 0 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C08B 37/08
 A61K 8/73
 A61K 31/728
 A61L 15/16
 A61P 29/00
 A61P 31/04
 A61Q 17/00
 D06M 15/03