

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-503887

(P2023-503887A)

(43)公表日 令和5年2月1日(2023.2.1)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)		
C 0 8 B	37/08 (2006.01)	C 0 8 B	37/08	Z	4 C 0 8 1
A 6 1 Q	19/00 (2006.01)	A 6 1 Q	19/00		4 C 0 8 3
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02		4 C 0 9 0
A 6 1 K	31/728(2006.01)	A 6 1 K	31/728		
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全27頁)	最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-529349(P2022-529349)	(71)出願人	522118252
(86)(22)出願日	令和2年11月19日(2020.11.19)		ビーエムジー ファーマ ソシエタ ペル
(85)翻訳文提出日	令和4年5月30日(2022.5.30)		アチオニ
(86)国際出願番号	PCT/IB2020/060888		B M G P H A R M A S . P . A .
(87)国際公開番号	WO2021/099977		イタリア国 2 0 1 2 4 (ミラノ) ミ
(87)国際公開日	令和3年5月27日(2021.5.27)		ラノ ヴィアツレ エツフェ . エステリ 1
(31)優先権主張番号	102019000021693	(74)代理人	100123788
(32)優先日	令和1年11月20日(2019.11.20)		弁理士 宮崎 昭夫
(33)優先権主張国・地域又は機関	イタリア(IT)	(74)代理人	100127454
			弁理士 緒方 雅昭
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(72)発明者	マストロドナト、 マルコ
	最終頁に続く		イタリア国 2 0 1 2 4 (ミラノ) ミ
			ラノ ヴィアツレ エツフェ . エステリ
			1 ビーエムジー ファーマ ソシエタ
			ペル アチオニ内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 架橋ヒアルロン酸ブチレートまたはブチレート-ホルメート誘導体およびその架橋方法

(57)【要約】

【課題】

多糖類の化学的および生物学的安定性が増加し、同時に改善されたレオロジープロフィールを有する架橋ヒアルロン酸ブチレート等の提供。

【解決手段】

ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容可能な塩を、有機溶媒中でカルボン酸活性化試薬および塩基で架橋反応させる架橋ヒアルロン酸ブチレート等の調製方法において、原料ヒアルロン酸ブチレート等として、1000kDa~10000kDaの重量平均分子量を有する高分子量多糖類と、1kDa~900kDaの重量平均分子量を有する低分子量多糖類との混合物を使用する調製方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの許容可能な塩の調製方法であって、有機溶媒中のヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容可能な塩と、カルボキシル基活性化試薬および塩基との架橋反応を含み、ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容可能な塩が、1000kDa～10000kDaの範囲の重量平均分子量を有する高分子量多糖類と、1kDa～900kDaの範囲の重量平均分子量を有する低分子量多糖類との混合物であることを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記低分子量多糖類が1kDa～500kDaの範囲の重量平均分子量を有し、前記高分子量多糖類が1000kDa～6000kDaの範囲の重量平均分子量を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記低分子量多糖類が50kDa～300kDaの範囲の重量平均分子量を有し、前記高分子量多糖類が1000kDa～2000kDaの範囲の重量平均分子量を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記高分子量多糖類および前記低分子量多糖類が80:20～20:80の重量比で存在する、先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容される塩が、0.1～2.2の範囲の置換度を有する、先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートの許容可能な塩が、ナトリウム、カリウムまたはリチウム塩、またはテトラブチルアンモニウムなどの第四級アンモニウム塩である先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記許容される塩がナトリウム塩である請求項6に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記有機溶媒が、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドンおよびホルムアミドなどの塩基性極性非プロトン性溶媒から選択される、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記有機溶媒がホルムアミドである請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記カルボキシル基活性化試薬が、カルボニルジイミダゾール、1,1'-カルボニル-ジ-(1,2,4-トリアゾール)、1,1'-オキサリルイミダゾール、1,1'-チオカルボニルイミダゾール、1,1'-カルボニルビス(2-メチルイミダゾール)、N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、p-ニトロフェニルトリフルオロアセテート、2-ハロ-N-アルキルピリジン塩およびハロゲン化アシルからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記カルボキシル基活性化試薬が、カルボニルジイミダゾールである請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記塩基が、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属、特にナトリウム、カリウムもしくはマグネシウムの炭酸塩、重炭酸塩および水酸化物のような無機塩基、ピリジンもしくは

50

はコリジンなどのその同族体などの少なくとも1つの三置換窒素原子を含む芳香族もしくは脂肪族有機塩基、またはトリエチルアミン、N-メチル-ピペラジンもしくはジメチルアミノピリジンのような塩基性アミン、または酢酸ナトリウムもしくはカリウムのような有機酸のアルカリもしくはアルカリ土類金属塩から選択される、先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記塩基が炭酸ナトリウムまたはジメチルアミノピリジンである請求項12に記載の方法。

【請求項14】

反応混合物を20～30の範囲の温度に4～24時間保持する、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項15】

請求項1～14に開示された方法によって得られる架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの許容可能な塩。

【請求項16】

請求項15に記載の架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容される塩、ならびに少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含む、医薬若しくは化粧品用製剤または医療用デバイス。

【請求項17】

リドカインなどの局所麻酔薬を含有する、請求項16に記載の医薬若しくは化粧品製剤または医療用デバイス。 20

【請求項18】

皮膚化粧品の抗老化または活性化治療のための、およびメソセラピー適用における、請求項16に記載の化粧品用製剤の非治療的使用。

【請求項19】

皮膚病変、発疹および眼病変の局所治療に使用するための、請求項16に記載の医薬製剤または医療用デバイス。

【請求項20】

眼の手術、ドライアイの治療または変形性関節症の治療における補助剤としての、または皮膚充填剤としての、請求項16に記載の医療用デバイスの使用。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの塩の製造方法、該方法によって得られた生成物、および医薬または化粧品用途のための、または医療用デバイスとしてのその製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

特に、本発明は驚くべきことに、先に架橋された同じポリマーを組み合わせることによって得られるポリマーとは異なるレオロジープロファイルを有するポリマーを生じる、異なる分子量のヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの塩の組み合わせの架橋に関する。 40

【0003】

前記方法によって調製されたヒアルロン酸の架橋ブチレート-ホルメートエステルは予め架橋された異なる分子量を有する多糖類を組み合わせることによって得られるゲルよりも良好な粘弾性特性を有し、したがって、医薬および皮膚化粧品分野において、および医療用デバイスとして、特に注射剤として有利に使用することができる。

【0004】

ヒアルロン酸はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとの繰り返し単位からなるグ 50

リコサミノグリカンであり、一緒に結合しているか、あるいはグリコシド結合 1 4 および 1 3 を介して結合している。ヒアルロン酸は結合組織の必須要素であり、滑液、硝子体液および臍帯にも存在する。

【0005】

WO98/23648は、ヒアルロン酸のヒドロキシル基が酪酸残基でエステル化されているヒアルロン酸ブチレート(SHB)の調製を開示している。ヒアルロン酸ブチレートは、皮膚弾性剤および保湿剤として、抗炎症性、抗増殖性および皮膚保護特性を有する。

【0006】

WO2009/068215は、ヒアルロン酸の混合ブチレート-ホルメートエステルの調製、および皮膚保護活性および抗炎症活性を有する皮膚化粧品におけるそれらの使用を開示している。混合エステルは、無水酪酸およびホルムアミド(FA)、塩基性触媒としてN,N-ジメチルアミノピリジン(N,N-DMAP)を用いて調製される。

【0007】

EP341745には、ヒアルロン酸またはヒアルロン酸から出発して、カルボキシル基が種々のタイプのアルコールで部分的にエステル化されている自己架橋ヒアルロン酸の調製が開示されている。ヒアルロン酸(またはそのエステル誘導体、「外部エステル」と定義される)のカルボキシル官能基は、ヒアルロン酸の繰り返し単位のアルコールヒドロキシルとの分子内または分子間エステルの形成に関与し、その結果、架橋(「自己架橋」と定義される)が生じる。

【0008】

WO2008/081255は、酪酸-ギ酸、および開始多糖類の酸基とアルコール基との間のエステル、多糖類鎖間の架橋を含む、エステルと非多糖類カルボン酸の同時存在を特徴とする自己架橋ヒアルロン酸の調製を開示している。

【0009】

EP2614090は低分子量ヒアルロン酸と高分子量ヒアルロン酸との間の協同ハイブリッド複合体を開示しており、溶液中のヒアルロン酸分子は疎水性結合および鎖内および鎖間水素結合の形成に基づく協同相互作用を特徴とし、その程度は多糖類の分子量に依存する。

【0010】

異なる分子量を有するヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートの架橋は、多糖類の化学的および生物学的安定性を増加させ、同時に改善されたレオロジープロフィールを提供し、これは医薬および皮膚美容分野における適用、ならびに医療用デバイス、特に注射剤として特に有利であることが、今回発見された。

【発明の概要】

【0011】

本発明の目的は、架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレートまたはそれらの許容可能な塩の調製方法であって、該方法が有機溶媒中のヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容可能な塩と、カルボキシル基活性化試薬および塩基との反応を含み、該ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容可能な塩が1000 kDa ~ 10000 kDa、好ましくは1000 kDa ~ 6000 kDa、より好ましくは1000 kDa ~ 2000 kDaの範囲の重量平均分子量を有する高分子量多糖類と、1 kDa ~ 900 kDa、好ましくは10 kDa ~ 500 kDa、より好ましくは50 kDa ~ 300 kDaの範囲の重量平均分子量を有する低分子量多糖類との混合物であることを特徴とする方法である。

【0012】

ヒアルロン酸のGlcNAc-GlcUA二糖単位当たりの酪酸または酪酸-ギ酸残基の数の間の比として定義される置換度(DS)は、例えば、0.1 ~ 2.2の範囲であり得る。

【0013】

10

20

30

40

50

高分子量多糖類と低分子量多糖類とは、重量比で80 : 20 ~ 20 : 80の範囲で用いることが好ましい。

【0014】

「許容可能な塩」とは、ここでは医薬または化粧品用途に、または医用デバイスにおいて許容される塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムまたは第四級アンモニウム塩、例えば、テトラブチルアンモニウム、好ましくはナトリウム塩を意味する。

【0015】

架橋反応は、好ましくはN, N - ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、N - メチルピロリドンまたはホルムアミドなどの極性非プロトン性有機溶媒から選択される有機溶媒中で行われる。好ましい溶媒はホルムアミドである。

10

【0016】

カルボキシル基活性化試薬は、好ましくはカルボニルジイミダゾール、1, 1' - カルボニル - ジ - (1, 2, 4 - トリアゾール)、1, 1' - オキサリルイミダゾール、1, 1' - チオカルボニルイミダゾール、1, 1' - カルボニルビス(2 - メチルイミダゾール)、N - ヒドロキシスクシンイミド、p - ニトロフェノール、p - ニトロフェニルトリフルオロアセテート、2 - ハロ - N - アルキルピリジン塩およびハロゲン化アシルからなる群から選択される。より好ましくは、カルボキシル基活性化試薬はカルボニルジイミダゾールである。

【0017】

架橋反応に使用される塩基は、好ましくはアルカリ金属もしくはアルカリ土類金属、特にナトリウム、カリウムもしくはマグネシウムの炭酸塩、重炭酸塩もしくは水酸化物などの無機塩基、ピリジンなどの少なくとも1つの三置換窒素原子を含む芳香族もしくは脂肪族有機塩基、またはコリジンなどのその同族体、塩基性アミン、トリエチルアミン、イミダゾール、N - メチル - ピペラジンもしくはジメチルアミノピリジンなどの塩基性アミン、または酢酸ナトリウムもしくはカリウムなどの有機酸のアルカリもしくはアルカリ土類金属塩から選択される。より好ましくは、使用される塩基は炭酸ナトリウムまたはジメチルアミノピリジンである。

20

【0018】

反応混合物は、好ましくは20 ~ 30 の範囲の温度で4 ~ 24時間維持される。

【0019】

反応が完了したら、混合物を水で希釈し、生成物を適切な溶媒中での沈殿によって回収する。次いで、このようにして得られた生成物を、例えば、適切な溶媒での連続的な洗浄および濾過によって精製する。

30

【0020】

架橋反応に用いるヒアルロン酸の高分子量および低分子量誘導体(ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート塩またはそれらの塩)の混合物は、高分子量ヒアルロン酸誘導体と低分子量誘導体とを混合するか、または高分子量および低分子量ヒアルロン酸の混合物上で酪酸または酪酸およびホルムアミドと誘導体化反応させることにより製造することができる。

【0021】

本発明のさらなる目的は、上記の方法によって得られる架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート - ホルメートまたはそれらの薬学的に許容される塩である。

40

【0022】

前記方法によって得られる架橋多糖類は、予め架橋された同じ出発多糖類を組み合わせることによって得られるものとは異なるレオロジープロフィールを有する。

【0023】

本発明による架橋多糖類のレオロジープロフィールは、高い粘度および高い弾性率(G')および粘度(G'')値を特徴とする。

【0024】

50

特に、高分子量および低分子量多糖類の混合物を架橋することによって得られる本発明による架橋多糖類は、架橋高分子量多糖類および架橋低分子量多糖類の混合物よりも高い粘度ならびに高い弾性率 (G') および粘度 (G'') を有する。

【0025】

さらに、異なる分子量を有する多糖類の存在は細胞外マトリックスを構成する細胞における増殖活性および抗炎症活性のような高分子量ヒアルロン酸ナトリウムの典型的な生物学的特性を生じるだけでなく、血管新生活性および炎症過程の調節のような低分子量ヒアルロン酸ナトリウムの典型的な生物学的特性も生じ、ヒアルロン酸に典型的な生体適合性を依然として維持しながら、生物学的活性の独特のプロフィールを与える。

【0026】

最後に、本発明による方法によって得られた架橋多糖類は酵素分解に対する改善された耐性を示し、これは、インビボでの長期間持続する活性を促進する。

【0027】

本発明のさらなる目的は、上記の方法によって得られる架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容される塩、ならびに少なくとも1つの薬学的または美容的に許容される賦形剤および/または担体を含む、薬学的または化粧品製剤または医療用デバイスである。

【0028】

医薬製剤または化粧品製剤または医療用デバイスは、リドカインなどの局所麻酔薬を含有することもできる。

【0029】

化粧用製剤は皮膚化粧品の抗老化または活性化治療のために、および中療法用途において使用することができる。

【0030】

医薬製剤または医療用デバイスは、皮膚病変および発疹ならびに眼病変の局所治療に使用することができる。

【0031】

本発明のさらなる目的は、眼科用途のためのアジュバントとして、例えば眼の手術またはドライアイの治療において、または変形性関節症の治療におけるアジュバントとして、または皮膚充填剤として使用可能な医療用デバイスである。

【0032】

ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートエステルはWO2009/068215に開示されているように調製され、ヒアルロン酸ブチレートエステルはWO2016/113192に開示されているように調製される。

【0033】

架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたは上記の方法によって得られるそれらの塩は、急性炎症応答に影響を及ぼすかなりの抗刺激活性、抗炎症活性および抗酸化活性を有する。これら特徴のために、本発明による架橋多糖類は皮下注射によって引き起こされる急性炎症または変形性関節症と関連する炎症が問題のある標的を構成する場合に、注射可能な、皮膚美容的な、または関節内適用のために特に示される。

【実施例】

【0034】

方法

使用機器：

置換度 (DS) を測定するための z 勾配を有する 5 mm 多核逆プローブを備えた VARIAN VNMR 500MHz 分光計；

アントンパール社の MCR301 レオメーターで、平行プレート (直径 25 mm、サテン仕上げ) を装備し、25 °C へ自動温度調節した。

【0035】

10

20

30

40

50

置換度 (DS) の決定

ヒアルロン酸誘導体上の酪酸エステルにおける置換度を NMR 分光法により定量した。

^1H NMR スペクトルは、 z 勾配を有する 5 mm 多核リバーズプローブを装備した VARIAN VNMR 500 MHz 分光計を用いて、 D_2O 中で行った。試験は、測定プローブを 298°K に自動温度調節することによって行った。

【0036】

酪酸エステル中の DS の定量は、NMR チューブ中で NaOD を直接用いて徹底的に加水分解した後に行った。

【0037】

加水分解物の ^1H NMR スペクトルは酪酸 (ビシナルメチルおよびメチレンプロトン) に起因するシグナルおよびヒアルロン酸 (糖プロトン、2つのアノマープロトンを除く) に起因するシグナルの積分を可能にし、それらの比率は、置換の程度を決定する。

【0038】

レオロジー試験による弾性率および粘性率の測定。

【0039】

ゲルのレオロジー試験は、 25°C に温度調節された平行プレート (直径 25 mm、サテン仕上げ) を備えた Anton Paar MCR 01 レオメーターを用いて行った。測定は混合の 24 時間後に、1% w/v の濃度で超純水中で膨潤したサンプルについて行った。

【0040】

振動モード (応力掃引) における各ゲルについて、弾性率 G' および粘度率 G'' (測定 Pa の単位) の決定を可能にする 1 Hz の一定周波数で機械的スペクトルを記録した; いくつかのゲルについて、適用された力の変動に対する粘度 (測定 $\text{Pa}\cdot\text{s}$ の単位) を測定する流動曲線も記録した。

【0041】

実施例 1: ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウムの合成

(MW: 1500 kDa; DS_{but} : 0.3; DS_{for} : 0.01)

ホルムアミド 100 ml を 1 L の反応器に導入し、続いて分子量 1500 kDa のヒアルロン酸ナトリウム 5.0 g を導入した。混合物を 95°C に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間攪拌し続けた。次いで、温度を 25°C に低下させ、混合物を一晩攪拌下に維持した。

【0042】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 262.0 mg) を添加し、続いて 0.5 時間後にブチリル-イミダゾリド (1.1 g) を順次添加した。混合物を 25°C で 1.5 時間攪拌した。反応物を 50 ml の酸性水で冷却し、生成物をアセトンでの沈殿およびその後の濾過によって単離した。

【0043】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、 60°C の温度で約 24 時間乾燥させた。

【0044】

試料 10 mg を重水 (D_2O) 0.9 ml に溶解し、NMR 試験管に移した。

【0045】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸-ギ酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中で 0.3 の DS およびギ酸中で 0.01 の DS を示した。

【0046】

実施例 2: ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW: 1500 kDa; DS_{but} : 0.95; DS_{for} : 0.01)

ホルムアミド 150 ml を 1 L の反応器に導入し、続いて分子量 1500 kDa のヒアルロン酸ナトリウム 7.5 g を導入した。混合物を 95°C に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間攪拌し続けた。次いで、温度を 25°C に低下させ、

10

20

30

40

50

混合物を一晩攪拌下に維持した。

【0047】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 600 mg) を添加し、続いて0.5時間後にブチリル-イミダゾリド (6.7 g) を順次添加した。混合物を25 で1.5時間攪拌した。反応物を65 mlの酸性水で冷却し、生成物をアセトンでの沈殿およびその後の濾過によって単離した。

【0048】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、60 の温度で約24時間乾燥させた。

【0049】

試料10 mgを重水 (D_2O) 0.9 mlに溶解し、NMR試験管に移した。

【0050】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸-ギ酸エステルの加水分解後、NMRスペクトルは酪酸中0.95およびギ酸中0.01のDSを示した。

【0051】

実施例3：ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW: 1500 kDa; DS_{but} : 1.6; DS_{for} : 0.03)

200 mlのホルムアミドを1 Lの反応器に導入し、続いて分子量1500 kDaの10.15 gのHANaを導入した。混合物を95 に熱硬化させ、ポリマーが完全に溶解するまで、一定温度で1時間攪拌下に維持した。次いで、温度を25 に低下させ、混合物を一晩攪拌下に維持した。

【0052】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 2.7 g) を添加し、続いて0.5時間後にブチリル-イミダゾリド (26.2 g) を順次添加した。混合物を25 で1.5時間攪拌した。反応物を200 mlの酸性水で冷却し、生成物をアセトンで沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0053】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、60 の温度で約16時間乾燥させた。

【0054】

試料10 mgを重水 (D_2O) 0.9 mlに溶解し、NMR試験管に移した。

【0055】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸-ギ酸エステルの加水分解後、NMRスペクトルは酪酸中で1.6、ギ酸中で0.03のDSを示した。

【0056】

実施例4：ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW: 300 kDa; DS_{but} : 0.3; DS_{for} : 0.02)

2.67 Lのホルムアミドを15 Lの反応器に導入し、続いて200.5 gの分子量300 kDaのヒアルロン酸ナトリウムを導入した。混合物を95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で1.5時間攪拌し続けた。次いで、温度を25 に低下させ、混合物を一晩攪拌下に維持した。

【0057】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 10.57 g) を添加し、続いて0.5時間後にブチリル-イミダゾリド (36.81 g) を順次添加した。混合物を25 で1.5時間攪拌した。反応物を1.38 Lの酸性水で冷却し、生成物をアセトンで沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0058】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、60 の温度で約16時間乾燥させた。

【0059】

10

20

30

40

50

サンプル 10 mg を重水 (D_2O) 0.9 ml に溶解し、NMR 試験管に移した。

【0060】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸 - ギ酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中 0.3 およびギ酸中 0.02 の DS を示した。

【0061】

実施例 5 : ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW : 300 kDa ; DS_{but} : 0.95 ; DS_{for} : 0.01)

80 ml のホルムアミドを 1 L の反応器に導入し、続いて 300 kDa の分子量を有する 6 g のヒアルロン酸ナトリウムを導入した。混合物を 95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間撹拌し続けた。次に、温度を 25 に下げた。

10

【0062】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 480 mg) を添加し、続いて 0.5 時間後にブチリル - イミダゾリド (4.2 g) を順次添加した。混合物を 25 で 1.5 時間撹拌した。反応物を 40 ml の酸性水で冷却し、生成物をアセトンでの沈殿およびその後の濾過によって単離した。

【0063】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、60 の温度で約 24 時間乾燥させた。

【0064】

試料 10 mg を重水 (D_2O) 0.9 ml に溶解し、NMR 試験管に移した。

20

【0065】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸 - ギ酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中 0.95 およびギ酸中 0.01 の DS を示した。

【0066】

実施例 6 : ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW : 300 kDa ; DS_{but} : 2.16 ; DS_{for} : 0.02)

ホルムアミド 50 ml を 0.5 L フラスコに導入し、続いて分子量 300 kDa のヒアルロン酸ナトリウム 5 g を導入した。混合物を 95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間撹拌し続けた。次いで、温度を 25 に下げ、系を撹拌下で一晩維持した。

30

【0067】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 1.34 g) を添加し、続いて 0.5 時間後にブチリル - イミダゾリド (18.41 g) を順次添加した。混合物を 25 で 1.5 時間撹拌した。反応物を 70 ml の酸性水で冷却し、生成物をアセトンで沈殿させ、続いて濾過することによって単離した。

【0068】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、60 の温度で約 24 時間乾燥させた。

【0069】

試料 10 mg を重水 (D_2O) 0.9 ml に溶解し、NMR 試験管に移した。

40

【0070】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸 - ギ酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中で 2.16、ギ酸中で 0.02 の DS を示した。

【0071】

実施例 7 : ヒアルロン酸ブチレートナトリウムの合成

(MW : 25 kDa、DS_{but} : 0.35)

25 ml の水を 0.5 L のフラスコに導入し、続いて 5 g の分子量 25 kDa のヒアルロン酸ナトリウムを導入した。混合物を 25 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間撹拌し続けた。

【0072】

50

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 0.8 g) を添加し、続いて 0.5 時間後にブチリル - イミダゾリド (0.9 g) を順次添加した。混合物を 25 で 1.0 時間撹拌した。反応物を 5 ml の酸性水で冷却し、生成物をイソプロパノールでの沈殿およびその後の濾過によって単離した。

【0073】

粗反応生成物を、イソプロパノールおよび水で数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下 25 で約 48 時間乾燥させた。

【0074】

試料 10 mg を重水 (D_2O) 0.9 ml に溶解し、NMR 試験管に移した。

【0075】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中で 0.35 の DS を示した。

【0076】

実施例 8 : ヒアルロン酸ブチレートナトリウムの合成

(MW : 25 kDa、 DS_{but} : 0.9)

25 ml の水を 0.5 L のフラスコに導入し、続いて 5 g の分子量 25 kDa のヒアルロン酸ナトリウムを導入した。混合物を 25 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間撹拌し続けた。

【0077】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 4.0 g) を添加し、続いて 0.5 時間後にブチリル - イミダゾリド (2.5 g) を順次添加した。混合物を 25 で 1.0 時間撹拌した。反応物を 20 ml の酸性水で冷却し、生成物をイソプロパノールでの沈殿およびその後の濾過によって単離した。

【0078】

粗反応生成物を、イソプロパノールおよび水で数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下 25 で約 48 時間乾燥させた。

【0079】

試料 10 mg を重水 (D_2O) 0.9 ml に溶解し、NMR 試験管に移した。

【0080】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中で 0.9 の DS を示した。

【0081】

実施例 9 : ヒアルロン酸ブチレートナトリウムの合成

(MW : 25 kDa、 DS_{but} : 1.6)

35 ml の水を 0.5 L のフラスコに導入し、続いて 5 g の分子量 25 kDa のヒアルロン酸ナトリウムを導入した。混合物を 25 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間撹拌し続けた。

【0082】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 6.61 g) を添加し、続いて 0.5 時間後にブチリル - イミダゾリド (11.9 g) を順次添加した。混合物を 25 で 1.0 時間撹拌した。反応物を 20 ml の酸性水で冷却し、生成物をイソプロパノールでの沈殿およびその後の濾過によって単離した。

【0083】

粗反応生成物を、イソプロパノールおよび水で数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下 25 で約 48 時間乾燥させた。

【0084】

試料 10 mg を重水 (D_2O) 0.9 ml に溶解し、NMR 試験管に移した。

【0085】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中で 1.6 の DS を示した。

10

20

30

40

50

【0086】

実施例10：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(80:20; MW:1500kDa; DS_{but}:1.6; DS_{for}:0.03; MW:300kDa; DS_{but}:0.3; DS_{for}:0.02)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例3で得られた生成物0.8gおよび実施例4で得られた生成物0.2gを導入した。混合物を95に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で2.5時間攪拌し続けた。

【0087】

次いで、温度を25に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0088】

炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-60mg)を添加し、続いて0.5時間後にCDI(1.2mlのDMSOに溶解した300mg)を添加した。混合物を攪拌下、25で24時間放置した。

【0089】

40mlの水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0090】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約16時間乾燥させた。

【0091】

50mgのサンプルを5mlの超純水(濃度1%w/v)に添加し;混合後24時間で、得られたゲルは、レオロジー試験で、G' = 1550PaおよびG'' = 186Paを与えた。

【0092】

実施例11：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(50:50; MW:1500kDa; DS_{but}:1.6; DS_{for}:0.03; MW:300kDa; DS_{but}:0.3; DS_{for}:0.02)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例3で得られた生成物0.5gおよび実施例4で得られた生成物0.5gを導入した。混合物を95に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で2.5時間攪拌し続けた。

【0093】

次いで、温度を25に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0094】

炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-60mg)を添加し、続いて0.5時間後にCDI(1.2mlのDMSOに溶解した300mg)を添加した。混合物を攪拌下、25で24時間放置した。

【0095】

40mlの水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0096】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約16時間乾燥させた。

【0097】

50mgのサンプルを5mlの超純水(濃度1%w/v)に添加し;混合後24時間で、得られたゲルは、レオロジー試験で、G' = 73PaおよびG'' = 16Paを与えた。

【0098】

実施例12：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(20:80; ; MW:1500kDa; DS_{but}:1.6; DS_{for}:0.03; MW:300kDa; DS_{but}:0.3; DS_{for}:0.02)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例3で得

10

20

30

40

50

られた生成物 0.2 g および実施例 4 で得られた生成物 0.8 g を導入した。混合物を 95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 2.5 時間攪拌し続けた。

【0099】

次いで、温度を 25 に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0100】

炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 73 mg) を添加し、続いて 0.5 時間後に CDI (1.4 ml の DMSO に溶解した 345 mg) を添加した。混合物を攪拌下、25 で 24 時間放置した。

【0101】

40 ml の水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。 10

【0102】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 5 時間乾燥させた。

【0103】

実施例 13 : 架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(80 : 20 ; MW : 1500 kDa ; DS_{but} : 0.95 ; DS_{for} : 0.01 ; MW : 300 kDa ; DS_{but} : 0.95 ; DS_{for} : 0.01)

20 ml のホルムアミドを 100 ml の三口フラスコに導入し、続いて実施例 2 で得られた生成物 0.8 g および実施例 5 で得られた生成物 0.2 g を導入した。混合物を 95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 2.5 時間攪拌し続けた。 20
次いで、温度を 25 に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0104】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 60 mg) を添加し、続いて 0.5 時間後に CDI (1.4 ml の DMSO に溶解した 340 mg) を添加した。混合物を攪拌下、25 で 24 時間放置した。

【0105】

40 ml の水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0106】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 16 時間乾燥させた。 30

【0107】

実施例 14 : 架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(80 : 20 ; MW : 25 kDa ; DS_{but} : 0.9 ; MW : 1500 kDa ; DS_{but} : 0.95 ; DS_{for} : 0.01)

20 ml のホルムアミドを 100 ml の三口フラスコに導入し、続いて実施例 8 で得られた生成物 0.8 g および実施例 2 で得られた生成物 0.2 g を導入した。混合物を 95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 2.5 時間攪拌し続けた。 40
次いで、温度を 25 に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0108】

次いで、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 - 65 mg) を添加し、続いて 0.5 時間後に CDI (1.4 ml の DMSO に溶解した 345 mg) を添加した。混合物を攪拌下、25 で 24 時間放置した。

【0109】

40 ml の水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0110】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 16 時間乾燥させた。 50

【0111】

実施例15：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(20：80；；MW：25kDa；DS_{but}：0.9；MW：1500kDa；DS_{but}：0.95；DS_{for}：0.01)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例8で得られた生成物0.2gおよび実施例2で得られた生成物0.8gを導入した。混合物を95に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で2.5時間攪拌し続けた。次いで、温度を25に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0112】

次いで、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-70mg)を添加し、続いて0.5時間後にCDI(1.4mlのDMSOに溶解した348mg)を添加した。混合物を攪拌下、25で24時間放置した。 10

【0113】

40mlの水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0114】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約16時間乾燥させた。

【0115】

実施例16：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成 20

(80：20；MW：25kDa；DS_{but}：0.35；MW：1500Da；DS_{but}：1.6；DS_{for}：0.03)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例7で得られた生成物0.8gおよび実施例3で得られた生成物0.2gを導入した。混合物を95に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で2.5時間攪拌し続けた。次いで、温度を25に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0116】

次いで、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-78mg)を添加し、続いて0.5時間後にCDI(1.3mlのDMSOに溶解した360mg)を添加した。混合物を攪拌下、25で24時間放置した。 30

【0117】

40mlの水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0118】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約18時間乾燥した。

【0119】

実施例17：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成 40

(20：80；MW：25kDa；DS_{but}：0.35；MW：1500kDa；DS_{but}：1.6；DS_{for}：0.03)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例7で得られた生成物0.2gおよび実施例3で得られた生成物0.8gを導入した。混合物を95に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で2.5時間攪拌し続けた。次いで、温度を25に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0120】

次いで、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-68mg)を添加し、続いて0.5時間後にCDI(1.4mlのDMSOに溶解した340mg)を添加した。混合物を攪拌下、25で24時間放置した。

【0121】

40mlの水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ 50

、続いてデカントすることによって単離した。

【0122】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約20時間乾燥させた。

【0123】

実施例18：架橋ヒアルロン酸ナトリウム酪酸 - ギ酸塩の合成

(80 : 20 ; MW : 25 kDa ; DS_{but} : 1.6 ; MW : 1500 kDa ; DS_{but} : 0.3 ; DS_{for} : 0.01)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例9で得られた生成物0.8gおよび実施例1で得られた生成物0.2gを導入した。混合物を95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で2.5時間攪拌し続けた。次いで、温度を25 に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0124】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 75mg) を添加し、続いて0.5時間後にCDI (1.4mlのDMSOに溶解した372mg) を添加した。混合物を攪拌下、25 で24時間放置した。

【0125】

40mlの水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0126】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約16時間乾燥させた。

【0127】

実施例19：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(20 : 80 ; MW : 25 kDa ; DS_{but} : 1.6 ; MW : 1500 kDa ; DS_{but} : 0.3 ; DS_{for} : 0.01)

20mlのホルムアミドを100mlの三口フラスコに導入し、続いて実施例9で得られた生成物0.2gおよび実施例1で得られた生成物0.8gを導入した。混合物を95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で2.5時間攪拌し続けた。次いで、温度を25 に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0128】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 70mg) を添加し、続いて0.5時間後にCDI (1.4mlのDMSOに溶解した3348mg) を添加した。混合物を攪拌下、25 で24時間放置した。

【0129】

40mlの水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中で沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0130】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約20時間乾燥させた。

【0131】

実施例20：ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW : 1500 : 300 kDa 80 : 20 ; DS_{but} : 0.9 ; DS_{for} : 0.02)

150mlのホルムアミドを1Lの反応器に導入し、続いて分子量1500kDaのヒアルロン酸ナトリウム6gおよび分子量300kDaのヒアルロン酸ナトリウム1.5gを導入した。混合物を95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で1.5時間攪拌し続けた。温度を25 に下げ、系を一晩攪拌下に維持した。

【0132】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 0.6g) を添加し、続いて0.5時間後に

ブチリル - イミダゾリド (5 . 7 g) を添加した。混合物を 25 で 1 . 5 時間攪拌した。

【 0 1 3 3 】

反応物を 65 ml の酸性水で冷却し、生成物をアセトンで沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【 0 1 3 4 】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 18 時間乾燥した。

【 0 1 3 5 】

試料 10 mg を重水 (D₂O) 0 . 8 ml に溶解し、NMR 管に移した。

10

【 0 1 3 6 】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸およびギ酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中 0 . 9 およびギ酸中 0 . 02 の DS を示した。

【 0 1 3 7 】

実施例 21 : 実施例 20 + カルボニルジイミダゾール (CDI) からの架橋ヒアルロン酸ブチレートナトリウムの合成

実施例 20 で得られた 20 ml のホルムアミドおよび 2 g の生成物を、2 つの異なる 100 ml 三口フラスコ (A および B と呼ぶ) に導入した。混合物を 95 に温度調節し、生成物が完全に溶解するまで一定温度で 1 時間攪拌し続けた。温度を 25 に下げ、系を一晚攪拌下に維持した。

20

【 0 1 3 8 】

ジメチルアミノピリジン (DMA P - 263 mg、1 . 5 ml のホルムアミドに可溶化) をフラスコ A に添加し、続いて 1 時間後に CDI (350 mg を 1 . 5 ml の DMSO に溶解) を添加した。混合物を攪拌下に 25 で 2 時間放置した。

【 0 1 3 9 】

ジメチルアミノピリジン (DMA P - 263 mg、FA 1 . 5 ml に可溶化) をフラスコ B に加え、混合物を 25 で 2 時間攪拌下に放置した。

【 0 1 4 0 】

混合物 A を混合物 B に加え、攪拌下、約 4 時間系を反応させた。反応を 70 ml の水で冷却し、10 ml の 0 . 5 M HCl を添加することによって pH を 10 ~ 7 . 5 に調整した。

30

【 0 1 4 1 】

粗生成物をアセトンで沈殿させることによって単離し、メタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 16 時間乾燥させた。

【 0 1 4 2 】

50 mg のサンプルを 5 ml の超純水 (濃度 1 % w / v) に添加し ; 混合後 24 時間で、得られたゲルは、レオロジー試験で、G' = 480 Pa および G'' = 70 Pa を与えた。

【 0 1 4 3 】

実施例 22 : ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

40

(MW : 1500 : 300 kDa 20 : 80 ; DS_{but} : 0 . 9 ; DS_{for} : 0 . 02) + クロスリンク

150 ml のホルムアミドを 1 L の反応器に導入し、続いて 1 . 5 g の分子量 1500 kDa のヒアルロン酸ナトリウムおよび 6 g の分子量 300 kDa のヒアルロン酸ナトリウムを導入した。混合物を 95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1 . 5 時間攪拌し続けた。温度を 25 に下げ、系を一晚攪拌下に維持した。

【 0 1 4 4 】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 0 . 6 g) を添加し、続いて 0 . 5 時間後にブチリル - イミダゾリド (5 . 7 g) を添加した。混合物を 25 で 1 . 5 時間攪拌した。次いで、547 . 5 mg の炭酸ナトリウムを添加し、混合物を 0 . 5 時間攪拌下に放置

50

し、その後、11mlのジメチルスルホキシドに溶解した2.6gのCDIを添加した。

【0145】

24時間後、生成物を、粗反応生成物にアセトンを添加することによって沈殿させた。

【0146】

単離された粗生成物を、アセトンおよびメタノールで数回連続して洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約10時間乾燥させた。

【0147】

試料10mgを重水(D₂O)0.8mlに溶解し、NMR管に移した。

【0148】

NaOD(重水素化水酸化ナトリウム)を添加することによる酪酸およびギ酸エステルの加水分解後、NMRスペクトルは酪酸中0.9およびギ酸中0.02のDSを示した。

10

【0149】

実施例23：ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW:1500:25kDa 20:80;DS_{but}:0.9;DS_{for}:0.02)

150mlのホルムアミドを1Lの反応器に導入し、続いて1.5gの分子量1500kDaのヒアルロン酸ナトリウムおよび6gの分子量25kDaのヒアルロン酸ナトリウムを導入した。混合物を95に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で1.5時間攪拌し続けた。温度を25に下げ、系を一晩攪拌下に維持した。

【0150】

20

次いで、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-0.6g)を添加し、続いて0.5時間後にブチリル-イミダゾリド(5.7g)を添加した。混合物を25で1.5時間攪拌した。

【0151】

反応物を65mlの酸性水で冷却し、生成物をアセトンで沈殿させ、続いてデカントすることによって単離した。

【0152】

粗反応生成物をアセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約18時間乾燥した。

【0153】

30

試料10mgを重水(D₂O)0.8mlに溶解し、NMR管に移した。

【0154】

NaOD(重水素化水酸化ナトリウム)を添加することによる酪酸およびギ酸エステルの加水分解後、NMRスペクトルは酪酸中0.9およびギ酸中0.02のDSを示した。

【0155】

実施例24：実施例23+カルボニルジイミダゾール(CDI)からの架橋ヒアルロン酸ブチレートナトリウムの合成

実施例23で得られた20mlのホルムアミドおよび2gの生成物を、2つの異なる100ml三口フラスコ(AおよびBと呼ぶ)に導入した。混合物を95に温度調節し、生成物が完全に溶解するまで一定温度で1時間攪拌し続けた。温度を25に下げ、系を一晩攪拌下に維持した。

40

【0156】

炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-114.4mg)をフラスコAに加え、1時間後にCDI(350mgをDMSO1.5mlに溶解)を加えた。混合物を攪拌下に25で2時間放置した。

【0157】

炭酸ナトリウム(Na₂CO₃-114.4mg)をフラスコBに加え、25で2時間攪拌した。

【0158】

混合物Aを混合物Bに加え、攪拌下、約4時間系を反応させた。反応物を70mlの水

50

で冷却し、0.5 M HCl を添加することによって pH を 10 から 7.5 に調整した。

【0159】

粗生成物をアセトンで沈殿させることによって単離し、アセトンおよびメタノールで数回洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 16 時間乾燥させた。

【0160】

実施例 25：ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW: 1500:25 kDa 80:20; DS_{but}: 0.9; DS_{for}: 0.02) + クロスリンク

150 ml のホルムアミドを 1 L の反応器に導入し、続いて分子量 1500 kDa のヒアルロン酸ナトリウム 6.0 g および分子量 25 kDa のヒアルロン酸ナトリウム 1.5 g を導入した。混合物を 95 に温度調節し、ポリマーが完全に溶解するまで一定温度で 1.5 時間撹拌し続けた。温度を 25 に下げ、系を一晩撹拌下に維持した。

【0161】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 0.65 g) を添加し、続いて 0.5 時間後にブチリル-イミダゾリド (5.9 g) を添加した。混合物を 25 で 1.5 時間撹拌した。

【0162】

次いで、550.0 mg の炭酸ナトリウムを添加し、混合物を 0.5 時間撹拌下に放置し、その後、11 ml のジメチルスルホキシドに溶解した 2.7 g の CDI を添加した。

【0163】

24 時間後、アセトンを添加することによって粗反応生成物を沈殿させた。

【0164】

単離された粗生成物を、アセトンおよびメタノールで数回連続して洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 10 時間乾燥させた。

【0165】

試料 10 mg を重水 (D₂O) 0.8 ml に溶解し、NMR 管に移した。

【0166】

NaOD (重水素化水酸化ナトリウム) を添加することによる酪酸およびギ酸エステルの加水分解後、NMR スペクトルは酪酸中 0.9 およびギ酸中 0.02 の DS を示した。

【0167】

実施例 26：架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(80:20; MW: 1500 kDa; DS_{but}: 1.6 DS_{for}: 0.03、MW: 300 kDa; DS_{but}: 2.16; DS_{for}: 0.02)

ホルムアミド 40 ml を 250 ml の三口フラスコに導入し、続いて実施例 3 で得られた生成物 1.6 g および実施例 6 で得られた生成物 0.4 g を導入した。混合物を 95 まで熱硬化させ、ポリマーが完全に溶解するまで、一定温度で 1 時間撹拌下に維持した。次いで、温度を 25 に下げ、系を撹拌下で一晩維持した。

【0168】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 122 mg) を添加し、続いて 0.75 時間後に CDI (1 ml の DMSO に溶解した 252 mg) を添加した。混合物を撹拌下、25 で 24 時間放置した。

【0169】

80 ml の水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中での沈殿およびその後の濾過によって単離した。

【0170】

粗反応生成物を、アセトンおよびメタノールで数回連続洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 16 時間乾燥させた。

【0171】

膨潤試験を 2 回実施した：

(1) 100 mg のポリマーを 10 mM PBS (pH 7.2) に 2% の濃度で溶解した。次いで、得られた試料をオートクレーブ中で 121 で 15 分間滅菌サイクルした。24 時間放置した後、レオロジー測定を行った。

(2) ポリマー 100 mg を 10 ml の水 (濃度 1%) に溶解した。24 時間後、ゲルを手動で均質化し、レオロジー測定を行った。

【0172】

結果を以下の表1に示した。

【0173】

【表1】

表1

	粘度(Pa*s)	G'(Pa)	G''(Pa)
1	51.600	93	29
2	270.000	788	95

tau1Pa で SS で評価された数値

10

【0174】

実施例 27 : 架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩の合成

(MW : 1500 kDa ; DS_{but} : 1.6 ; DS_{for} : 0.03)

20

ホルムアミド 40 ml を 250 ml の三口フラスコに導入し、続いて実施例 3 で得られた生成物 2 g を加えた。混合物を 95 まで熱硬化させ、ポリマーが完全に溶解するまで、一定温度で 1 時間攪拌下に維持した。次いで、温度を 25 に下げ、系を攪拌下で一晩維持した。

【0175】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 124 mg) を添加し、続いて 0.75 時間後に CDI (1 ml の DMSO に溶解した 258 mg) を添加した。混合物を攪拌下、25 で 24 時間放置した。

【0176】

80 ml の水を添加することによって反応を停止させ、生成物をアセトン中での沈殿およびその後の濾過によって単離した。

30

【0177】

粗反応生成物を、アセトンおよびメタノールで数回連続洗浄し、それぞれ真空濾過することによって精製した。沈殿物を真空下、室温で約 16 時間乾燥させた。

【0178】

実施例 28 : 架橋ヒアルロン酸ブチレートナトリウム - ホルメートの合成 (分子量 : 300 kDa ; DS_{but} : 2.16 ; DS_{for} : 0.02)

ホルムアミド 40 ml を 250 ml の三口フラスコに導入し、続いて実施例 6 で得られた生成物 2 g を加えた。混合物を 95 まで熱硬化させ、ポリマーが完全に溶解するまで、一定温度で 1 時間攪拌下に維持した。次いで、温度を 25 に下げ、系を攪拌下で 3 時間維持した。

40

【0179】

次いで、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃ - 116 mg) を添加し、続いて 0.75 時間後に CDI (1 ml の DMSO に溶解した 240 mg) を添加した。混合物を攪拌下、25 で 24 時間放置した。

【0180】

水 80 ml を加えて反応を停止し、透析により生成物を精製し、凍結乾燥により回収した。

【0181】

実施例 29 (比較) : 架橋されたヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩 (

50

MW : 1500 kDa ; DS_{but} : 1.6 DS_{for} : 0.03) と架橋されたヒアルロン酸ブチレート-ホルメートナトリウム塩 (MW : 300 kDa ; DS_{but} : 2.1 ; DS_{for} : 0.02) との混合物 (80 : 20)

(1) 実施例 27 の生成物 80 mg および実施例 28 からのも 20 mg を、2 % の濃度で pH 7.2 の 10 mM PBS に溶解した。次いで、得られた試料をオートクレーブ中で 121 で 15 分間滅菌サイクルした。24 時間放置した後、レオロジー測定を行った。

(2) 実施例 27 の生成物 80 mg および実施例 28 からのも 20 mg を 10 ml の水 (濃度 1 %) に溶解した。24 時間後、ゲルを手動で均質化し、レオロジー測定を行った。結果を以下の表 2 に示す。

10

【 0182 】

【 表 2 】

表2

	粘度(Pa*s)	G'(Pa)	G''(Pa)
1	3.200	6.4	7.6
2	8.7	9	16

tau 1PaでSSで評価された数値

20

【 0183 】

実施例 30 : 実施例 26 に従って得られた架橋生成物の 2 % w/v ヒドロゲル 2.0 ml および 0.3 % w/v のリドカインを含有するシリンジの形態の医療用デバイスの調製
実施例 26 に従って得られた、粉末形態の 40 mg の架橋エステル化ポリマーを、6 mg の塩酸リドカインと共に滅菌 2.5 ml シリンジ中で秤量し ; 2.0 ml の 10 mM PBS 緩衝液 (pH 7.2) の水溶液をシリンジ中に導入した。ポリマーを室温で 24 時間膨潤させた。次いで、オートクレーブ中で、121 で 15 分間、標準サイクルに従ってシリンジを蒸気滅菌した。滅菌の 24 時間後、得られたゲルをシリンジから押し出し、レオロジー特性決定を行った。結果を以下の表 3 に示す。

【 0184 】

30

【 表 3 】

表3

	粘度(Pa*s)	G'(Pa)	G''(Pa)
2 PBS 10mM pH7.2	30.000	82	28

【 0185 】

実施例 31 : アミノ酸を含有する、実施例 26 に従って得られた架橋生成物の 2 % w/v ヒドロゲルの調製

実施例 26 に従って得られた、粉末形態の架橋エステル化ポリマー 107 mg を、滅菌 10.0 ml ガラス瓶中で秤量し ; 50 mM の濃度のヒスチジンを含有する乳酸リンゲルの水溶液 5.0 ml (pH 7.0) をガラス瓶中に注いだ。ポリマーを室温で 24 時間膨潤させた。次に、シールされたガラス瓶を、オートクレーブ内で 121 で 15 分間、標準サイクルに従って蒸気滅菌した。滅菌の 30 日後、得られたゲルをレオロジー特性決定にかけた。結果を以下の表 4 に示す。

40

【 0186 】

50

【表 4】

表4

	粘度(Pa*s)	G'(Pa)	G''(Pa)
2%乳酸リンゲル-ヒスチジン 50mM pH 7.0	89.500	130	35

【0187】

実施例32：実施例26に従って得られた架橋生成物から出発する眼科用製剤
5mlの水を10mlのガラス瓶に導入し、0.045gの塩化ナトリウムをそれに溶解した。次に、実施例26に従って得られた粉末形態の架橋エステル化ポリマー0.025gを添加した。ポリマーを室温で24時間膨潤させた。次に、シールされたガラス瓶を、オートクレーブ内で121で15分間、標準サイクルに従って蒸気滅菌した。

10

【0188】

実施例33：実施例26に従って得られた架橋生成物から出発する局所製剤

【0189】

【表 5】

INCI名	数量 % w/w
水	60.1
ケイ酸アルミニウムマグネシウム	2
実施例26の生成物	0.2
ベタイン	1
キシリトール	1
酢酸トコフェロール	0.5
D-パンテノール	0.2
ビオチン	0.05
フェノキシエタノール、カプリロイルグリコール グリセリン	0.7 34.25

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和4年7月22日(2022.7.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの許容可能な塩の調製方法であって、有機溶媒中のヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容可能な塩と、カルボキシル基活性化試薬および塩基との架橋反応を含み、ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容可能な塩が、1000kDa~10000kDaの範囲の重量平均分子量を有する高分子量多糖類と、1kDa~900kDaの範囲の重量平均分子量を有する低分子量多糖類との混合物であることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記低分子量多糖類が1kDa~500kDaの範囲の重量平均分子量を有し、前記高分子量多糖類が1000kDa~6000kDaの範囲の重量平均分子量を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記低分子量多糖類が50kDa~300kDaの範囲の重量平均分子量を有し、前記高分子量多糖類が1000kDa~2000kDaの範囲の重量平均分子量を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記高分子量多糖類および前記低分子量多糖類が80:20~20:80の重量比で存在する、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容される塩が、0.1~2.2の範囲の置換度を有する、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記ヒアルロン酸ブチレートまたはヒアルロン酸ブチレート-ホルメートの許容可能な塩が、ナトリウム、カリウムまたはリチウム塩、またはテトラブチルアンモニウムなどの第四級アンモニウム塩である、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記許容される塩がナトリウム塩である請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記有機溶媒が、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドンおよびホルムアミドなどの塩基性極性非プロトン性溶媒から選択される、請求項1~7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記有機溶媒がホルムアミドである請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記カルボキシル基活性化試薬が、カルボニルジイミダゾール、1,1'-カルボニル-ジ-(1,2,4-トリアゾール)、1,1'-オキサリルイミダゾール、1,1'-チオカルボニルイミダゾール、1,1'-カルボニルビス(2-メチルイミダゾール)、N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、p-ニトロフェニルトリフルオロアセテート、2-ハロ-N-アルキルピリジン塩およびハロゲン化アシルからなる群より

選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記カルボキシシル基活性化試薬が、カルボニルジイミダゾールである請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記塩基が、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属の炭酸塩、重炭酸塩および水酸化物から選ばれる無機塩基、少なくとも 1 つの三置換窒素原子を含む芳香族もしくは脂肪族有機塩基、またはトリエチルアミン、N - メチル - ピペラジンおよびジメチルアミノピリジンから選ばれる塩基性アミン、または有機酸のアルカリもしくはアルカリ土類金属塩から選択される、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記塩基が炭酸ナトリウムまたはジメチルアミノピリジンである請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

反応混合物を 2 0 ~ 3 0 の範囲の温度に 4 ~ 2 4 時間保持する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 4 に記載の方法によって得られる架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの許容可能な塩。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の架橋ヒアルロン酸ブチレートまたは架橋ヒアルロン酸ブチレート-ホルメートまたはそれらの薬学的に許容される塩、ならびに少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含む、医薬もしくは化粧品用製剤または医療用デバイス。

20

【請求項 1 7】

リドカインなどの局所麻酔薬を含有する、請求項 1 6 に記載の医薬もしくは化粧品用製剤または医療用デバイス。

【請求項 1 8】

皮膚化粧品の抗老化または活性化治療のための、およびメソセラピー適用における、請求項 1 6 に記載の化粧品用製剤の非治療的使用。

30

【請求項 1 9】

皮膚病変、発疹および眼病変の局所治療に使用するための、請求項 1 6 に記載の医薬製剤または医療用デバイス。

【請求項 2 0】

眼の手術、ドライアイの治療または変形性関節症の治療における補助剤としての、または皮膚充填剤としての、請求項 1 6 に記載の医療用デバイスの使用。

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2020/060888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K8/04	A61K8/73	A61K9/00
A61K31/738	A61P17/00	A61P17/02
A61Q19/08	C08B37/08	A61K47/36
A61K9/08	A61P27/02	A61K31/728
		A61Q19/06
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C09J A61P A61Q C08B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2010/292459 A1 (STUCCHI LUCA [IT] ET AL) 18 November 2010 (2010-11-18) cited in the application paragraph [0010] paragraph [0018] examples 9-12	1-20
Y	EP 0 341 745 A1 (FIDIA SPA [IT]) 15 November 1989 (1989-11-15) cited in the application page 3, line 46 - page 4, line 6 examples 1-10, 31-33, 35-39	1-20
Y	WO 97/49412 A1 (FIDIA SPA [IT]; BELINI DAVIDE [IT] ET AL.) 31 December 1997 (1997-12-31) page 7, line 22 - page 8, line 22 examples 1-16	1-20
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2021		Date of mailing of the international search report 08/02/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ovens, Annabel

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/060888

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2010/226988 A1 (LEBRETON PIERRE [FR]) 9 September 2010 (2010-09-09) paragraph [0020] paragraph [0024] - paragraph [0027] -----	1-20

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2020/060888

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
US 2010292459	A1	18-11-2010	AU 2007341078 A1	10-07-2008			
			CA 2673947 A1	10-07-2008			
			EP 1942117 A1	09-07-2008			
			EP 2097457 A1	09-09-2009			
			ES 2633712 T3	25-09-2017			
			JP 5372773 B2	18-12-2013			
			JP 2010514878 A	06-05-2010			
			PL 2097457 T3	29-12-2017			
			PT 2097457 T	20-07-2017			
			US 2010292459 A1	18-11-2010			
			WO 2008081255 A1	10-07-2008			
EP 0341745	A1	15-11-1989	AT 115590 T	15-12-1994			
			AT 195534 T	15-09-2000			
			AU 631125 B2	19-11-1992			
			CA 1339122 C	29-07-1997			
			DE 68919900 T2	11-05-1995			
			DE 68929241 T2	05-04-2001			
			DK 10990 A	12-03-1990			
			EP 0341745 A1	15-11-1989			
			EP 0614914 A2	14-09-1994			
			ES 2064378 T3	01-02-1995			
			ES 2151910 T3	16-01-2001			
			GR 3015035 T3	31-05-1995			
			GR 3034651 T3	31-01-2001			
			HU 210926 B	28-09-1995			
			IL 90274 A	12-09-1996			
			IT 1219587 B	18-05-1990			
			JP 2941324 B2	25-08-1999			
			JP H02504163 A	29-11-1990			
			JP H10324701 A	08-12-1998			
KR 900701849 A	04-12-1990						
NZ 229100 A	28-08-1995						
US 5676964 A	14-10-1997						
WO 8910941 A1	16-11-1989						
WO 9749412	A1	31-12-1997	AT 257386 T	15-01-2004			
			AU 732979 B2	03-05-2001			
			CA 2258920 A1	31-12-1997			
			DE 69727158 T2	11-11-2004			
			EP 0954323 A1	10-11-1999			
			ES 2214628 T3	16-09-2004			
			HK 1024865 A1	27-10-2000			
			IT PD960163 A1	22-12-1997			
			JP 2000512650 A	26-09-2000			
			US 6251876 B1	26-06-2001			
			WO 9749412 A1	31-12-1997			
			US 2010226988	A1	09-09-2010	BR PI0409762 A	09-05-2006
						CA 2521961 A1	28-10-2004
EP 1611160 A2	04-01-2006						
EP 2289945 A1	02-03-2011						
EP 2868669 A1	06-05-2015						
ES 2536564 T3	26-05-2015						
FR 2861734 A1	06-05-2005						
JP 4827727 B2	30-11-2011						
JP 2006522851 A	05-10-2006						
US 2006194758 A1	31-08-2006						

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2020/060888

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2010226988 A1	09-09-2010
		US 2012295870 A1	22-11-2012
		US 2014011990 A1	09-01-2014
		US 2015065701 A1	05-03-2015
		US 2016317571 A1	03-11-2016
		US 2019022130 A1	24-01-2019
		US 2020246375 A1	06-08-2020
		WO 2004092222 A2	28-10-2004

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/20 (2006.01)	A 6 1 L 27/20	
A 6 1 L 27/60 (2006.01)	A 6 1 L 27/60	
A 6 1 K 8/73 (2006.01)	A 6 1 K 8/73	
MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU, CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM, TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
(72)発明者	ストウッチ、 ルカ	
	イタリア国 3 3 0 5 0 (ウーディネ) トルヴィスコーサ ピアッツァーレ マリノッティ 1 ビー エムジー ファーマ ソシエタ ペル アチオニ内	
(72)発明者	セチ、 アレッサンドラ	
	イタリア国 3 3 0 5 0 (ウーディネ) トルヴィスコーサ ピアッツァーレ マリノッティ 1 ビー エムジー ファーマ ソシエタ ペル アチオニ内	
(72)発明者	ピコッティ、 フェブリジオ	
	イタリア国 3 3 0 5 0 (ウーディネ) トルヴィスコーサ ピアッツァーレ マリノッティ 1 ビー エムジー ファーマ ソシエタ ペル アチオニ内	
(72)発明者	ジアンニ、 リタ	
	イタリア国 3 4 0 1 6 (トリエステ) モンルピーノ ロカリータ レペン 1 0 5	
F ターム (参考)	4C081 AB02 AB19 BA12 BA13 CD081 CE02	
	4C083 AD331 EE12 FF01	
	4C086 AA01 AA02 AA04 EA25 MA01 MA02 MA04 MA58 MA63 NA14 ZA33 ZA89	
	4C090 AA02 AA05 BA67 BB72 BB94 BD36 BD37 CA07 CA35 CA38 DA22 DA23 DA26	