

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-515426

(P2014-515426A)

(43) 公表日 平成26年6月30日(2014.6.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C08B 37/00 (2006.01)	C08B 37/00	Z 4C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4C086
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C090
A61P 17/02 (2006.01)	A61P 17/02	
A61K 31/728 (2006.01)	A61K 31/728	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2014-513146 (P2014-513146)	(71) 出願人	509198343 ノボザイムス バイオファーマ デーコー アクティーゼルスカブ デンマーク国, デーコー-2880 バグ スバエルト, クロシェイバイ 36
(86) (22) 出願日	平成24年5月29日 (2012.5.29)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成25年11月28日 (2013.11.28)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/059959	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02012/163884	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成24年12月6日 (2012.12.6)	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(31) 優先権主張番号	11168106.0		
(32) 優先日	平成23年5月30日 (2011.5.30)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子量ヒアルロン酸の噴霧乾燥

(57) 【要約】

噴霧乾燥されたヒアルロン酸の製造方法であって、以下：

- a) ヒアルロン酸を噴霧乾燥し、噴霧乾燥器への供給物 (feed) 中のヒアルロン酸の濃度は、3.5 g/l ~ 7.0 g/l の範囲にある；
- b) 0 ~ 100 の範囲での噴霧乾燥器への供給物中の温度を有すること
- を含み、噴霧乾燥器への供給物中のヒアルロン酸の分子量が1200 kDa以下である、製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

噴霧乾燥されたヒアルロン酸の製造方法であって、以下：

a) ヒアルロン酸を噴霧乾燥し、噴霧乾燥器への供給物 (feed) 中のヒアルロン酸の濃度は、3.5 g/l ~ 7.0 g/l の範囲にある；

b) 0 ~ 100 の範囲での噴霧乾燥器への供給物中の温度を有すること
を含み、噴霧乾燥器への供給物中のヒアルロン酸の分子量が1200 kDa以下である、製造方法。

【請求項 2】

前記ヒアルロン酸がヒアルロン酸又はその塩である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記ヒアルロン酸の塩が、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸アンモニウム、ヒアルロン酸カルシウム、ヒアルロン酸マグネシウム、ヒアルロン酸亜鉛、及びヒアルロン酸コバルトからなる群より選ばれる、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

噴霧乾燥器への供給物中のヒアルロン酸が、1200 kDa ~ 10,000 kDa の範囲の分子量を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記ヒアルロン酸が誘導化される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記誘導化ヒアルロン酸が、アリアル/アルキルコハク酸無水物ヒアルロン酸又はアクリル化ヒアルロン酸である、請求項 5 記載の方法。

20

【請求項 7】

前記噴霧乾燥が、ロータリーアトマイザ又は二流体ノズル (TFN) 噴霧乾燥機を用いて行われる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記噴霧乾燥器が、以下の条件：

入口温度：100 ~ 200 、及び

出口温度：40 ~ 95

を用いて行われる、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 9】

噴霧乾燥中の分子量の損失が 15 % 未満である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

噴霧乾燥器への供給物が活性成分をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

噴霧乾燥器への供給物が賦形剤をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、多糖類、特にヒアルロン酸又はその塩の噴霧乾燥に関する。

40

【背景技術】

【0002】

背景

ヒアルロン酸 (HA) は、非-硫酸化グリコサミノグリカンの種類に属する天然かつ線状の糖類ポリマーである。それは、最大10 MDaの分子量 (MW) を有する、 -1,3-N-アセチルグルコサミン及び -1,4-グルクロン酸から成る。HAは、硝子軟骨、滑膜関節液、及び皮膚組織、真皮及び表皮の両方に存在する。

【0003】

HAは、脊椎動物の結合組織を含む天然組織から、ヒト臍帯から及びニワトリのとさかか

50

ら抽出できる。しかし、感染性物質を移す潜在的なリスクを最小限にするために、及び製品の均一性、品質及び入手性を上げるために、微生物学的方法によって調製することが今日では好ましい（米国特許第6,951,743号明細書）。

【0004】

体内でのHAの多数の役割が同定されている。HAは、多くの組織、例えば皮膚、腱、筋肉及び軟骨、の細胞のための機械的支持体として、生物において重要な役割を果たす。HAは、重要な生物学的プロセス、例えば組織の湿潤化及び潤滑に関連している。また、多数の生理学的機能、例えば接着、細胞運動、癌、脈管形成、及び損傷治癒において役割を有すると推測される。

【0005】

HAの独特な物理的及び生物学的性質（粘弾性、生物適合性、及び生物分解性）に因って、HAは、化粧品、眼科、リウマチ、薬物及び遺伝子送達、損傷治癒及び組織工学内の、幅広い範囲の現在のかつ進展中の出願において採用されている。

【0006】

WO 05/116531は、ヒアルロン酸（800 kDaの分子量を有する - 実施例6参照）の噴霧乾燥方法を記載する。

約1200 kDaよりも高分子量を有するヒアルロン酸を噴霧乾燥すると、分子量の顕著な損失が見られることがある。

【発明の概要】

【0007】

発明の概要

本発明は、高分子量を有するヒアルロン酸の噴霧性乾燥法に関する。該方法は、以下：

a) ヒアルロン酸を噴霧乾燥し、噴霧乾燥器に供給されるヒアルロン酸の濃度は、3.5 g/l ~ 7.0 g/lの範囲にある；

b) 0 ~ 100 の範囲での噴霧乾燥器への供給の温度を有すること

を含み、噴霧乾燥器に供給されるヒアルロン酸の分量が1200 kDa以下である。

本発明の方法は、噴霧乾燥ヒアルロン酸生成物の分子量の損失を減少させる。

【発明を実施するための形態】

【0008】

詳細な説明

本発明は、高分子量を有するヒアルロン酸を噴霧乾燥する方法に関する。

【0009】

ヒアルロン酸

「ヒアルロン酸」は、-1,4-及び-1,3-グリコシド結合を交互にすることによって互いに結合し、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）とグルクロン酸（GlcUA）との繰り返し二糖単位から成る非硫酸化グルコサミノグリカンとして本明細書で定義される多糖である。ヒアルロン酸は、ヒアルロナン、ヒアルロネート又はHAとしても知られている。用語ヒアルロナン及びヒアルロン酸は本明細書で交換的に使用される。

【0010】

Rooster combsは、ヒアルロナンの重要な商業的源である。微生物は代替的な起源である。米国特許第4,801,539号明細書は、ストレプトコッカス ズーエピデミクス（*Streptococcus zooepidemicus*）株を含むヒアルロン酸を調製する発酵方法を開示している。WO 03/054163は、パチルス宿主を含むヒアルロン酸の発酵方法を開示している。

【0011】

脊椎動物、細菌性病原菌及び藻類ウイルスからのヒアルロナン合成が記載されている（DeAngelis, P. L, 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56: 670-682）。WO 99/23227は、ストレプトコッカス・エクイシミス（*Streptococcus equisimilis*）からの群Iヒアルロネート合成を開示している。WO 99/51265及びWO 00/27437は、パスツレラ・ムルトシダ（*Pasturella multocida*）からの群IIヒアルロネート合成を開示している。Ferretti等は、ヒアルロネート合成酵素、UDPグルコースデヒドロゲナーゼ及びUDP-グルコースピロホスホリ

10

20

30

40

50

ラーゼをそれぞれコードする3つの遺伝子、hasA、hasB及びhasCから成る、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) のヒアルロナン合成酵素オペロンを開示している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4658-4663, 2001)。WO 99/51265は、ストレプトコッカス・エクシミリスのヒアルロナン合成酵素のためのコーディング領域を有する核酸断片を開示している。

【0012】

組換えバチルス細胞のヒアルロナンが培養培地中に直接発現されるので、培養培地からヒアルロナンを単離するために簡単な方法を使用できる。まず、バチルス細胞及び細胞残骸を培養培地から物理的に除去する。培養培地は必要ならまず希釈して、培地の粘度を減少させることができる。培養培地から細胞を除くための多くの方法、例えば遠心分離又は精密濾過、が当業者に知られている。次いで、残りの上清を例えば限外濾過によって濾過して、濃縮して、ヒアルロナンからの小分子汚染物質を除くことができる。細胞及び細胞残骸を除いた後に、公知のメカニズムによって培地からのヒアルロナンの簡便な沈殿を行うことができる。ろ液からヒアルロナンを沈殿させるために、塩、アルコール、又は塩とアルコールの混合物を使用できる。

10

【0013】

ヒアルロナンは、例えば本発明の噴霧乾燥法を用いて、任意の溶液、例えばろ液又は再溶解溶液から乾燥することができる。

【0014】

宿主細胞

好ましい実施態様は、ヒアルロン酸又はその塩が、組換えによって好ましくはグラム陽性菌又は宿主細胞によって、より好ましくはバチルス属の細菌によって産生される、との第1の局面の産物に関する。

20

【0015】

宿主細胞は、ヒアルロン酸の組換え産生に好適な任意のバチルス細胞でよい。バチルス宿主細胞は、野生型バチルス細胞又はその変異体でよい。本発明の実施において有用なバチルス細胞は、バチルス・アガラドハエレンス (*Bacillus agaraderhens*)、バチルス・アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、プレビバチルス (*Bacillus brevis*)、バチルス・サーアクランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・クラウジイ (*Bacillus clausii*)、バチルス・コアグランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・ラウタス (*Bacillus lautus*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブティリス (*Bacillus subtilis*)、及びバチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) 細胞を含むが、これらに限定されない。組換え発現に特に適合したバチルス・サブティリス細胞の変異体は、WO 98/22598に記載されている。非カプセル化バチルス細胞は、本発明では特に有利である。

30

【0016】

好ましい実施態様では、バチルス宿主細胞は、バチルス・アミロリクエファシエンス、バチルス・クラウジイ、バチルス・レントス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・ステアロサーモフィルス、又はバチルス・サブティリスの細胞である。

40

【0017】

製造

本発明の方法では、細胞 (例えば、ストレプトコッカス) 又は宿主細胞 (例えば、バチルス) は、当該分野で公知の方法を用いてヒアルロン酸の産生に適した栄養培地中で培養される。

【0018】

例えば、細胞は、研究室的又は工業的発酵装置中で、振とうフラスコ培養、小スケール

50

又は大スケール発酵（連続的、バッチ式、流加培養、又は固相発酵を含む）によって培養することができる。

【0019】

培養は、当該分野で公知の手法を用いて、炭素源及び窒素源、及び無機塩を含む好適な栄養培地中で行う。好適な培地は、商業的な供給者から入手するか、又は公表された組成物に従って調製することができる（例えば、American Type Culture Collectionのカatalogue）。

【0020】

ヒアルロン酸の濃度は、例えば修飾カルパゾール法（Bitter and Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334）を用いて、当該分野で知られているように決定することができる。

10

【0021】

分子量

ヒアルロン酸の平均分子量は、当該分野で知られているように測定することができる。

【0022】

具体的には、ヒアルロン酸の平均分子量は、当該分野で標準的な方法、例えば、Ueno等., 1988, Chem. Pharm. Bull. 36, 4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; 及びWyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual" and "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, Californiaによって決定することができる。

20

【0023】

ヒアルロン酸の分子量決定は、GPC-RI-LSを用いても行うことができる。ヒアルロン酸の分子量決定は、示差RI及び多角度光散乱検出器と一体となったGPCを用いて行なう。

【0024】

好ましい実施態様では、噴霧乾燥器中への供給物（feed）中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDaであり；特に噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～10,000 kDaであり；好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～9,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～9,000 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～8,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～8,000 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～7,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～7,000 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～6,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～6,000 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～5,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～5,000 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～4,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～4,000 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～3,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～3,000 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～2,900 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～2,800 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～2,700 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～2,600 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa～2,500 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なく

30

40

50

とも1200 kDa ~ 2,400 kDaであり；より好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa ~ 2,300 kDaであり；特に好ましくは噴霧乾燥器中への供給物中のヒアルロン酸の分子量は少なくとも1200 kDa ~ 2,200 kDaである。

【0025】

好ましい実施態様では、ヒアルロン酸は、15%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；例えば、ヒアルロン酸は、14%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、13%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、12%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、11%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、10%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、9%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、8%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、7%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；ヒアルロン酸は、6%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有し；特に、ヒアルロン酸は、5%未満の噴霧乾燥中の分子量減少を有する。

10

【0026】

HA塩

好ましい実施態様は、ヒアルロン酸の塩を含む生成物に関する；具体的には、ヒアルロン酸の無機塩、好ましくは、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸アンモニウム、ヒアルロン酸カルシウム、ヒアルロン酸マグネシウム、ヒアルロン酸亜鉛、又はヒアルロン酸コバルトである。

【0027】

20

誘導化HA

本発明に従う噴霧乾されるべきヒアルロン酸は、当該分野で公知のように誘導化し又は修飾することができる。

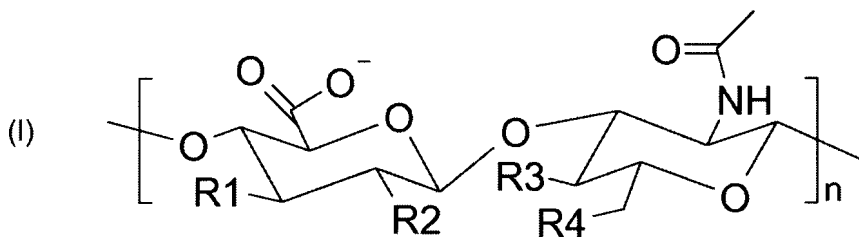
【0028】

HAは、例えばWO 2007/033677に記載されているような多くの異なった方法で、誘導化又は修飾することができる。そこでは、ヒアルロン酸(HA)は、アルール-又はアルキルコハク酸無水物(ASA)と反応して、n個の繰り返し単位を含み、pH 8~9で一般構造式(1)を有する、アリール/アルキルコハク酸無水物HA誘導体を製造することができる。

【0029】

【化1】

30



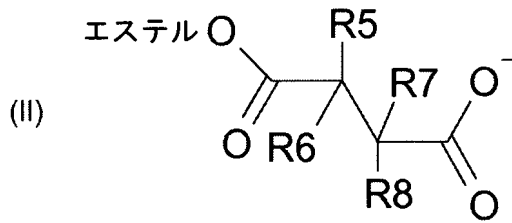
40

【0030】

[式中、少なくとも1つの繰り返し単位において、R1、R2、R3、R4の1以上は、pH 8~9で一般構造式(II)を有するエステル結合されたアルキル-/アリール-コハク酸を含むか、あるいは、R1、R2、R3、R4は水酸基(OH)である。]

【0031】

【化2】



10

【0032】

[式中、R5、R6、R7、R8の少なくとも1つは、アルキル-又はアリアル基を含み、あるいはR5、R6、R7、R8は水素原子(H)であり、酸素標識「エステル」は構造(1)を有するエステル結合を有する(partake)。]

【0033】

HAは、WO 2007/106738に記載のように誘導化又は修飾することができる。アクリル化ヒアルロン酸は以下の方法で製造される：

(a) ヒアルロン酸を含む7~11のpHを有する水溶液を調製し；

(b) アクリルクロリド及びメチレンクロリド/ジエチルエーテルを含む有機液体を調製し；及び

20

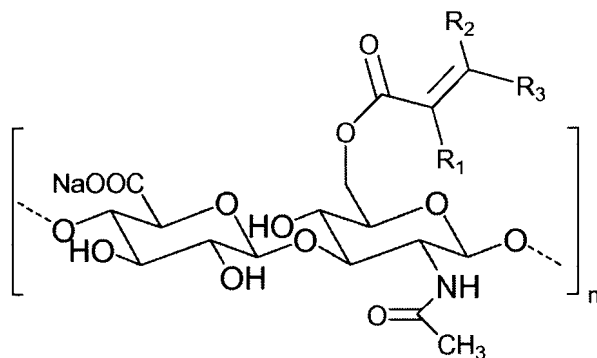
(c) (b)の有機液体と(a)の水溶液とを混合すること、ここで、pHは7~11に維持される。

【0034】

アクリル化ヒアルロン酸生成物は以下の構造を有する。

【0035】

【化3】



30

【0036】

[R₁は、水素、メチル、塩化物、COClからなる群より選択され、R₂は、水素、メチル、フェニル、塩化物、2-クロロフェニル、COCl及びCH₂COClからなる群より選択され、R₃は、水素、メチル、塩化物、4-ニトロフェニル、3-トリフルオロメチルフェニル及びブチル部分からなる群より選択される。]

40

【0037】

噴霧乾燥器への供給物

噴霧乾燥器への供給物中のヒアルロン酸の濃度は、3.5 g/l~7.0 g/lの範囲；例えば、3.6 g/l~7.0 g/lの範囲；3.7 g/l~7.0 g/lの範囲；3.8 g/l~7.0 g/lの範囲；3.9 g/l~7.0 g/lの範囲；4.0 g/l~7.0 g/lの範囲；4.0 g/l~6.9 g/lの範囲；4.0 g/l~6.8 g/lの範囲；4.0 g/l~6.7 g/lの範囲；4.0 g/l~6.6 g/lの範囲；4.0 g/l~6.5 g/lの範囲；4.0 g/l~6.4 g/lの範囲；4.0 g/l~6.3 g/lの範囲；4.0 g/l~6.2 g/lの範囲；4.0 g/l

50

~6.1 g/lの範囲；特に、4.0 g/l~6.0 g/lの範囲でよい。

【0038】

他の成分

本発明の1実施態様では、ヒアルロン酸を含む供給物は、他の成分、例えば活性成分及び/又は賦形剤を含んでもよい。

【0039】

本発明で用いられる活性成分又は薬学的に活性な物質の非限定的な例は、タンパク質及び/又はペプチド薬を含む。

【0040】

タンパク質及び/又はペプチド薬の例は、ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、ブタ成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン/ペプチド、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、骨形成タンパク質、インターフェロン又はその誘導体、インシュリン又はその誘導体、アトリオペプチン-III、モノクローナル抗体、腫瘍壊死因子、マクロファージ活性化因子、インターロイキン、腫瘍退行性因子、インシュリン様成長因子、上皮成長因子、組織プラスイノーゲン因子I、IV、III、V、及びウロキナーゼである。

10

【0041】

賦形剤は、例えば、活性成分（複数）を安定化する目的で本発明に従って含有することができ、このような賦形剤は、タンパク質、例えばアルブミン又はゼラチン；アミノ酸、例えばグリシン、アラニン、グルタミン酸、アルギニン、リジン、及びその塩；糖類、例えばグルコース、ラクトース、キシロース、ガラクトース、フルクトース、マルトース、サッカロース、デキストラン、マンニトール、ソルビトール、トレハロース、及び硫酸コンドロイチン；無機塩、例えばリン酸塩；界面活性剤、例えばTWEEN（登録商標）（ICI）、ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物を含むことができる。

20

【0042】

噴霧乾燥

噴霧乾燥は、液体供給原料の液滴スプレーへの噴霧、及び乾燥チャンバ中で該液滴を熱気と接触させることを含む。スプレーは、ロータリー（ホイール）又はノズルアトマイザのいずれかによって製造される。

液滴の大きさは、典型的には、噴霧化原理に因り、10~100マイクロメートルの範囲である。主に2つの種類のノズルがある：高圧単一流体ノズル（50~500バール）及び二流体ノズル：1つの流体は乾燥するための液体であり、2つ目の流体は圧縮ガス（一般的に空気は2~7バール）である。

30

【0043】

液滴からの水分の濃縮及び乾燥粒子の形成は、制御された温度及び気流の条件下で起こる。粉末は、乾燥チャンバから連続的に除かれる。操作条件は対象の生成物の乾燥性に従って選択される。

【0044】

当該分野で公知の任意の噴霧乾燥器は、本発明に従って使用できるが、本方法の態様ではない、噴霧乾燥ステップは二流体ノズル（TFN）又はロータリーアトマイザを用いて行われる。

40

【0045】

噴霧乾燥は、100 ~200 の入口温度；好ましくは120 ~200 の入口温度；特に140 ~200 の入口温度を用いて行うことができる。

【0046】

噴霧乾燥は、40 ~95 の出口温度；好ましくは50 ~94 の出口温度；好ましくは60 ~94 の出口温度；特に70 ~93 の出口温度を用いて行うことができる。

【0047】

噴霧乾燥は、0 ~100 の供給温度；例えば1 ~100 の供給温度；2 ~100 の供給温度；3 ~100 の供給温度；4 ~100 の供給温度；5 ~100 の供給温度；6 ~100

50

の供給温度；7～100の供給温度；8～100の供給温度；9～100の供給温度；10～100の供給温度；11～100の供給温度；12～100の供給温度；13～100の供給温度；14～100の供給温度；15～100の供給温度；16～100の供給温度；17～100の供給温度；18～100の供給温度；19～100の供給温度；20～100の供給温度；21～100の供給温度；22～100の供給温度；23～100の供給温度；24～100の供給温度；25～100の供給温度；26～100の供給温度；27～100の供給温度；28～100の供給温度；29～100の供給温度；30～100の供給温度；31～100の供給温度；32～100の供給温度；33～100の供給温度；34～100の供給温度；35～100の供給温度；36～100の供給温度；37～100の供給温度；38～100の供給温度；39～100の供給温度；40～100の供給温度；41～100の供給温度；42～100の供給温度；43～100の供給温度；44～100の供給温度；45～100の供給温度；46～100の供給温度；47～100の供給温度；48～100の供給温度；49～100の供給温度；50～100の供給温度；51～100の供給温度；52～100の供給温度；53～100の供給温度；54～100の供給温度；55～100の供給温度；56～100の供給温度；57～100の供給温度；58～100の供給温度；59～100の供給温度；60～100の供給温度；61～100の供給温度；62～100の供給温度；63～100の供給温度；64～100の供給温度；65～100の供給温度；66～100の供給温度；67～100の供給温度；68～100の供給温度；69～100の供給温度；70～100の供給温度；特に、70～99の供給温度を用いて行うことができる。

10

20

【0048】

ノズル空気温度は、典型的には、10～100；特に20～90の範囲になる。

【0049】

ロータリーアトマイザの周速は、典型的には、50 m/s～250 m/sになる。

【0050】

噴霧乾燥による本発明に従う乾燥微粉を製造することは第一に簡便である。次いで、前記微粉は、流動床及び液体バインダー内で流動化することができる、例えば凝集体をつくるために水を機器に噴霧する。

【実施例】

【0051】

実施例 1

供給物中のヒアルロン酸（HA）濃度、供給温度及び噴霧原理の異なった組合せを用いる噴霧乾燥

30

HAは、HA濃度、供給温度及び噴霧原理（外部TFN又はロータリーアトマイザ）の異なった組合せを用いる小（minor）パイロットスケール噴霧乾燥器（MM）に供した。すべての実験は、GEA流動的小パイロットスケール噴霧乾燥器（MM）で行った。

【0052】

以下のパラメータを測定した：噴霧乾燥器への供給物中のHAのMW、生成物中のHAのMW、及び粒径分布（PSD）。

【0053】

すべての実験は、195の乾燥チャンバ入口温度、85の出口温度、及び約80 kg/hの乾燥気流で行った。

40

【0054】

表1は、噴霧原理としてのロータリーを用いた結果を、表2は、噴霧原理としてのTFNを用いた結果を纏める。

【0055】

【表 1】

表 1.

供給温度, °C	供給物中の HA濃度, g/L	噴霧原理	SD生成物中 のHA MW, MDa	供給物中 のHA MW, MDa	MW損失, MDa	MW 損失%	平均粒子径 (μm)
20	1	ロータリー	1.16	1.30	0.14	10.8	7.2
95	1	ロータリー	1.09	1.28	0.19	14.8	6.9
55	4	ロータリー	1.29	1.30	0.01	0.8	10.5
55	4	ロータリー	1.25	1.28	0.03	2.4	11.7
95	7	ロータリー	1.24	1.31	0.07	5.3	16.2
18	7	ロータリー	1.30	1.32	0.02	1.5	17.2

10

【 0 0 5 6 】

【表 2】

表 2.

供給温度, °C	供給物中の HA濃度, g/L	噴霧原理	SD生成物中 のHA MW, MDa	供給物中 のHA MW, MDa	MW損失, MDa	MW 損失%	平均粒子径 (μm)
20	1	外部TFN	0.998	1.30	0.302	23.2	3.9
95	1	外部TFN	1.10	1.32	0.220	16.8	7.5
55	4	外部TFN	1.19	1.31	0.120	9.1	6.3
95	7	外部TFN	1.21	1.33	0.120	9.0	9.7
18	7	外部TFN	1.23	1.30	0.070	5.3	7.7

20

【 0 0 5 7 】

生成物はいずれも変色を示さなかった。表1及び2の結果の統計的分析は、供給物中の高HA濃度を用いることが噴霧乾燥中にMW損失の顕著な減少をもたらすことを示している。

【 0 0 5 8 】

実施例 2

様々な分子量を有するヒアルロン酸の噴霧乾燥

様々なヒアルロン酸 (HA) 分子量 (MW) 及び濃度のHAの供給の様々なバッチを、外部二流体ノズル (TFN) に備えられたパイロットスケールの流動化噴霧乾燥器 (FSD) で噴霧乾燥した。

【 0 0 5 9 】

表3は、供給物中の濃度、HA分子量、及び乾燥生成物のHA分子量の概要を示す。

【 0 0 6 0 】

すべてのバッチは、195 の乾燥チャンバ入口温度、89 の出口温度、及び95 の供給温度で噴霧乾燥した。

【 0 0 6 1 】

いずれの生成物も変色を示さなかった。

【 0 0 6 2 】

30

40

【表 3】

表 3.

供給物中の HA濃度, g/L	SD生成物中 のHA MW, MDa	供給物中 のHA MW, MDa	MW損失, MDa	MW損失, %	平均粒子径 (μm)
1.8	1.22	1.79	0.570	31.8	4
3.3	1.01	1.23	0.220	17.9	6
3.7	1.08	1.21	0.130	10.7	6

10

【 0 0 6 3 】

実施例 3

供給物中のヒアルロン酸 (HA) 濃度、供給温度及び噴霧原理の異なった組合せを用いる噴霧乾燥

HAは、HA濃度、供給温度及び噴霧原理 (外部TFN又はロータリーアトマイザ) の異なった組合せを用いる小 (minor) パイロットスケール噴霧乾燥器 (MM) に供した。すべての実験は、GEA流動的小パイロットスケール噴霧乾燥器 (MM) で行った。

【 0 0 6 4 】

以下のパラメータを測定した：噴霧乾燥器への供給物中のHAのMW、生成物中のHAのMW、及び粒径分布 (PSD)。

20

【 0 0 6 5 】

すべての実験は、195 の乾燥チャンバ入口温度、85 の出口温度、及び約80 kg/hの乾燥気流で行った。表4は、結果を纏める。

【 0 0 6 6 】

【表 4】

表 4.

供給温度, ℃	供給物中の HA濃度, g/L	噴霧原理	SD生成物中 のHA MW, MDa	供給物中 のHA MW, MDa	MW損失, MDa	MW 損失%	平均粒子径 (μm)
55	4	ロータリー	1.29	1.30	0.010	0.77	11
55	4	ロータリー	1.25	1.28	0.030	2.34	12
95	7	ロータリー	1.24	1.31	0.070	5.34	16
95	7	TFN	1.21	1.33	0.120	9.02	10
18	7	ロータリー	1.30	1.32	0.020	1.51	17
18	7	外部	1.23	1.30	0.070	5.38	8
75	3	ロータリー	1.24	1.28	0.040	3.13	9
87	4	ロータリー	1.34	1.36	0.020	1.47	9
87	4	ロータリー	1.30	1.34	0.040	2.99	6
87	4	ロータリー	1.30	1.38	0.080	5.80	6
98	5	ロータリー	1.31	1.35	0.040	2.96	15
75	5	ロータリー	1.30	1.37	0.070	5.11	6
20	1	ロータリー	1.45	1.82	0.37	20.4	6
20	1	TFN	1.21	1.84	0.63	34.2	5
95	1	TFN	1.27	1.86	0.59	31.7	6
95	1	ロータリー	1.34	1.85	0.51	27.6	6
55	4	ロータリー	1.80	1.90	0.10	5.26	7
55	4	TFN	1.53	1.91	0.38	19.9	7
95	7	ロータリー	1.95	2.10	0.15	7.14	n. d.
95	7	TFN	1.54	1.99	0.45	22.6	10
20	7	ロータリー	1.36	2.01	0.65	32.3	7
20	7	TFN	1.45	1.89	0.44	23.3	6

n. d. : 未測定

【 0 0 6 7 】

表4から明らかのように、1 g/lの供給濃度では、分子量損失は高かった（20.4%；34.2%；31.7%、及び27.6%）。表4から明らかのように、7 g/lの供給濃度は、上限、すなわち優れた結果も得られる、ようであり、結果によっては高分子量損失を有した（22.6%；32.3%；及び23.3%）。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/059959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C08B37/00 B01D1/18 C08L5/08 ADD.		
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) C08B B01D C08L		
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, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/116131 A1 (NOVOZYMES BIOPOLYMER AS [DK]) 8 December 2005 (2005-12-08) claims; examples	1-11
X	----- US 2005/158392 A1 (KIM MYUNG-JIN [KR] ET AL) 21 July 2005 (2005-07-21) example 28; table 1 paragraph [0023] - paragraph [0024]; claims 16-18 -----	1-11
<input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 August 2012		04/09/2012
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 Vaccaro, Eleonora

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/059959

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005116131 A1	08-12-2005	CA 2567722 A1 EP 1753810 A1 IL 178701 A JP 2008500411 A WO 2005116131 A1	08-12-2005 21-02-2007 27-09-2011 10-01-2008 08-12-2005
US 2005158392 A1	21-07-2005	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784
弁理士 中村 和美

(72)発明者 クリストフェル テメラース
スウェーデン国, エス - 2 4 6 1 8 ブンケフロストランド, スクンパルプスベージェン 4 ベー

(72)発明者 ポール バッハ
デンマーク国, デーコー - 3 4 6 0 ビルケレス, ノルトバングスバルケン 4 8

Fターム(参考) 4C084 AA19 NA20 ZA892 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA25 NA20 ZA89 ZB26
4C090 AA03 AA09 BA67 BB18 BB22 BB53 BD24 CA19 DA23