

HUMIC ACID

**PROCESS FOR PREPARING SYNTHETIC SOIL-
EXTRACT MATERIALS AND MEDICAMENTS
BASED THEREON**

Japan



***Laub BioChemicals Corporation
1401 Quail St., Suite 121
Newport Beach, CA 92660***

April 2009



特 許 証
(CERTIFICATE OF PATENT)

特許第 4 2 9 4 4 3 6 号
(PATENT NUMBER)

発明の名称(TITLE OF THE INVENTION)

合成土壌抽出物の調整プロセスとこれを用いた医薬品

特許権者(PATENTEE)

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 6 0, ニューポートビーチ, クエイルス
トリート, 1 4 0 1, スイート, 1 2 1

国籍 アメリカ合衆国

ローブ バイオケミカルズ コーポレーション

発明者(INVENTOR)

ローブ・リチャード・ジュニア

出願番号(APPLICATION NUMBER)

特願 2 0 0 3 - 3 6 0 2 7 7

出願年月日(FILING DATE)

平成 1 0 年 2 月 6 日 (February 6, 1998)

この発明は、特許するものと確定し、特許原簿に登録されたことを証する。
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE JAPAN PATENT OFFICE.)

平成 2 1 年 4 月 1 7 日 (April 17, 2009)

特 許 庁 長 官 (COMMISSIONER, JAPAN PATENT OFFICE)

鈴木 隆史



住所

7101-0021

東京都千代田区外神田2丁目17番2号 延
寿お茶の水ビル3階 児玉特許事務所

氏名

鬼玉 喜博

様

特許番号 第4294436号

登録日 平成21年 4月17日

出願番号 特願2003-360277

出願日 平成10年 2月 6日

2 請求項の数

第 3 年分まで
納付年分

受領金額 8,100円

受領日 平成21年 4月 8日

特許料納付期限日

- ・特許権を維持するには、存続期間の満了（特許出願の日から20年）までの各年について所定の特許料の納付が必要です。
- ・第4年以降の各年分の特許料は、登録日（出願公告を経て特許になった場合は、公告日）の翌日を起算日として、納付済年分の満了日（以下「納付期限日」という）までに、次の年分の納付が必要です。

- ・納付期限日までに納付できなかったときは、その期間の経過後6ヶ月以内であれば特許料を追納することができます。

- ・追納する場合は、納付すべき特許料のほか、その特許料と同額の割増特許料が必要です。

- ・追納できる期間内に納付しないときは、その特許権は、納付期限日にさかのぼって消滅したものとみなされます。

- ・特許料納付書の様式及び特許料の額については、以下を参照してください。

特許庁ホームページ

<http://www.jpo.go.jp/indexj.htm>

[illegible]

(注) 納付期限日が行政機関の休日にあたるときは、その日の翌日が期間の末日となります。

問い合わせ先 出願支援課登録室
電話 03(3581)1101 (代表)
特許担当 内線 2708

証 明 請 求 書

平成22年 8月 4日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

特許第4294436号

2. 請求人

郵便番号 101-0021
住所又は居所 東京都千代田区外神田2丁目17番2号
延寿お茶の水3階
お茶の水内外特許事務所
氏名又は名称 長谷部 善太郎

3. 証明に係る書類名

特許公報（特許第4294436号）

証明に係る書類名に記載した事項について相違ないことを証明してください。

証明に係る書類名について相違ないことを証明します。

平成22年 8月10日

特許庁長官

細野 哲弘



(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4294436号

(P4294436)

(45) 発行日 平成21年7月15日 (2009. 7. 15)

(24) 登録日 平成21年4月17日 (2009. 4. 17)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/775 (2006. 01)

A 6 1 K 31/775

A 6 1 K 35/14 (2006. 01)

A 6 1 K 35/14

A

A 6 1 K 35/16 (2006. 01)

A 6 1 K 35/14

Z

A 6 1 K 9/08 (2006. 01)

A 6 1 K 35/16

A 6 1 K 9/12 (2006. 01)

A 6 1 K 9/08

請求項の数 2 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-360277 (P2003-360277)
 (22) 出願日 平成15年10月21日 (2003. 10. 21)
 (62) 分割の表示 特願平10-535004の分割
 原出願日 平成10年2月6日 (1998. 2. 6)
 (65) 公開番号 特開2004-169007 (P2004-169007A)
 (43) 公開日 平成16年6月17日 (2004. 6. 17)
 審査請求日 平成17年2月4日 (2005. 2. 4)
 (31) 優先権主張番号 08/798, 329
 (32) 優先日 平成9年2月10日 (1997. 2. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503385750
 ローブ バイオケミカルズ コーポレーシ
 ョン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州926
 60, ニューポートビーチ, クエイルスト
 リート, 1401, スイート, 121
 (74) 代理人 100105061
 弁理士 児玉 喜博
 (72) 発明者 ローブ・リチャード・ジュニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州926
 60, ニューポートビーチ, バイウッドド
 ライブ, 154

審査官 鶴見 秀紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成土壌抽出物の調整プロセスとこれを用いた医薬品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

合成フミン酸を製造する方法であって、
 a) 2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸 (ホモゲンチジン酸) を出発有機化合物として、
 該出発物質を水酸化ナトリウムからなる水溶液中に溶解するステップと、
 b) 段階a) で得られた水溶液のpHを、必要に応じて8~11に調整するステップと、
 c) 段階b) で得られた水溶液に、アルカリ性過ヨウ素酸塩又はアルカリ土類過ヨウ素
 酸塩を加えるステップと、
 d) 段階c) で得られた溶液の温度を35~80℃に30分~100時間保つステップと、
 e) ホウ酸、ホウ酸塩、アルカリ土類金属塩、遷移金属塩、アルカリ性硫化物、アルカ
 リ土類硫化物、遷移金属硫化物からなるグループから選択した1種類又は複数の化合物を
 、段階d) で得られた水溶液に加えるステップと、
 f) 段階e) で得られた水溶液を攪拌しながら、又は攪拌せずに室温で2~48時間放置
 するステップと、
 g) 段階f) で得られた溶液から500~10,000ダルトン以下の分子を除去するステップ
 と、
 h) 段階g) で得られた溶液を濃縮するステップと、
 i) 段階h) で得られた溶液から、必要に応じて水を除去するステップ
 とを含む方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法に従って製造した抗ウイルス量の合成フェノールポリマー成分を血液製剤と組み合わせた血液製剤混合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はフェノールポリマーからなる合成土壌抽出物質と、その調整法と、合成物質を水溶液または乾燥粉末として精製及び単離するためのプロセスと、血液製剤中のウイルス活性を低下または消失させるためにこれら合成フェノールポリマーを使用するための組成物及び方法と、ヒトまたは動物のウイルス性疾患を治療または予防するための抗ウイルス組成物と、ヒトまたは動物の細菌性疾患を治療または予防するための抗菌組成物とに関する。

10

【背景技術】

【0002】

土壌抽出物質、特に総称して「腐植」、「腐植質」、「フミン酸」、「フミン酸塩」として知られる物質類は、F.J.Stevensonが*Humus Chemistry.Genesis Composition Reactions*; New York: Wiley,1964で、またもっと最近になってA.Piccoloが*Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*; New York; Elsevier,1996で概説しているとおり、長年にわたり多くの応用例で広く用いられてきた。

【0003】

天然及び合成土壌抽出物は園芸及び関係する産業で、特に土壌強化並びに土壌改良剤としてすでに広く用いられている。さらに、天然及び合成土壌抽出物は有機造園及び修景並びに淡水水槽の添加剤として使用されている。合成土壌抽出物でも天然土壌抽出物でもいくつかの医療上の利点が主張されている。

20

【0004】

R.H.Faustは、1996年10月にデンマークのコペンハーゲンで行われたConference of the International Federation of Organic Agriculture Movementsでの論文の2ページ20行で、農業におけるフミン酸塩の利益について報告している。一般に、腐植物質は作物収量を含む植物の成長を約10～30%促進することができると判明している。

【0005】

土壌抽出物、特にフミン酸は様々な金属をキレート化する。その結果、腐食物質はM.A.Rashidが*Soil Sci*,1971,111,298-306で報告しているとおり、重金属汚染を除去するための土壌改良に用いられてきた。フミン酸はまた、石油製品で汚染された帯水層からの芳香族炭化水素の除去を促進するためにも用いられてきた。

30

H.Xu, S.Lesage, L.Durham, and K.Novakowski, in *Proceedings of the Fourth Annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation*; アルバータ州カルガリー: 1994年9月21～23日; 635～646ページ

S.Lesage, H.Xu, K.S.Novakowski, S.Brown, and L.Durham, in *Proceedings of the Fifth Annual Symposium on Groundwater and Soil Remediation*; オンタリオ州トロント: 1995年10月2～6日。

【0006】

40

フミン酸塩物質は家禽飼料添加剤として用いられてきた。ブロイラー鶏の飼料にフミン酸塩物質を添加すると、収量が平均で5～7%増加し、家禽の安全性も3～5%上昇する:

L. M. Stepchenko, L. V. Zhorina, and L.V.Kravtsova, *Biol Nauki* 1991, 10, 90-95。

【0007】

T.A.Huck, N.Porter, 及びM.E.Bushellは、*J.Gen.Microbiol.* 1991, 137(10), 2321-2329で、土壌単離物が抗生物質産生のための有効な培地添加剤で、微生物増殖促進の程度は種、培地、及び環境によって非常に大きくなりうると報告している。好熱性カンピロバクター属抽出物を単離するための培地として土壌亜炭フミン酸塩の選択したバッチを使用す

50

る報告も、K.Weinrich, K.Winkler, and E.Heberer, DTWDtsch. Tierarztl. Wochenschr. 1990, 97(12), 511-515により出されている。

さらに、B.Grundaは、Zentralbl.Bakteriol.Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 1970, 125(6), 584-593で培養中の土壤微生物数に対するフミン酸の効果について述べている。

【0008】

フミン酸塩はT.D.Lotoshが、Biol.Nauki 1991, 10, 99-103で詳述しているとおり、様々な病気に対する民間療法として長く用いられてきた (F.K.Achard, Crells Chem. Ann. 1786, 11, 391-403)。

【0009】

泥炭から単離したフミン酸は、子宮角と前腹壁腹膜の両方に標準化病変を有する雌ラットで試験したところ、癒着に対する著しい効果を示した:M.Mesroglı, D.H.Maas, B.Mauss, S.Plogmann, W.Ziechmann, and J.Schneider, Zentralbl. Gynakol. 1991, 113(10), 583-590。

【0010】

天然フミン酸のアナフィラキシー感作及び肥満細胞分泌機能に影響を及ぼす能力が、J.Wyczolkowska, T.Michon, Z.Slusarczyk, B.Kolago, and C.Maslinski, Acta Pol. Pharm. 1993, 50(6), 475-480によって明らかにされた。体重1キログラムあたり20及び50ミリグラム用量の腐食物質は、*in vitro*で抗IgEまたはコンカナバリンAで攻撃したマウス腹膜肥満細胞からのヒスタミン放出を低下させた。

【0011】

泥炭及びフミン酸ナトリウムを含む腐食物質は、抗炎症作用を示すことが知られている:M.Kuhnert, V.Fuchs, and S.Golbs, Arch.Exp. Veterinarmed. 1982, 36(2), 169-177; S.B.Ye, J.K.Chen, and Z.X.Zeng, Ssu Chuan I Hsueh Yuan Hsueh Pao 1985, 16(2), 127-129。子宮頸の炎症状態、特に子宮腔部びらん(一般には子宮頸管炎として知られている)を腐植製剤で治療することができる:J.Woyton, M.Gabrys, T.Bielanow, M.Zimmer, J.Sokalski, R.Geneja, and M.Zborowski, Arch.Immunol. Ther.Exp.(Warsz)1993, 41(1), 99-103。

【0012】

腐食物質は抗菌作用を示すことが知られている。天然及び合成腐食物質が抑制作用を有することが明らかにされている種には、カンジダアルビカンズ、エンテロバクタークロアカエ、プロテウス・ブルガリス、緑膿菌、サルモネラ・チフィウム、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、化膿連鎖球菌(R.Ansorg and W.Rochus, Arzneimittelforschung 1978, 28(12), 2195-2198; 大腸菌及び大便連鎖球菌は影響を受けなかった)、及びミュータンス連鎖球菌(sobrinus) (Y.Nakamura, H.Kuwashima, S.Aoki, and T.Masuhara, Shika Ki so Igakkai Zasshi 1989, 31(3), 329-332)が含まれる。概して、50~2000百万分率(ppm)の範囲の濃度が通常は有効であるが、細胞毒性はまだないK.D.Thiel, B.Helbig, R.Klocking, P.Wutzler, M.Sprossig, and H.Schweizer, Pharmazie 1981, 36(1), 50-53。

【0013】

腐食物質は抗ウイルス作用を示すことが長い間知られており(H.Schultz, Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 1962, 69, 613; 1965, 72(13), 294-297; R.Klocking and M.Sprossig, Experientia 1972, 28(5), 607-608)、特にレトロウイルスに有効である (G.Sydow, V.Wunderlich, R.Klocking, and B.Helbig, Pharmazie 1986, 41(12), 865-868)。

土壌抽出物質が有効であることが明らかにされているウイルス性病原体には、特にコクサッキーウイルスA9 (Griggs-Baylor) (R.Klocking and M.Sprossig, Experientia 1972, 28(5), 607-608)、単純疱疹ウイルス1型(B.T.Rouse(Ed.), Herpes Simplex Virus; Berlin:Springer-Verlag, 1992; R.Klocking, K.D.Thiel, P.Wutzler, B.Helbig, and P.Drabke, Pharmazie 1978, 33(8), 539; F.Schiller, R.Klocking, P.Wutzler, and I.Farber, Dermatol. Monatsschr. 1979, 165(7), 505-509; B.Helbig, A.Sauerbrei, R.Klocking, P.Wutzler, N.Wicht, U.Wiedemann, and G.Herrmann, J.Med.Viro1.1987, 23(3), 30

10

20

30

40

50

3-309; R.Klocking and B.Helbig, in *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment*; Berlin: Springer-Verlag, 1991; 407-412;)及び2型(anon. Zentralbl. Bakteriöl. [Orig. A] 1976, 234(2), 159-169; K.D.Thiel, R.Klocking, H.Schweizer, and M.Sprossig, Zentralbl. Bakteriöl. [Orig. A] 1977, 239(3), 304-321; K.D.Thiel, B.Helbig, R.Klocking, P.Wutzler, M.Sprossig, and H.Schweizer, Pharmazie 1981, 36(1), 50-53; K.D.Thiel, B.Helbig, M.Sprossig, R.Klocking, and P.Wutzler, Acta Viroöl. 1983, 27(3), 200-208; K.D.Thiel, P.Wutzler, B.Helbig, R.Klocking, M.Sprossig, and H.Schweizer, Pharmazie 1984, 39(11), 781-782)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)(M.Cushman, P.Wang, S.H.Chang, C.Wild, E.De Clereq, D.Schofs, M.E.Goldman, and J.A.Bowen, J.Med.Chem. 1991, 34(1), 329-337; M.Cushman, S.Kanamathareddy, E.De Clereq, D.Schofs, M.E.Goldman, and J.A.Bowen, J.Med.Chem. 1991, 34(1), 337-342; D.Schofs, P.Wutzler, R.Klocking, B.Helbig, and E.De Clereq, J.Acquir. Immune Defic.Syndr.1991, 4(7), 677-685; S.Loya, R.Tal, A.Hizi, S.Issacs, Y.Kashman, and Y.Loya, J.Nat.Prod.1993, 56(12), 2120-2125; J.Schneider, R.Weis, C.Manner B.Kary, A.Werner, B.J.Seubert, and U.N.Riede, Virology 1996, 218(2), 389-395、インフルエンザウイルスA型(Krasnodar/101/59/H2N2)(R.Mentel, B.Helbig, R.Klocking, L.Dohner, and M.Sprossig, Biomed. Biochim. Acta 1983, 42(10), 1353-1356)、及びB型(J.Hils, A.May, M.Sperber, R.Klocking, B.Helbig, and M.Sprossig, Biomed.Biochim.Acta 1986, 45(9), 1173-1179)、並びに他の気道感染媒介物(A.Jankowski, B.Nienartowicz, B.Polanska, and A.Lewandowicz-Uszynska, Arch.Immunol.Ther.Exp. (Warsz)1993, 41(1), 95-97)が含まれる。

【0014】

腐食物質が多く、ウイルスの細胞変性作用を阻害するメカニズムがいくらか詳しく調べられている。この物質は、ウイルスのエンベロップ蛋白(HIVの場合はgp120SU)上に吸着し、それによりウイルス粒子の細胞表面への吸着を阻止することによってウイルスの複製を妨害すると考えられている:K.D.Thiel, R.Klocking, H.Schweizer, and M.Sprossig, Zentralbl.Bakteriöl. [Orig.A] 1977, 239(3), 304-321; D.Schofs, P.Wutzler, R.Klocking, B.Helbig, and E.De Clereq, J.Acquir. Immune Def. Syndr. 1991, 4(7), 677-685; anon., Fortschr. Med. 1995, 113(7), 10; J.Schneider, R.Weis, C.Manner, B.Kary, A.Werner, B.J.Seubert, and U.N.Riede, Virology 1996, 218(2), 389-395。病原体に結合する化学薬品による病原体の細胞外阻止はよく知られた免疫学的防御法である(D.M.Shankel, S.Kuo, C.Haines, and L.A.Mitscher, in *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*;G.Bronzetti, H.Hayatsu, S.De Flora, M.D.Waters, and D.M.Shankel(Eds.); New York: Plenum, 1993; 65-74)。このような物質は、T.Kada及びK.ShimoiがBioassays,1987,7,113-116で提唱した「脱変異原物質」に関する用語になって、「脱病原体物質despathogens」と呼んでもよいであろう。

【0015】

フミン酸を摂氏120度で15分間熱処理しても、突然変異誘発要因に対するその阻害作用は変わらないことが報告されている:T.Sato, Y.Ose, and H.Nagase, and Mutat, Res. 1986, 162(2), 173-178; T.Sato, Y.Ose, H.Nagase, and K.Hayase, Sci. Total Environ. 1987, 62(4), 305-310)。すなわち、フミン酸はオートクレーブにより滅菌可能である。

【0016】

酵素的に合成したフミン酸と非酵素的に合成したものの直接比較により、疱疹1型及び2型の治療において後者は前者よりも約10倍有効であることが明らかにされた:K.D.Thiel, P.Wutzler, B.Helbig, R.Klocking, M.Sprossig, and H.Schweizer, Pharmazie 1984, 39(11), 781-782。

【0017】

移植したウシ・ヒドロキシアパタイト・カルシウムは骨伝導性が高く、新しく発生しつつある骨組織の沈着に対し「ガイドライン」として宿主組織の役に立つ。しかし、この

物質の耐容性は高いが、非常にゆっくりとしか再吸収されない。

ウシ・ヒドロキシアパタイトに合成フミン酸を含浸させると再吸収プロセスがはつきりと促進される。

【0018】

X線回折解析で調べると、腐植物質の膠原線維への高度の共有結合が水素結合と同様に認められる(架橋結合も確実に認められる):U.N.Riede, I.Jonas, B.Kirn, U.H.Usener, W.Kreutz, and W.Schlickewey, Arch.Orthop.Trauma Surg. 1992, 111(5), 259-264。これにより鍵の強度が75%も増大する。

【0019】

天然及び合成フミン酸は、14日間の試験期間中に1日100~300ミリグラムの用量でヒト顆粒球の食細胞及び殺菌作用を促進することが明らかにされている:U.N.Riede, G.Zeck-Kapp, N.Freudenberg, H.U.Keller, and B.Seubert, Virchows Arch.B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 1991, 60(1), 27-34; M.Kowalska, A.Denys, and J.Bialek, Acta Pol. Pharm. 1993, 50(4-5), 393-395。その他の興味深い点は、1日600ミリグラムの用量では顆粒球の食細胞及び殺菌作用の一過性でわずかな上昇を引き起こすにすぎないという知見である。

【0020】

天然及び合成フミン酸の止血に対する影響が調べられている:H.P.Klocking, Arch. Toxicol. Suppl. 1991, 14, 166-169; W.Buczko, B.Malinowska, M.H.Pietraszek, D.Pawlak, and E.Chabielska, Acta Pol. Pharm. 1993, 50(6), 507-511。フミン酸は体重1キログラムあたり100~300ミリグラムの用量で出血時間、凝固時間、トロンビン時間、プロトロンビン時間、カオリン-ケファリン時間、ユーグロブリン溶解時間、フィブリノゲン濃度、血小板数、またはADP血小板凝集に全く影響がなかった。

【0021】

様々な合成フミン酸はウサギ網状赤血球の精製リボキシゲナーゼ活性を強く阻害するが、ヒツジ胞状腺のプロスタグランジンHシンターゼはわずかに阻害されるだけである:C.Schewe, R.Klocking, B.Helbig, and T.Schewe, Biomed. Biochem. Acta 1991, 50(3), 299-305。最も有効なフミン酸はコーヒー酸、2, 5-ジヒドロキシトルエン、及び3, 4-ジヒドロキシトルエンの誘導体である。

【0022】

天然フミン酸の肝組織再生応答に対する効果が3分の2肝切除を受けたラットで調べられた。結果は事実上2倍と考えられた。まず、フミン酸を1日に体重1キログラムあたり20ミリグラムの用量で短期間適用すると、オルニチン・デカルボキシラーゼ活性を阻害し、同じくスベルミジン生成並びにDNA及びRNAの減少を来し、その結果、肝復旧が全体的に低下することになった。対照的に、フミン酸を長期間適用すると、オルニチン・デカルボキシラーゼの促進、スベルミジン及びヒスタミンとRNA及びDNA量の増加、並びに全体の肝臓量増加を引き起こした。この効果は、少なくとも部分的には、フミン酸によるポリアミン生合成の阻害によるものかもしれない:C.Maslinski, W.A.Fogel, and W.Andrzejewski, Acta Pol. Pharm. 1993, 50(4-5), 413-416。

【0023】

泥炭から抽出したフミン酸並びにフルボ酸は、1ミリリットル中40~360マイクログラムの濃度でラット肝ミトコンドリアの呼吸を促進することが明らかにされている。また、1ミリリットル中40~400マイクログラム濃度の腐食物質はin vitroで、特に1時間以上接触させた後に、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の効率を上昇させた:S.A.Visser, Sci. Total Environ. 1987, 62(4), 347-354。

【0024】

天然、合成、及び市販のフミン酸はすべて、ヒトのプラスミン活性阻害能を有している:F.J.Lu and Y.S.Lee, Sci.Total Environ. 1992, 114(4), 135-139。したがって、1ミリリットル中20マイクログラムの濃度で残存プラスミン活性はそれぞれ70、93、及び40%となった。コーヒー酸及び3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸から作られた合成

フミン酸はまた、ブタ耳の単離血管標本におけるプラスミノーゲン活性化因子の活性を高めることが明らかにされている(H.P.Klocking, R.Klocking, and B.Helbig, *Farmakol. Toksikol.* 1984, 47(1), 93-95)。

【0025】

泥炭由来の天然フミン酸は、 α キモトリプシン及びサプチリシンによるN-アセチル-L-チロシン・エチルエステル及びN-ベンゾイル-L-ロイシン・メチルエステルの加水分解を阻害することが明らかにされている:Sh.Zh.Zhorobekova and K.A.Kydralieva, *Biol. Nauki* 1991, 10, 151-154。

【0026】

G.G.Pukhova, N.A.Druzhina, L.M.Stepchenko, and E.E.Chebotaevが*Radiobiologiya* 1987, 27(5), 650-653で報告しているとおり、フミン酸ナトリウムは致死量の60Co放射線に曝露した雑種ラットの寿命を延ばすことが明らかにされている。

【0027】

天然フミン酸製剤はインターフェロン γ 、インターフェロン α 、及び腫瘍壊死因子 α (A.D.Inglot, J.Zielinka-Jencylik, and E.Piasecki, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 1993, 41(1), 73-80)、並びにインターフェロン β (Z.Blach-Olszewska, E.Zaczynska, E.Broniarek, and A.D.Inglot, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 1993, 41(1), 81-85)を含むサイトカインの生成を促進することが明らかにされている。

【0028】

病態生理学的研究及び超微細構造研究により、天然フミン酸は胸腺活性促進に特有の形態学的変化を引き起こしうることが明らかにされている:J.A.Madej, J.Kuryszek, and T.Garbulinski, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4-5), 397-404。

培養したヒト臍静脈内皮細胞を天然フミン酸または合成フミン酸のいずれかとインキュベートすると、組織因子活性の細胞表面での発現を促進することが明らかにされている。細胞内の2価のカルシウム濃度にも変化がある:H.L.Yang, F.J.Lu, S.L.Wung, and H.C.Chiu, *Thromb. Haemost.* 1994, 71(3), 325-330。

【0029】

ラットに予防的に投与した天然フミン酸は、エタノールによる胃粘膜の損傷量を有意に減らすことができる。フミン酸はまた、実験的に発生させた胃及び十二指腸潰瘍の治療プロセスを有意に加速する:T.Brzozowski, A.Dembinski, and S.Konturek, *Acta Pol. Pharm.* 1994, 51(1), 103-107。

【0030】

M.Kuhnert, V.Fuchs, H.Knauf, and U.Knoll, *Arch.Exp.Veterinarmed.* 1985, 39(3), 344-349、及びM.Kuhnert, V.Fuchs, and S.Golb, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1989, 96(1), 3-10で報告及び議論されているとおり、フミン酸は家畜治療薬としても用いられてきた。例えば、H.Schultz, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1962, 69, 613; 1965, 72(13), 294-297で、ブタ口蹄病の伝染を予防するために泥炭ムルを用いて好結果が得られている。

【0031】

ニワトリにおけるフミン酸ナトリウムの薬物動態が、J.Hampl, I.Herzig, and J.Vlcek, *Vet.Med. (Praha)*, 1994, 39(6), 305-313で集中的に調べられている。遊離またはリボソーム封入フミン酸ナトリウムを鶏に心内、経口、及び皮下投与して、多くの薬物動態パラメーターが調べられた。リボソーム封入フミン酸ナトリウムの血中クリアランスは、投与法に関係なく遊離フミン酸ナトリウムよりも高かった。一方、排出半減期は心内投与後よりも血管外投与後の方が長かった。最高薬物濃度の値から、フミン酸ナトリウムの注入部位から血液循環への浸透は非常に遅いことが示された。フミン酸ナトリウムの生物学的利用能も、投与法及び投与形態によって異なった。心内投与は別にして、遊離フミン酸ナトリウムの皮下投与後に最高のバイオアベイラビリティが認められた。合成フミン酸は1%の水/油エマルジョンから真皮に非常に速く浸透し、次いで角質層に貯留層を形成することが明らかにされている:W.Wohlrab, B.Helbig, R.Klocking, and M.Sprossig, *Pharma*

10

20

30

40

50

zie 1984, 39(8), 562-564。また、外用塗布の約30分後には塗布した全量の1~3%の濃度に達し、この濃度はその後も実質的に変わらなかった。

【0032】

天然フミン酸の毒性は非常に低い (K.D.Thiel, B.Helbig, R.Klocking, P.Wutzler, M.Sprossig, and H.Schweizer, *Pharmazie* 1981, 36(1), 50-53; U.N.Riede, I.Jonas, B.Kirm, U.H.Usener, W.Kreutz, and W.Schlickewey, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 1992, 111(5), 259-264; H.Czyzewska-Szafran, Z.Jastrzebski, D.Soltysiak-Pawluczuk, M.Wutkiewicz, A.Jedrych, and M.Remiszewska, *Acta Pol.Pharm.* 1993, 50(4-5), 373-377; H.L.Yang, F.J.Lu, S.L.Wung, and H.C.Chiu, *Thromb. Haemost.* 1994, 71(3), 325-330)。[フミン酸を含む抗ウイルス物質の細胞毒性は通常、生物学的(生存度及び細胞の形態学的変化)及び生化学的試験法(51Cr放出)により評価される:K.D.Thiel, U.Eichhorn, H.Schweizer, and R.Klocking, *Arch. Toxicol. Suppl.* 1980, 4, 428-430]。ヒト末梢白血球(PBL)に対する天然フミン酸の細胞毒性(CD50)は1ミリリットル中1~9ミリグラムであることが判明した。さらに、J.Schneidrr, R.Weis, C.Manner, B.Kary, A.Werner, B.J.Seubert, and U.N.Riede, *Virology* 1996, 218(2), 389-395で、ヒドロキノンから作った合成フミン酸のMT-2細胞に対する細胞毒性は1ミリリットル中約600ミリグラムであると報告された。天然土壌物質から単離したフミン酸から作った医薬品は、発がん性でもなく(シリアンハムスター胚細胞変換試験:J.Koziorowska and E.Anuszevska, *Acta Pol. Pharm.* 1994, 51(1), 101-102)、突然変異原性もなかった (T.Sato, Y.Ose, and H.Hagase, *Mutat. Res.* 1986, 162(2), 173-178; V.M.Sui, A.I.Kiung, and T.I.Veidebaum, *Vopr. Kurotol. Fiozioter. Lech. Fiz. Kult.* 1986, 2(3-4), 34-37; J.Koziorowska, B.Chlopkiwicz, and E.Anuszevska, *Acta Pol.Pharm.* 1993, 50(4-5), 379-382)。体重1キログラムあたり5~50ミリグラムの1日用量のフミン酸製剤で、出生前 (S.Golbs, V.Fuchs, M.Kuhnert, and C.Polo, *Arch.Exp.Veterinamed.* 1982, 36(2), 179-185) 及び胚芽毒性並びに催奇作用 (T.Juszkiewicz, M.Minta, B.Wlodarczyk, B.Biernacki, and J.Zmudzki, *Acta Pol.Pharm.* 1993, 50(4-5), 383-388) も認められない。水溶液で10%(w/v)という高用量で皮膚に塗布した場合(K.Wiegleb, N.Lange, and M.Kuhnert, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1993, 100(10), 412-416)、局所用製剤はさらに耐容性が高い(V.V.Soldatov and M.N.Cherepanova, *Vopr.Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult.* 1970, 35(3), 256-259; H.Czyzewska-Szafran, Z.Jastrzebski, D.Soltysiak-Pawluczuk, M.Wutkiewicz, A.Jedrych, and M.Remiszewska, *Acta Pol. Pharm.* 1993, 50(4-5), 373-377)。

【0033】

腐蝕質を含む土壌抽出物は、土壌採集源や抽出とその後の処置法によって組成が大きく異なる有機及び無機ポリマー化合物の非常に複雑な混合物である:D.Vaughan and R.E.Malcolm, *Plant Soil Sci.* 1985, 16, 1-443(N.Senesi, Y.Chen, and M.Schnitzer, *Soil Biol. Biochem.* 1977, 9, 397-404も参照のこと)。

【0034】

腐蝕質を含む土壌抽出物の化学的特徴付けに用いる方法には、キャピラリー電気泳動(S.Pompe, K.Heise, and H.Nitsche, *J.Chromatogr. A*, 1996, A723(1), 215-218)、超遠心 (R.S.Cameron, B.K.Thornton, R.S.Swift, and A.M.Posner, *J.Soil Sci.* 1972, 23(4), 394-408; A.E.Wilkinson, J.J.Higgo, and M.N.Jones, *Biochem. Soc. Trans.* 1991, 19(4), 414S)、電子常磁性共鳴及び赤外分光分析 (G.Tollin and C.Steelink, *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 112(2), 377-379)、様々な溶媒及び他の分別法(R.S.Cameron, B.K.Thornton, R.S.Swift, and A.M.Posner, *J.Soil Sci.* 1972, 23(4), 394-408; C.E.Clapp, M.H.Hayes, and R.S.Swift, *Agricultural Research Service Report Number 0000042025*; M.H.Hayers, R.L.Malcom, and C.E., Clapp, *Agricultural Research Service Report Number 0000042035*; I.Csiky, G.Marko-Varga, and J.A.Jonsson, *Anal Chim.Acta* 1985, 178, 307-312; J.A.Amador, P.J.Milne, C.A.Moore, and R.G.Zika, *Mar.Chem.* 1990, 29, 1-17)、ガスクロマトグラフィ (I.Arsenie, H.Boren, and B.Allard, *Sci.Total Envir*

on. 1992, 116(3), 213-220)、ガスクロマトグラフィ質量分析(H.-R.Schulten and M.Sc
hnitzer, Soil, Sci.1992, 153(3), 205-224; G.Chiavari, G.Torsi, D.Fabbri, and G.C
.Galletti,Analyst (London) 1994,119(6),1141-150)、ゲル浸透クロマトグラフィ(B.Kos
inKiewicz, Acta Microbiol.Pol.1977, 26(4), 387-392; S.Mori, M.Hiraide, and A.Miz
uike, Anal.Chim.Acta 1987, 193,231-238)、高性能液体クロマトグラフィ(M.A.Curtis,
A.F.Witt, S.B.Schram, and L.B.Rogers, Anal.Chem.1981, 53, 1195-1199; K.Ravichand
ran, J.J.Lewis, I.-H.Yin, M.Koenigbauer, C.R.Powley, P.Shah, and L.B. Rogers, J.
Chromatogr.1988, 439, 213-226; J.Knuutinen, L.Virkki, P.Mannila, P.Mikkelsen, J.
Paasivirta, and S.Herve, Wat. Res. 1988, 22(8), 985-990, M.Susic and K.G.Boto, J
.Chromatogr. 1989, 482(1), 175-187)、質量分析 (H. -R.Schulten, G.Abbt-Braun, an
d F.H.Frimmel, Environ. Sci. Technol. 1987, 21(4), 349-357; C.Sorge, R.Mueller,
P.Leinweber, and H.R.Schulten, Fresenius'J. Anal.Chem. 1993, 346(6-9), 697-703;
M.Remmler, A.Gerogi, and F. -D.Kopinke, Eur.Mass Spectrom. 1995, 1(4), 403-407)
、核磁気共鳴 (F.J.Vila, H.Lentz, and H.D.Ludemann, Biochem.Biophys.Res.Commun.19
76, 72(3), 1063-1070; G.Almendros, R.Frund, F.J.Gonzalez-Vila, K.M.Haider, H.Kni
cker, and H.D.Ludemann, FEBS Lett.1991, 282(1), 119-121)、及びポリアクリルアミ
ド・ゲル電気泳動 (R.Klocking, J.Chromatogr. 1973, 78, 409-416; L.P.Giazkova, V.S
.Ulashchik, and F. A.Puntus, Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Flz. Kult. 1984, 2(
2), 21-24) が含まれていた。

【0035】

L.B.Sonnenberg, Ph.D.Thesis, University of North Carolina at Chapel Hill, 1989;
Dissertation Services Order No. 9007318で概説されている還元的変性により、フミン
酸を含む土壌抽出物の構造的特徴付けに関する非常に多くの研究が実施されている。膜の
物理化学的性質に基づく腐植質の構造モデルも、R.L Wershaw, Environ. Health Perspec
t. 1989,83(11), 191-203によって展開されている。

【0036】

R.R.Engebretson and R.von Wandruszka, Environ.Sci.Technol.1994, 28, 1934では、
溶解したフミン酸の微小構成を、その二次構造に関して、すなわちこれらの大きな分子が
溶液中で三次元に配列する途中で、特徴付けるための取り組みについて述べられている。
この分子は樹枝状、すなわち、いくぶん荷馬車の車輪スポークに似て中心核から広がり、
多くのカルボキシ及びヒドロキシ末端基を含む分岐の多いフラクタル様構造であると考え
られている:T.H.Mourey, S.R.Turner, M.Rubinstein, J.M.J.Frechet, C.J.Hawker, and
K.L.Woolley, Macromolecules 1992, 25, 2401-2406。フミン酸のクラスター凝集の平均
直径は700~1700オングストロームで、大きなクラスターは2.3のフラクタル次
元を有する:R.Osterberg and K.Mortensen, Radiat. Environ. Biophys. 1994, 33(3), 2
69-276。

【0037】

K.Murray and P.W.Lindor, J.Soil Sci.1983,34,511-523が指摘しているとおり、腐蝕物
質は化学的に明確でないため、物理化学的性質が天然物質によく似た合成フミン酸の調整
は非常に困難である。それにも関わらず、この分野でいくつかの注目に値する進歩があっ
た。おおざっぱに言えば、3つの一般的戦略が出てきた。いずれも分子量がヒドロキシ安
息香酸程度の明確な分子から出発し、次いでこの分子どうしを重合させてより大きな分子
を生成するという方法による。方法の差は原因因子で、微生物的、化学的、または酵素的
に引き起こすことができる。

【0038】

微生物由来のフミン酸が、M.Robert-Gero, C.Hardisson, L.Le Borgne, and G.Pignaud
, Ann. Inst. Pasteur (Paris) 1966, 111(6), 750-767とM.Robert-Gero, C.Hardisson,
L.Le Borgne, and G.Vidal, Ann. Inst. Pasteur (Paris) 1967, 113(6), 903-909により
報告及び議論されている。

【0039】

フミン酸の化学合成は、R.Klocking, B.Helbig他が最初に実施した: R.Klocking, B.Helbig, and P.Drabke, *Pharmazie* 1977, 32, 297; R.Klocking, B.Helbig, K.D.Thiel, T.Blumohr, P.Wutzler, M.Sprossig, and F.Schiller, *Pharmazie* 1979, 34(5-6), 293-294; R.Mentel, B.Helbig, R.Klocking, L.Dohner and M.Sprossig, *Biomed. Biochem. Acta* 1983, 42(10), 1353-1356; H.P.Klocking, R.Klocking, and B.Helbig, *Farmakol. Toksikol.* 1984, 47(1), 93-95; K.D.Thiel, P.Wutzler, B.Helbig, R.Klocking, M.Sprossig, and H.Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781-782; J.Hils, A.May, M.Sperber, R.Klocking, B.Helbig, and M.Sprossig, *Biomed.Biochim. Acta* 1986, 45(9), 1173-1179; B.Helbig, A.Sauerbrei, R.Klocking, P.Wutzler, N.Wicht, U.Wiedemann, and G.Herrmann, *J.Med.Virol.* 1987, 23(3), 303-309; K.I.Hanninen, R.Klocking, and B.Helbig, *Sci. Total Environ.* 1987, 62, 201-210; R.Klocking and B.Helbig, in *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment*; New York: Springer-Verlag, 1989; 407-412; C.Schewe, R.Klocking, B.Helbig, and T.Schewe, *Biomed.Biochim. Acta* 1991, 50(3), 299-305; D.Schofs, P.Wutzler, R.Klocking, B.Helbig, and E.De Clercq, *J.Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1991, 4(7), 677-685。通常、出発物質である小さい分子のフェノール化合物 10 ミリモルを蒸留水に溶解し、水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液で pH を 8.5 に調整し、次いで、2~5 ミリモルの過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO₄) を加える。溶液を 50℃ で 30 分間加温し、次いで終夜放置する。得られたフミン酸様重合生成物を硝酸鉛 (II) [Pb(NO₃)₂] により沈殿させて単離する。沈殿したポリマーを水酸化ナトリウム水溶液に再溶解し (pH 8.5)、8-ヒドロキシキノリンと共に 100℃ で 30 分間加熱する。生成した沈殿は鉛 (II) キレートで、ろ過により除去する。残存する 8-ヒドロキシキノリンをクロロホルムで抽出し、次いで酢酸、酢酸エチル、及びエタノールの様々な組み合わせを加えることにより水溶液から所望のポリマー物質を沈殿させる。腐蝕様物質の合成に用いられてきた出発化合物には、4-[ビス (p-ヒドロキシフェニル) メチレン] -2, 5-シクロヘキサジエン-1-オン (アウリン)、4-[ビス (3-カルボキシ-4-ヒドロキシフェニル) メチレン] -2-カルボキシ-2, 5-シクロヘキサジエン-1-オン (アウリントリカルボン酸)、3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル) プロペノン酸 (コーヒー酸)、1, 2-ジヒドロキシベンゼン (カテコール)、1, 3, 4, 5-テトラヒドロキシシクロヘキササンカルボン酸 3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル) プロペノエート (クロロゲン酸)、3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (ホモプロトカテチュ酸)、1-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-2-(N-メチルアミノ) エタノール (エピネフリン)、3-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-プロペノン酸 (フェルラ酸)、3, 4-5-トリヒドロキシ安息香酸 (没食子酸)、2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (ゲンチジン酸)、2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸 (ホモゲンチジン酸)、3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル) プロピオン酸 (ヒドロコーヒー酸)、1, 4-ジヒドロキシベンゼン (ヒドロキノン)、2, 3-ジヒドロキシトルエン (3-メチルカテコール)、3, 4-ジヒドロキシトルエン (4-メチルカテコール)、2, 5-ジヒドロキシトルエン (2-メチルヒドロキノン)、4, 4'-(2, 3-ジメチルテトラメチレン)-ジ- (1, 2-ジヒドロキシベンゼン) (ノルジヒドログアヤレット酸)、1-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-2-アミノエタノール (ノルエピネフリン)、3, 4-ジヒドロキシ安息香酸 (プロトカテチュ酸)、1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼン (ピロガロール)、1, 3-ジヒドロキシベンゼン (レゾルシノール)、及び 4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸 (バニリン酸) が含まれる。腐蝕様物質の化学合成に対する他の注目値する取り組みには、アウリントリカルボン酸、その誘導体、及び関係する化合物に関する De Clercq 他 の研究が含まれる: M.Cushman, P.Wang, S.H.Chang, C.Wild, E.De Clercq, D.Schofs, M.E.Goldman, and J.A.Bowen, *J.Med.Chem.* 1991, 34(1), 329-337; M.Cushman, S.Kanamathareddy, E.De Clercq, D.Schofs, M.E.Goldman, and J.A.Bowen, *J.Med.Chem.* 1991, 34(1), 337-342。関係する取り組みが、M.Robert-Gero, C.Hardisson, L.Le Borgne, and G.Vidal, *Ann.Inst. Pasteur (Paris)* 1967, 113(6), 903-909; M.Jakubiec, E.Miszczak, and J.Szczerkowska, *Acta Microbiol. Pol.* [B] 1971, 3(1), 63-66; R

10

20

30

40

50

.Ansorg and W.Rochus, *Arzeimittelforschung* 1978, 28(12), 2195-2198; J.Pommery, M.Imbenotte, A.F.Urien, D.Marzin, and F.Erb, *Mutat. Res.* 1989, 223(2), 183-189; F.J.Lu and Y.S.Lee, *Sci.Total Environ.* 1992, 114, 135-139; K.Wiegleb, N.Lange, and M.Kuhnert, *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1993, 100(10), 412-416; H.L.Yang, F.J.Lu, S.L.Wung, and H.C.Chui, *Thromb.Haemost.* 1994, 71(3), 325-330; W.Seffner, F.Schiller, R.Heinze, and Breng, *Exp.Toxicol.Pathol.* 1995, 47(1), 63-67; and J.Schneider, R.Weis, C.Manner, B.Kary, A.Werner, B.J.Seubert, and U.N.Riede, *Virology* 1996, 218(2), 389-395からも報告されている。

【0040】

フミン酸の酵素触媒合成は1961年頃のR.E.Hampton and R.W.Fulton, *Virology* 1961, 13, 44-52 (R.E.Hampton, *Phytopathology* 1970, 60, 1677-1681も参照のこと)による研究にさかのぼり、彼らは酵素的に酸化したフェノールが植物病原体(すなわち、植物に関係する)ウイルスを不活化することを見いだした。通常、腐植様物質の酵素的合成にはo-ジフェノール・オキシダーゼが用いられてきた:匿名Zentralbl. Bakteriöl. [Org.A] 1976, 234(2), 159-169; R.Klocking, B.Helbig, and P.Drabke, *Pharmazie* 1977, 32(5), 297; K.D.Thiel, B.Helbig, R.Klocking, P.Wultzler, M.Sprossig, and H.Schweizer, *Pharmazie* 1981, 36(1), 50-53; K.D.Thiel, B.Helbig, M.Sprossig, R.Klocking, and P.Wultzler, *Acta Virol.* 1983, 27(3), 200-208; K.D.Thiel, P.Wultzler, B.Helbig, R.Klocking, M.Sprossig, and H.Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781-782; and G.Sydow, V.Wunderlich, R.Klocking, and B.Helbig, *Pharmazie* 1986, 41(12), 865-868。

【0041】

酵素的及び非酵素的に合成したフミン酸とコーヒー酸及びヒドロコーヒー酸との直接の比較により、この2つの合成経路では(ヒト)疱疹1型及び2型ウイルスの抑制に対する効力にいくぶん差がある物質を生成することが明らかにされている:K.D.Thiel, P.Wultzler, B.Helbig, R.Klocking, M.Sprossig, and H.Schweizer, *Pharmazie* 1984, 39(11), 781-782。

【0042】

Wagnerに発行されたドイツ特許第DE 3 830 333 C1号(1990年3月15日)は、疱疹ウイルスによる水痘疹の局所治療用に一部フミン酸からなる医薬品組成物を開示している。用いたフミン酸の調整法については開示されていない。

【0043】

Cronje他に発行された米国特許第4,999,202号(1991年3月12日)は、殺菌または静菌作用を有し、適当な担体中に酸化炭由来のフミン酸またはその塩もしくは誘導体を活性成分として含む組成物を開示している。活性成分は石炭由来フミン酸のアルカリ金属塩であることが好ましく、担体は水であることが好ましい。調整法には、塩酸などの酸によりpH2まで酸性化した後、沈殿によりフミン酸を回収する方法が含まれる。

【0044】

Riede他からの欧州特許出願第0537430A1号(1993年4月21日)は、天然または合成の、修飾または未修飾フミン酸アンモニウムまたはフミン酸アルカリ金属塩のウイルス、特にHIVなどのレトロウイルスに対する利用を開示している。Riede他は、毒性が低く突然変異誘発要因でも催奇形因子でもないフミン酸塩を開示している。Riede他はまた、出発物質の酸化完了に10~15日も必要で、その期間中反応温度を40℃未満に維持する、前述のフミン酸塩の特別な合成的調整法を開示している。合成後、溶液をpH4~5に酸性化し、その後、分離用クロマトグラフィ、限外ろ過、遠心分離、または電気透析などの公知の精製法を用いる。酸化剤または出発物質以外の無機塩は合成中または合成後に用いない。

【0045】

Zanettiからの国際特許出願第95/08335(1995年3月30日発行)は米国特許出願第08/310,675号(1994年9月22日提出)と同じで、ヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の白血球、末梢血単核細胞、及びリンパ球を天然フミン酸市販

製剤の抗免疫不全ウイルス活性を示す量と接触させることを含む、ヒト免疫不全ウイルス阻害法を開示している。合成フミン酸製剤も開示されている。開示された合成法は、出発物質の酸化のために過ヨウ素酸ナトリウムを用いる以外は無機塩を全く用いない。

開示された合成法は、合成生成物の6M HClによるpH1未満への酸性化を用いる。

この溶液を終夜放置する。合成生成物の沈殿が生じ、これを1M HClで数回洗浄する。

最終段階は沈殿の凍結乾燥を含む。

【0046】

フミン酸などのフェノールポリマーは、前述の条件及びCronje '202の条件で塩酸に曝露すると、塩素化される可能性がある。すなわち、1つまたは複数の塩素原子がフェノールポリマーの芳香環に付加するかもしれない：R.B.Wagner and H.D.Zook, *Synthetic Organic Chemistry*, New York: J. Wiley & Sons, March 1963, 88-147。塩酸存在下ではフミン酸生成物の選択的O-脱メチル化などの他の変化も起こるかもしれない：M.Fieser and L.F.Fieser, *Reagents For Organic Synthesis*, New York, Wiley-Interscience, Vol.4, 1974, 250。フミン酸の水溶液中での塩素化はエィムス/サルモネラ・平板試験で直接作用突然変異誘発性のある化合物を生成することになるとの報告がある。塩素化されていないフミン酸に突然変異誘発性はない：J.R.Meier, R.D.Lingg, R.J.Bull, *Mutat.Res.*, 1983, 118(1-2), 25-41。また、凍結乾燥した塩素化フミン酸が不揮発性の直接作用突然変異誘発性及び/またはアルキル化剤を含むという報告もある：S.C.Agarwal, J.Neton, *Sci.Total Environ.*, 1989, 79(1), 69-83。90日間の亜慢性毒性試験が塩素化フミン酸及び塩素化されていないフミン酸で雄のSprague-Dawleyラットを用いて実施されている。1.0g/lの塩素化フミン酸群で血尿の頻度及び重症度上昇が認められた：L.W.Condie, R.D.Laurie, J.P.Bercz, *J.Toxicol.Environ.Health*, 1985, 15(2), 305-14。したがって、塩素化フミン酸を生成する可能性のあるフミン酸製造のための合成法は避けるべきである。

【0047】

本発明に関連したその他の関係技術分野は、ウイルス及び微生物活性を低下させる血液製剤組成物及び血液製剤処理法からなる。血小板を含む様々なヒト血液製剤があり、重大な医療上の必要性に依っている。ウイルスに関する安全性はドナーの選択とスクリーニングにかかっている。今日までに、血液製剤を十分にスクリーニングし、ウイルス混入がないという完全な保証を提供することが重要であると判明している。これらの血液製剤は、HIV-ヒト免疫不全ウイルス、A型、B型及びC型を含む肝炎ウイルス、その他のウイルスが不注意により混入する可能性がある。血小板を含む血液製剤を処理するために溶媒/界面活性剤(S/D)法があるが、この方法は主に脂質エンベロープを有するウイルスに限られ、A型肝炎ウイルス、パルボウイルスB19及びピコルナウイルスなどのエンベロープを持たないウイルスには無効であることが知られている：P.M.Mannucci, et al., *Ann Intern.Med.*, 1994, 120(1), 1-7; and L.Gurtler, *Infusionsther. Transfusions med.*, 1994, 21(Suppl 1), 77-90さらに、S/D法ではダイズ油またはヒマシ油による抽出及び不溶化C18樹脂でのクロマトグラフィを用いて血液製剤から界面活性剤を分離する必要がある：B.Horowitz et al., *Blood*, 1992, 79(3), 826-31; and Y.Piquet et al., *Vox Sang.* 1992, 63(4), 251-6。

【0048】

血液製剤を処理するためのパスツリゼーション法が開発されている。このプロセスには安定化タンパク水溶液の60℃、10時間の熱処理が含まれる。しかし、安定化製剤を10時間熱処理した後でも、残存する感染性A型肝炎ウイルスが認められている：J.Hilfenhaus and T.Nowak, *Vox Sang.*, 1994, 67(suppl 1), 62-6。溶媒/界面活性剤(S/D)法でもパスツリゼーション法でも単独では熱及び有機溶媒に強い抵抗力のあるウイルスを不活化するのに十分ではない。このような状況では、ヒト・パルボウイルスB19及びA型肝炎ウイルスが特に問題である：H.Schwinn et al., *Arzneimittelforschung*, 1994, 44(2), 188-91。

【0049】

製造プロセス中すでに溶媒／界面活性剤（S／D）法で処理した血漿由来第V I I I 因子（F V I I I）濃縮物の安全性を高めるために、追加のウイルス不活化段階として最終的な高熱処理（100℃で30分間）が開発された。高熱処理の有効性が2つの非脂質エンベロップを持つウイルス（A型肝炎ウイルスとポリオウイルス1）の不活化において示された。しかし、高熱処理中のF V I I I 凝血促進活性の減損は、凝固及び色素産生分析の両方で推定して約15%であった：S.Arrighi et al., *Thromb.Haemost.*, 1995, 74(3), 863-73。

【0050】

ウイルスの不活化及びタンパクとのその適合性増強のために、反応性酸素種のクエンチャーによる短波長紫外線（UVC）照射を用いたヒト血液製剤処理法が開発されている。しかし、血液タンパクの回収率は通常、わずか75%程度であった：S.Chin et al., *Blood*, 1995, 86(11), 4331-6。紫外線照射法はさらに、細胞血液製剤に適用できないと報告されている：C.M.Allen, *Photochem. Photobiol.*, 1995, 62(1), 184-9。

【特許文献1】ドイツ特許第3830333C1号

【特許文献2】米国特許第4,999,202号

【特許文献3】欧州特許出願第0537430A1号

【特許文献4】国際特許出願第95/08335号

【特許文献5】米国特許出願第08/310,675号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0051】

以上のことをまとめてみると、血液製剤または血液製剤活性を損失することなく脂質エンベロップを持つウイルス及びエンベロップを持たないウイルスの活性を低下または消失させるための、すべてのヒト血液製剤に対する安全、有効、かつ単純な処理法の必要性が残されている。

【課題を解決するための手段】

【0052】

天然の土壌から抽出または他の方法で得た腐蝕質の物理化学的性質の多様性並びに生物活性及び毒性の大きなばらつきが詳細に報告されている。この多様性とばらつきは、土壌の採集源、抽出及び／または単離法、並びに原料土壌から抽出物をいったん分離及び単離した後これを扱うために用いた方法などの要因のばらつきが原因である。天然の土壌から抽出した物質の性質は再現不可能であるため、このような物質の市場価値は非常に小さくなっている。加えて、医薬品として不適当となる。また、腐食物質または同様の物質の単離、合成、及び／または調整の様々な局面に対する多くの実験室規模のプロセスはすでに報告されているが、工業用レベルにまで直接スケールアップするのに適し、経済的に許容できる収率を提供し、かつ医薬品の安全性と有効性の見地から調整法を最適化する方法による、このような純粋な合成フミン酸または同様の物質の調整及び単離の報告はない。公知の合成法はすべて、毒性が生じる可能性のある沈殿法（硝酸鉛（II）沈殿）とその後の複雑な単離法、突然変異誘発要因となる可能性がある化合物を生成する塩酸沈殿、または10日間もかかる長い合成段階を用いている。解決法は、物理化学的性状が再現可能で、少なくとも典型的な市販土壌抽出物の性状を模した、安価で安全な物質を産する単純な合成法を考案することである。本発明は、この解決法並びに本発明の方法により調整した合成物質を用いた組成物及び方法を企図するものである。

【0053】

本発明の第1の態様は、物理化学的性質及び性状が再現可能で、典型的な市販天然フミン酸及び他の土壌抽出物の物理化学的性質及び性状を模した合成フェノール・ポリマー物質を調製する方法である。この方法には、

a)表1及び表2に挙げた化合物からなるグループから選択した1種又は複数の出発有機化合物を、蒸留水又は水酸化ナトリウムを含む水溶液に溶解する段階と、

b)必要があれば、段階a)から得た水溶液のpHを8~11の間に調整する段階と、

c)段階b)から得た水溶液にアルカリ金属又はアルカリ土類金属の過ヨウ素酸塩を加える段階と、

d)段階c)から得た溶液の温度を30分~100時間、35~80℃に保つ段階と、

e)ホウ酸、ホウ酸塩、アルカリ土類金属塩、遷移金属塩、アルカリ金属硫化物、アルカリ土類金属硫化物、又は遷移金属硫化物からなるグループから選択した1種又は複数の化合物を、段階d)から得た水溶液に加える段階と、

f)段階e)から得た水溶液を室温で2~48時間攪拌しながら、又は攪拌せずに放置する段階と、

g)段階f)から得た溶液から約500~10,000ダルトン以下の分子を除去する段階と、

h)段階g)から得た溶液を濃縮する段階と、

i)必要があれば、段階h)から得た溶液から水を除去する段階

とを含む。

本発明の第2の態様は、水酸化アンモニウム水溶液又は他のアルカリ性酸化物又は水酸化物水溶液、アルカリ土類酸化物又は水酸化物水溶液、遷移金属酸化物又は水酸化物水溶液、塩酸又は他の無機酸のいずれかを加えることにより、段階a)で得られた水溶液のpHを8~11に調整する、第1の態様に記載の方法。

本発明の第3の態様は、段階b)で得られた溶液にアルカリ硫化物又はアルカリ土類硫化物を加える、第1の態様に記載の方法。

本発明の第4の態様は、段階b)で得られた溶液に遷移金属硫化物を加える、第1の態様に記載の方法。

本発明の第5の態様は、段階c)で得られた溶液にアルカリ硫化物又はアルカリ土類硫化物を加える、第1の態様に記載の方法。

本発明の第6の態様は、段階c)で得られた溶液に遷移金属硫化物を加える、第1の態様に記載の方法。

本発明の第7の態様は、段階f)で得られた溶液に生じたいかなる沈殿物も遠心分離によって除去する、第1の態様に記載の方法。

本発明の第8の態様は、分子量カットオフ500~10,000ダルトンのサンドイッチ型の膜からなるフロースルー透析器を用いて、貯留液の導電率が200 μ S以下になるまで、段階f)で得られた溶液を透析することによって段階g)が実行される、第1の態様に記載の方法。

本発明の第9の態様は、透析器貯留液の容量が減るように貯留液を産生するフロースルー透析器を用いて、段階g)で得られた溶液を段階h)で濃縮する、第8の態様に記載の方法。

本発明の第10の態様は、孔の大きさが、0.2~0.4 μ mのフィルターを用いて、段階g)で得られた溶液をろ過して滅菌溶液を得る、請求項1に記載の方法。

本発明の第11の態様は、段階g)で得られた溶液を100~150℃のオートクレーブに5~60分間入れ、滅菌溶液を得る、第1の態様に記載の方法。

本発明の第12の態様は、孔の大きさが0.2~0.4 μ mのフィルターを用いて、段階h)で得られた溶液をろ過して滅菌溶液を得る、第1の態様に記載の方法。

本発明の第13の態様は、段階h)で得られた溶液を100~150℃のオートクレーブに5~60分間入れ、滅菌溶液を得る、第1の態様に記載の方法。

本発明の第14の態様は、段階h)で得られた溶液から水を段階i)で除去する前に、マンノースなどの静電気抑制材料を前記溶液に加える、第1の態様に記載の方法。

本発明の第15の態様は、スプレードライ又は温度誘発性蒸発又は真空又は凍結乾燥によって段階i)を達成する、第1の態様に記載の方法。

本発明の第16の態様は、段階i)で得られた乾燥粉末を100~150℃のオートクレーブに5~60分間入れ、滅菌粉末を得る、第1の態様に記載の方法。

本発明の第17の態様は、段階f)で得られた溶液から分子を除去するのに、筒型、毛細管型、らせん型又は平面型の透析膜を段階g)で使用する、第1位の態様に記載の方法。

本発明の第18の態様は、孔の大きさが $0.2\sim 0.4\mu$ のフィルターを用いて、段階g)で得られた溶液をろ過して滅菌溶液を得る第17の態様に記載の方法。

本発明の第19の態様は、段階g)で得られた溶液を $100\sim 150^{\circ}\text{C}$ のオートクレーブに5～60分間入れ、滅菌溶液を得る、第17の態様に記載の方法。

本発明の第20の態様は、透析器貯留液の容量が減るように貯留液を産生するフロースルー透析器を用いて、段階g)で得られた溶液を段階h)で濃縮する、第17の態様に記載の方法。

本発明の第21の態様は、分子量カットオフ $30,000\sim 100,000$ ダルトンのサンドイッチ型の膜からなるフロースルー透析器を用いて、段階g)で得られた溶液をさらに透析し、分子量の下限が $500\sim 10,000$ ダルトンで上限が $30,000\sim 100,000$ ダルトンの合成フェノールポリマー成分を含有するろ過水溶液を得る、第1の態様に記載の方法。

10

本発明の第22の態様は、前記透析に筒型、毛細管型、らせん型又は平面型の透析膜を使用する、第21の態様に記載の方法。

本発明の第23の態様は、孔の大きさが、 $0.2\sim 0.4\mu$ のフィルターを用いて、段階g)で得られた溶液をろ過して滅菌溶液を得る、第22の態様に記載の方法。

本発明の第24の態様は、段階g)で得られた溶液を $100\sim 150^{\circ}\text{C}$ のオートクレーブに5～60分間入れ、滅菌溶液を得る、第22の態様に記載の方法。

本発明の第25の態様は、透析器貯留液の容量が減るように貯留液を産生するフロースルー透析器を用いて、段階g)で得られた容器を段階h)で濃縮する、第22の態様に記載の方法。

20

本発明の第26の態様は、第1の態様に記載の方法に従って製造した抗ウイルス量の合成フェノールポリマー成分を血液製剤と組み合わせた血液製剤混合物。

本発明の第27の態様は、前記血液製剤がヒト全血である、第26の態様に記載の混合物。

本発明の第28の態様は、前記血液製剤がヒト血小板である、第26の態様に記載の混合物。

本発明の第29の態様は、抗ウイルス量が、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 活性を低下させるのに十分な量である第28の態様に記載の混合物。

本発明の第30の態様は、抗ウイルス量が、エンベロープを持たないウイルスの活性を低下させるのに十分な量である、第28の態様に記載の混合物。

30

本発明の第31の態様は、エンベロープを持たないウイルスがバルボウイルスである、第30の態様に記載の混合物。

本発明の第32の態様は、エンベロープを持たないウイルスがサイトメガロウイルスである、第30の態様に記載の混合物。

本発明の第33の態様は、前記血液製剤がヒト血漿である、第26の態様に記載の混合物。

本発明の第34の態様は、前記血液製剤がヒト血液タンパクである、第26の態様に記載の混合物。

本発明の第35の態様は、前記ヒト血液タンパクがヒト血清アルブミン又はヒト血清ガンマグロブリンである、第34の態様に記載の混合物。

40

本発明の第36の態様は、前記血液製剤がヒト血友病因子である、第26の態様に記載の混合物。

本発明の第37の態様は、ヒト血友病因子が第VIII因子である、第36の態様に記載の混合物。

本発明の第38の態様は、ヒト血友病因子が第IX因子である、第36の態様に記載の混合物。

本発明の第39の態様は、抗ウイルス量が、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 活性を低下させるのに十分な量である、第36の態様に記載の混合物。

本発明の第40の態様は、抗ウイルス量が、エンベロープを持たないウイルスの活性を低下させるのに十分な量である、第36の態様に記載の混合物。

50

本発明の第41の態様は、エンベロープを持たないウイルスがパルボウイルスである、第40の態様に記載の混合物。

本発明の第42の態様は、エンベロープを持たないウイルスがサイトメガロウイルスである、第40の態様に記載の混合物。

本発明の第43の態様は、請求項1に記載の方法に従って製造した抗ウイルス量の合成フェノールポリマー成分を血液製剤と接触させることによって、前記血液製剤中のウイルスの量を減少させる方法。

本発明の第44の態様は、一方に滅菌した前記血液製剤、もう一方に抗ウイルス量の滅菌した前記合成フェノールポリマー成分が入っている2つの部分をつなぐ連絡路の封印を滅菌的に取ることによって前記接触を実現する、第43の態様に記載の方法。

10

本発明の第45の態様は、前記抗ウイルス量を含有する滅菌溶液を前記血液製剤に注入することによって前記接触を実現する、第43の態様に記載の方法。

本発明の第46の態様は、前記ウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、第43の態様に記載の方法。

本発明の第47の態様は、前記ウイルスがA型肝炎ウイルスである、第43の態様に記載の方法。

本発明の第48の態様は、前記ウイルスがB型肝炎ウイルスである、第43の態様に記載の方法。

本発明の第49の態様は、前記ウイルスがC型肝炎ウイルスである、第43の態様に記載の方法。

20

本発明の第50の態様は、前記ウイルスがパルボウイルスである、第43の態様に記載の方法。

本発明の第51の態様は、前記ウイルスがサイトメガロウイルスである、第43の態様に記載の方法。

本発明の第52の態様は、ウイルス活性を低下させる血液処理法を1つ又は複数追加する、第32の態様に記載の方法。

本発明の第53の態様は、追加する血液処理法が溶媒・洗浄剤(SD)法である、第52の態様に記載の方法。

本発明の第54の態様は、第1の態様に記載の方法に従って製造される抗ウイルス量の合成フェノールポリマー成分及び少なくとも1種類の生理学的に認められる担体又は賦形剤からなる、ヒト又は動物のウイルス性疾患の治療用又は予防用製剤。

30

本発明の第55の態様は、ウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第56の態様は、ウイルスが単純ヘルペスウイルスI型又はII型である、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第57の態様は、ウイルスがピコルナウイルスである、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第58の態様は、生理学的に認められる賦形剤が注射可能な溶液用賦形剤である、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第59の態様は、生理学的に認められる賦形剤が外用剤用賦形剤である、第54の態様に記載の製剤。

40

本発明の第60の態様は、生理学的に認められる賦形剤が経口摂取可能な賦形剤である、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第61の態様は、生理学的に認められる賦形剤が鼻内スプレー用賦形剤である、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第62の態様は、生理学的に認められる賦形剤が計量吸入剤用賦形剤である、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第63の態様は、生理学的に認められる賦形剤が錠剤用又は座剤用賦形剤である、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第64の態様は、生理学的に認められる賦形剤が医療用具の消毒又は保存に適

50

している、第54の態様に記載の製剤。

本発明の第65の態様は、請求項1に記載の方法に従って製造される抗菌量の合成フェノールポリマー成分及び少なくとも1種類の生理学的に認められる賦形剤からなる、ヒト又は動物の微生物誘発性疾患の治療用又は予防用製剤。

本発明の第66の態様は、生理学的に認められる賦形剤が注射可能な溶液用賦形剤である、第65の態様に記載の製剤。

本発明の第67の態様は、生理学的に認められる賦形剤が外用剤用賦形剤である、第65の態様に記載の製剤。

本発明の第68の態様は、生理学的に認められる賦形剤が経口摂取可能な賦形剤である、第65の態様に記載の製剤。

本発明の第69の態様は、生理学的に認められる賦形剤が鼻内スプレー用賦形剤である、第65の態様に記載の製剤。

本発明の第70の態様は、生理学的に認められる賦形剤が計量吸入剤用賦形剤である、第65の態様に記載の製剤。

本発明の第71の態様は、生理学的に認められる賦形剤が腔錠用又は座剤用賦形剤である、第65の態様に記載の製剤。

本発明の第72の態様は、生理学的に認められる賦形剤が医療用具の消毒又は保存に適している、第65の態様に記載の製剤。

本発明の第73の態様は、医療用具がコンタクトレンズである、第72の態様に記載の製剤。

本発明の第74の態様は、出発物質が、最低1個の水酸基及び最低1個のカルボキシル基を持つ、表1及び表2に示した化合物から選択した1種類又は複数の化合物である、第1の態様に記載の方法。

本発明の第75の態様は、出発物質が2,5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）である、請求項1の態様に記載の方法。

本発明の第76の態様は、全ステップを通じてpH7以上に保つ、第1の態様に記載の方法。

【0054】

プロセスのひとつの実施形態において、段階a)から得た水溶液のpHを、水酸化アンモニウム水溶液、または他のアルカリ金属酸化物もしくは水酸化物水溶液、またはアルカリ土類金属酸化物もしくは水酸化物水溶液、または遷移金属酸化物もしくは水酸化物水溶液、または塩酸もしくは他の無機酸を加えることにより調整する。

プロセスの別の実施形態において、段階b)から得た溶液に硫化アルカリ金属またはアルカリ土類金属を加える。または、段階c)から得た溶液に硫化アルカリ金属またはアルカリ土類金属を加える。

プロセスの別の実施形態において、段階b)から得た溶液に硫化遷移金属を加える。または、段階c)から得た溶液に硫化遷移金属を加える。

プロセスの別の実施形態において、段階f)から得た溶液から沈殿が生じれば、どのような沈殿も遠心分離で除去する。

プロセスの別の実施形態において、分子量カットオフ値500～10,000ダルトンのサンドイッチ型膜からなる流通器具を用い、段階f)から得た溶液を滞留溶液の伝導率が200マイクロジーメンス以下に下がるまで透析することにより、段階g)を実施する。段階g)の透析に続くプロセスの別の実施形態において、透析器具滞留溶液の量を下げられるような滞留溶液を生じる流通透析器具を用いることにより、段階g)から得た溶液を段階h)で濃縮する。プロセスの別の実施形態において、段階g)から得た溶液をポアサイズが0.2から0.4ミクロンのフィルターを通過させ、滅菌溶液を得る。プロセスの別の実施形態において、段階g)から得た溶液を100から150℃で5から60分間オートクレープし、滅菌溶液を得る。プロセスの別の実施形態において、段階h)から得た溶液をポアサイズが0.2から0.4ミクロンのフィルターを通過させ、滅菌溶液を得る。

プロセスの別の実施形態において、段階 h) から得た溶液を 100 から 150℃ で 5 から 60 分間オートクレープし、滅菌溶液を得る。

プロセスの別の実施形態において、段階 i) で溶液から水を除去する前に、段階 h) から得た溶液にマンノースまたは他の静電気減少物質を加える。

プロセスの別の実施形態において、段階 i) を噴霧乾燥または熱による蒸発または真空または凍結乾燥により実施する。

プロセスの別の実施形態において、段階 i) からの乾燥粉末を、100 から 150℃ で 5 から 60 分間オートクレープし、滅菌粉末を得る。

プロセスの別の実施形態において、段階 f) から得た溶液から分子を除去するために、段階 g) で管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いる。

段階 g) で管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いるプロセスの別の実施形態において、段階 g) から得た溶液をポアサイズが 0.2 から 0.4 ミクロンのフィルターを通過させ、滅菌溶液を得る。または、管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いた段階 g) から得た溶液を 100 から 150℃ で 5 から 60 分間オートクレープし、滅菌溶液を得る。

段階 g) で管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いるプロセスの別の実施形態において、透析器具滞留溶液の量を下げられるような滞留溶液を生じる流通透析器具を用いることにより、段階 g) から得た溶液を段階 h) で濃縮する。

本発明の方法の別の実施形態において、段階 g) で得た溶液を分子量カットオフ値 30,000 ~ 100,000 ダルトンのサンドイッチ型膜からなる流通器具を用いてさらに透析し、分子量下限が 500 から 10,000 ダルトンで分子量上限が 30,000 から 100,000 ダルトンの合成フェノールポリマー物質を含む過水溶液を得る。

さらに透析を行う先のプロセスの別の実施形態において、前述のさらなる透析に管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いる。段階 g) で管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いる先のプロセスの別の実施形態において、段階 g) から得た溶液をポアサイズが 0.2 から 0.4 ミクロンのフィルターを通過させ、滅菌溶液を得る。または、管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いた段階 g) から得た溶液を 100 から 150℃ で 5 から 60 分間オートクレープし、滅菌溶液を得る。段階 g) で管状、毛管、コイルらせん、または平面透析膜を用いる先のプロセスの別の実施形態において、透析器具滞留溶液の量を下げられるような滞留溶液を生じる流通透析器具を用いることにより、段階 g) から得た溶液を段階 h) で濃縮する。

【0055】

本発明の別の態様において、本発明の方法により製造した合成フェノールポリマー物質の抗ウイルス活性を示す量と血液製剤を含む血液製剤組成物を提供する。血液製剤組成物のひとつの実施形態において、前述の血液製剤はヒト全血である。血液製剤組成物の別の実施形態において、前述の血液製剤はヒト血小板である。ヒト血小板血液製剤組成物の別の実施形態において、抗ウイルス活性を示す量はヒト免疫不全ウイルス (HIV) 活性を低下させるのに十分な量である。

ヒト血小板血液製剤組成物のさらに別の実施形態において、抗ウイルス活性を示す量はエンベロープを持たないウイルスの活性を低下させるのに十分な量である。エンベロープを持たないウイルスはパルボウイルスまたはサイトメガロウイルスであることが好ましい。血液製剤組成物の別の実施形態において、前述の血液製剤はヒト血清である。血液製剤組成物の別の実施形態において、前述の血液製剤はヒト血液タンパクである。前述のヒト血液タンパクはヒト血清アルブミンまたはヒト血清ガンマグロブリンであることが好ましい。血液製剤組成物の別の実施形態において、前述の血液製剤はヒト血友病因子である。ヒト血友病因子は第 V I I I 因子または第 I X 因子であることが好ましい。前述の血液製剤がヒト血友病因子である血液製剤組成物の別の実施形態において、抗ウイルス活性を示す量はヒト免疫不全ウイルス (HIV) 活性を低下させるのに十分な量である。または、抗ウイルス活性を示す量はエンベロープを持たないウイルスの活性を低下させるのに十分な量である。エンベロープを持たないウイルスはパルボウイルスまたはサイトメガロウイルス

ルスであることが好ましい。

【0056】

本発明のさらに別の態様において、本発明の方法により製造した合成フェノールポリマー物質の抗ウイルス活性を示す量と血液製剤を接触させることにより、この血液製剤中のウイルス量を減少させる方法を提供する。血液製剤中のウイルス量を減少させる方法のひとつの実施形態において、前述の接触は、一方は前述の血液製剤を無菌状態で含み、もう一方は前述の合成フェノールポリマー物質の前述した抗ウイルス活性を示す量を無菌状態で含む、2つの別のチャンバー間の接続路におけるシールを無菌的に破ることからなる。前述の方法の別の実施形態において、前述の接触は、前述の血液製剤中に前述の抗ウイルス活性を示す量を含む無菌溶液を注入することからなる。

10

前述の方法の別の実施形態において、前述のウイルスはヒト免疫不全ウイルス（HIV）であることが好ましい。前述の方法の別の好ましい実施形態において、前述のウイルスはA型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、パルボウイルス、またはサイトメガロウイルスである。

前述の方法の別の実施形態において、ウイルス活性低下のための1つまたは複数の追加の血液処理法を用いる。追加の血液処理法は溶媒／界面活性剤（SD）法であることが好ましい。

【0057】

本発明の別の態様において、本発明の方法により製造した合成フェノールポリマー物質の抗ウイルス活性を示す量と少なくとも1つの生理学的に許容できる担体または賦形剤とを含む、ヒトまたは動物のウイルス起因疾患を治療または予防するための組成物を提供する。ウイルスはヒト免疫不全ウイルス（HIV）、単純疱疹ウイルスI型もしくはII型、またはピコルナウイルスであることが好ましい。生理学的に許容できる担体または賦形剤は注入可能な溶液賦形剤、局所製剤用賦形剤、摂取可能な賦形剤、鼻噴霧用賦形剤、用量測定吸入器用賦形剤、膣もしくは肛門坐剤用賦形剤、または医療器具の消毒もしくは保管に適した賦形剤であることが好ましい。

20

【0058】

本発明のさらに別の態様において、本発明の方法により製造した合成フェノールポリマー物質の抗菌活性を示す量と少なくとも1つの生理学的に許容できる賦形剤とを含む、ヒトまたは動物の細菌起因疾患を治療または予防するための組成物を提供する。生理学的に許容できる担体または賦形剤は注入可能な溶液賦形剤、局所製剤用賦形剤、摂取可能な賦形剤、鼻噴霧用賦形剤、用量測定吸入器用賦形剤、膣もしくは肛門坐剤用賦形剤、または医療器具の消毒もしくは保管に適した賦形剤であることが好ましい。医療器具はコンタクトレンズ、眼内レンズ、義歯、心臓弁などの移植用医療器具、または内視鏡もしくはカテーテルなどの体に接触する医療機器であることが好ましい。

30

【発明の効果】

【0059】

本発明では、物理化学的性質及び性状が再現可能で、典型的な市販天然フミン酸及び他の土壌抽出物の物理化学的性質及び性状を模しており、イオン塩または他の分子量500ダルトン未満の化合物を含まず、最小分子量が500ダルトンで、かつ、そのプロセスが経済的に許容できる収率を提供する工業レベルへの直接スケールアップに適した、合成フミン酸としても知られている合成フェノールポリマー物質を調整する化学的方法の新規で改善された組み合わせを提供できる。

40

【0060】

また、本発明では、前述のプロセスにより調整した合成フミン酸の抗ウイルス活性を示す量を含む、ヒトまたは動物の血液製剤組成物を提供できる。

また、本発明では、前述のプロセスにより調整した合成フミン酸の抗ウイルス活性を示す量を前述の血液製剤と接触させることにより、ヒトまたは動物の血液製剤中のウイルス量を減少または消失させる方法を提供できる。

また、本発明では、ヒトまたは動物のウイルス性疾患を治療または予防するための、前

50

述のプロセスにより調整した合成フミン酸の抗ウイルス活性を示す量を含む組成物を提供できる。

また、本発明では、ヒトまたは動物の細菌性疾患を治療または予防するための、前述のプロセスにより調整した合成フミン酸の抗菌活性を示す量を含む組成物を提供できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0061】

本発明によれば、合成フミン酸製造のための化学的方法で用いる出発化合物は、容易に購入できる公知の物質である。

概して、本発明の合成フミン酸調整のための化学的方法は、

a) 出発有機化合物または有機化合物混合物を蒸留水または水酸化ナトリウムを含む水溶液に溶解する段階と、

b) 必要があれば、段階 a) から得た水溶液の pH を 8 から 11 の間に調整する段階と、

c) 段階 b) から得た水溶液にアルカリ金属の過ヨウ素酸塩またはアルカリ土類金属の過ヨウ素酸塩を加える段階と、

d) 段階 c) から得た溶液の温度を 30 分間から 100 時間、35 から 80℃までに維持する段階と、

e) ホウ酸、ホウ酸塩、アルカリ土類金属塩、遷移金属塩、硫化アルカリ金属、硫化アルカリ土類金属、または硫化遷移金属からなるグループから選択した 1 つもしくは複数の化合物を、段階 d) から得た水溶液に加える段階と、

f) 段階 e) から得た水溶液を室温で 2 から 48 時間攪拌または攪拌せずに放置する段階と、

g) 段階 f) から得た溶液から約 500 から約 10,000 ダルトン未満の分子を除去する段階と、

h) 段階 g) から得た溶液を濃縮する段階と、

i) 必要があれば、段階 h) から得た溶液から水を除去する段階とからなることを特徴とする。

前述の段階 a) の出発有機化合物は、表 1 及び 2 に示した出発有機化合物群の 1 つまたは異なる複数の化合物の組み合わせでもよい。表 1 に示した出発有機化合物は、R1～R6 の 6 つの置換基を有する単一のベンゼン環からなり、この R1～R6 はこのうちの少なくとも 1 つが水酸基 (—OH) であれば、表記の原子または官能基のどれでもよい。R1～R6 の少なくとも 1 つが水酸基 (—OH) で、残りの置換基 R1～R6 の少なくとも 1 つがカルボキシル基を含むことが好ましい。R1～R6 の 2 つが水酸基 (—OH) で、残りの置換基 R1～R6 の 1 つがカルボン酸基を含むことがさらに好ましい。ホモゲンチン酸、すなわち 2,5-ジヒドロキシフェニル酢酸が特に好ましい出発有機化合物である。

【0062】

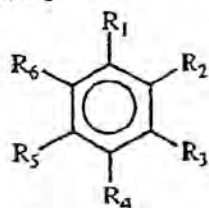
出発有機化合物は蒸留水中、様々な初期濃度で用いることができ、下限または上限を一樣に決める必要はない。出発有機化合物の希釈液として、0.1 規定などの低濃度水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。1 つまたは複数の出発有機化合物の適当な初期濃度は、必要とされる合成収率と、1 つまたは複数の出発有機化合物の水溶性の上限など、固有の必要条件によって決まる。1 つまたは複数の出発有機化合物の適当な初期濃度を求めるためには従来の方法を用いる。

段階 b) で、水酸化アンモニウム水溶液、または他の酸化もしくは水酸化アルカリ金属水溶液、または酸化もしくは水酸化アルカリ土類金属水溶液、または酸化もしくは水酸化遷移金属水溶液を加えることにより、1 つまたは複数の出発有機化合物を含む水溶液の pH を 8～11 の間に調整することができる。さらに、初期水溶液が 0.1 規定水酸化ナトリウムなどの低濃度の塩基を含み、かつ、初期溶液 pH が高すぎる場合は、塩酸などの酸を用いて pH を所期の値に調整してもよい。pH 調整のために他の無機酸を用いることもできる。pH を初期の高値から下方調整するために塩酸を用いる場合は、pH を 8 未満にし

ないように注意しなければならないことに留意されたい。突然変異誘発性の塩素化フミン酸物質が生成する可能性を排除するために、塩酸存在下 pH 7 未満の酸性状態を避けなければならない。

【0063】

【表1】



10

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ =

-H
 -CH₃
 -CH₂CH₃
 -(CH₂)₂CH₃
 -CH(CH₃)₂
 -OH
 -OCH₃
 -CHO
 -CO₂H
 -CO₂CH₃
 -CH₂OH
 -CH₂OCH₃
 -CH₂CHO
 -CH₂CO₂H
 -CH₂CO₂CH₃
 -(CH₂)₂OH
 -(CH₂)₂OCH₃
 -(CH₂)₂CHO
 -(CH₂)₂CO₂H
 -(CH₂)₂CO₂CH₃
 -CH(CH₃)OH
 -CH(CH₃)OCH₃
 -CH(CH₃)CHO
 -CH(CH₃)CO₂H

20

30

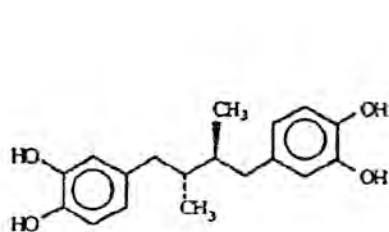
【0064】

【表 1 - 2】

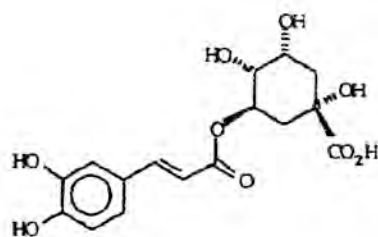
-CH(CH ₃)CO ₂ CH ₃	
-CH(CH ₃)CH ₂ OH	
-CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃	
-CH(CH ₃)CH ₂ CHO	
-CH(CH ₃)CH ₂ CO ₂ H	
-CH(CH ₃)CH ₂ CO ₂ CH ₃	
-CH(OH) ₂	
-CH(OH)OCH ₃	
-CH(OH)CHO	10
-CH(OH)CO ₂ H	
-CH(OH)CO ₂ CH ₃	
-CH(OCH ₃)OH	
-CH(OCH ₃) ₂	
-CH(OCH ₃)CHO	
-CH(OCH ₃)CO ₂ H	
-CH(OCH ₃)CO ₂ CH ₃	
-CH(OH)CH ₂ OH	
-CH(OH)CH ₂ OCH ₃	
-CH(OH)CH ₂ CHO	
-CH(OH)CH ₂ CO ₂ H	20
-CH(OH)CH ₂ CO ₂ CH ₃	
-CH(OCH ₃)CH ₂ OH	
-CH(OCH ₃)CH ₂ OCH ₃	
-CH(OCH ₃)CH ₂ CHO	
-CH(OCH ₃)CH ₂ CO ₂ H	
-CH(OCH ₃)CH ₂ CO ₂ CH ₃	
-(CH ₂) ₃ OH	
-(CH ₂) ₃ OCH ₃	
-(CH ₂) ₃ CHO	
-(CH ₂) ₃ CO ₂ H	
-(CH ₂) ₃ CO ₂ CH ₃	30
-CHCHOH (cis or trans)	
-CHCHOCH ₃ (cis or trans)	
-CHCHCHO (cis or trans)	
-CHCHCO ₂ H (cis or trans)	
-CHCHCO ₂ CH ₃ (cis or trans)	
-CH ₂ CHCHOH (cis or trans)	
-CH ₂ CHCHOCH ₃ (cis or trans)	
-CH ₂ CHCHCHO (cis or trans)	
-CH ₂ CHCHCO ₂ H (cis or trans)	
-CH ₂ CHCHCO ₂ CH ₃ (cis or trans)	40

【 0 0 6 5 】

【表 2】

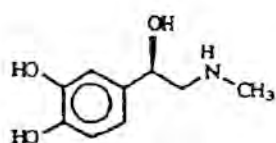


Nordihydroguaiaretic Acid

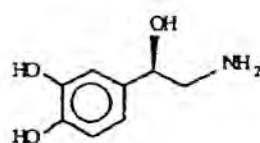


Chlorogenic Acid

10

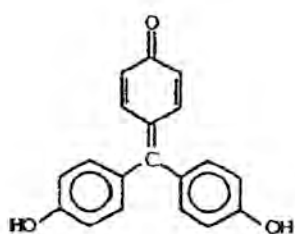


Epinephrine

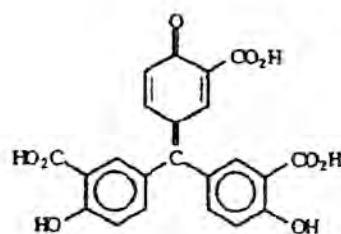


Norepinephrine

20



Aurin

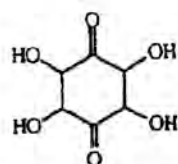


Aurintricarboxylic Acid

30

【0066】

【表 2-2】



Tetrahydroxybenzoquinone

40

【0067】

段階 c) において、出発有機化合物の酸化剤または重合開始剤としてアルカリ金属の過ヨウ素酸塩またはアルカリ土類金属の過ヨウ素酸塩を用いてもよい。過ヨウ素酸ナトリウ

50

ムが特に好ましい。アルカリ金属の過ヨウ素酸塩またはアルカリ土類金属の過ヨウ素酸塩濃度は通常、1つまたは複数の出発有機化合物のモル比で10%から100%までである。したがって、10ミリモルの出発有機化合物を用いる場合、1から10ミリモルのアルカリ金属過ヨウ素酸塩を用いることができる。1つまたは複数の出発有機化合物モル濃度の10%~50%の過ヨウ素酸塩モル濃度を用いることが好ましい。1つまたは複数の出発有機化合物モル濃度の25%~35%の過ヨウ素酸塩モル濃度を用いることが最も好ましい。用いる正確な濃度は、従来の合成収率を最適化する方法により決めることができる。

【0068】

pH調整段階b)の後で、段階c)の過ヨウ素酸塩添加の直前、同時、またはその後に、1つまたは複数の出発有機化合物を含む初期水溶液に硫化アルカリ金属、硫化アルカリ土類金属、または硫化遷移金属を任意に加えてもよい。硫化物はフェノールポリマーの構造、構造の安定性、及びその生物活性に貢献する。硫化ナトリウム九水和物は特に好ましい硫化物である。硫化物の濃度は通常、1つまたは複数の出発有機化合物の1%から20%までである。したがって、10ミリモルの出発有機化合物を用いる場合、0.1から2ミリモルの硫化物を用いることができる。1つまたは複数の出発有機化合物モル濃度の5%~15%の硫化物モル濃度を用いることが好ましい。1つまたは複数の出発有機化合物モル濃度の8%~12%の硫化物モル濃度を用いることが最も好ましい。用いる硫化物の正確な濃度は、従来の合成収率を最適化する方法により決めることができる。

【0069】

段階d)で、出発有機化合物、過ヨウ素酸塩、及び任意の硫化物を含むpH調整した水溶液を、35℃から80℃の水浴中または他の恒温加熱装置内に30分から100時間置く。または、水溶液自体を30分から100時間、35℃から80℃の一定温度に保つてもよい。温度と時間は50℃で30分間が好ましい。

前述の時間経過後、段階d)から得た溶液に特定の無機化合物を添加する。ホウ酸、及びホウ素、カルシウムなどのアルカリ土類金属、並びに鉄などの遷移金属を含む塩が好ましい。このような塩はさらに、フェノールポリマー構造、その安定性、及び生物活性に貢献する。硫酸カルシウム2水和物などのアルカリ土類金属塩及び硫酸第1鉄7水和物などの遷移金属塩と同じく、ホウ酸またはホウ酸ナトリウムなどのホウ素含有ホウ酸塩が特に好ましい。用いるそれぞれの塩の濃度は通常、1つまたは複数の出発有機化合物の0.1モル%から20モル%の間である。1つまたは複数の出発有機化合物モル濃度の0.2%から10%までのモル濃度の塩を用いることが好ましい。1つまたは複数の出発有機化合物モル濃度の0.2%から2%までのモル濃度の塩を用いることが最も好ましい。用いる正確な濃度は、従来の合成収率を最適化する方法により決めることができる。

【0070】

段階f)において、段階e)から得た溶液を室温で2から48時間攪拌または攪拌せずに放置する。この段階で生じた沈殿はどのようなものでも、通常の遠心分離法により除去する。

【0071】

段階g)において、約500から約10,000ダルトン未満の分子を段階f)から得た溶液から除去する。分離用クロマトグラフィ、限外ろ過、または透析などの様々な公知の従来法を用いることができる。段階g)において、分子量カットオフ下限値500~10,000ダルトンのサンドイッチ型膜からなる流通開水路またはスクリーン膜器具を用いて溶液の伝導率が200マイクロジーメンズ以下に下がるまで透析することにより、段階f)から得た溶液から分子を除去することが好ましい。段階g)において、溶液の伝導率が30マイクロジーメンズ以下に下がるまで透析することにより、段階f)から得た溶液から分子を除去することが最も好ましい。溶液の透析には、Pall Filtron Ultrasette(R) Tangential Flow DeviceまたはMini-Ultrasette(R) Tangential Flow DeviceをPall Filtron UltraLab(R) Specialized Pump及びReservoir Systemと共に用いることが好ましい。前述の段階g)で処理した溶液の伝導率は、流通伝導率セル及び伝導率計により簡便にモ

ニターすることができる。または、単純で安価な手動式の伝導率セル-伝導率計セット（例えばNalcometer Model MLN）を用いることもできる。

【0072】

前述の段階h)で溶液から水を除去する前に、前述の段階g)から得た溶液を、分子量カットオフ値50,000ダルトンのサンドイッチ型膜からなる流通器具でさらに透析してもよい。この場合、滞留液ではなくろ液を回収し、段階h)及びi)による濃縮及び処理をさらに行う。得られた生成物は500~50,000ダルトンまでの分子量を有することになる。前述の段階g)またはh)のいずれかから得た溶液を後で、例えば抗ウイルス治療液剤、抗ウイルス療法、抗菌療法、噴霧式肥料、または土壌改良剤として用いるために長期間水溶液で保存する場合、細菌及びウイルスを除去するために標準の0.2から0.4ミクロンのフィルターでろ過する、すなわちろ過により滅菌することができる。または、段階g)またはh)のいずれかからの水溶液を100~150℃で5~60分間オートクレーブして無菌溶液とすることもできる。

10

【0073】

本発明の方法における最終の任意段階i)は、段階h)から得た溶液から水を除去する段階である。前述の段階i)で水の除去法として凍結乾燥を用いる場合、得られる生成物は、静電気の影響を受けやすい、軽くて飛散性の色の濃い粉末である。これらの影響を最小限にするために、段階h)から得た溶液に少量のマンノースまたは他の糖を凍結乾燥の直前に加えてもよい。生成物からの水の除去は、前述の段階i)における凍結乾燥以外に、熱による真空または常圧蒸発、回転蒸発、噴霧乾燥、または水溶液に都合がよく、かつ経済的な他の溶媒除去法により実施することができる。前述の段階i)から得た乾燥粉末を、100~120℃で15~30分間オートクレーブして無菌粉末とすることもできる。

20

【0074】

本発明の化学的方法並びに分離及び単離法により製造した合成フミン酸物質は、典型的な市販天然フミン酸及び他の土壌抽出物の物理化学的性質及び性状を示す。

前述の段階a)からh)、またはそれらの変法により得た生成物の物理化学的特徴を調べる簡便な方法は、高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)である。HPLCからこのようにして得られるクロマトグラフィ上のフィンガープリント・パターンは、1つの生成物と別の生成物とを比較する場合、並びに各生成物と天然フミン酸及び他の土壌抽出物質とを比較する場合の便利な手段にもなる。

30

【0075】

従って、HPLC法は、合成フェノールポリマー物質の物理化学的性質及び性状の再現性を調べるため、並びに前述の性質及び性状が典型的な天然市販フミン酸及び他の土壌抽出物の物理化学的性質及び性状を模しているかどうかを調べるために用いる。後者の性状を模しているかどうかの試験は、HPLCを用いた通常の方法、例えば物質のHPLCクロマトグラフィ上のフィンガープリント・パターンを肉眼的及び定量的に比較することにより行う。合成フェノールポリマー物質の物理化学的性質及び性状が天然フミン酸の物理化学的性質及び性状を模していると結論付けるために、1つは合成、もう1つは天然の2つの物質のフィンガープリント・パターンが100%同じである必要はない。合成物質が天然物質を模していると結論付けるためには、前述のHPLCフィンガープリント・パターン間におおよその対応があるだけでよい。一般に、2つのHPLCフィンガープリント・パターンに肉眼で見て75%の対応があるだけで、一方が他方を模していると結論付けることができる。

40

【0076】

天然及び合成土壌抽出物質の有用なフィンガープリント・パターンは次のようにして得られる。カラムは粒子サイズ5ミクロンの充填剤、通常は逆相ポリマーPRP-1(Hamilton Co.)からなる、長さ150mm、内径4.1mmのものである。移動相は3種類の溶液からなる。溶液Aは0.1規定水酸化ナトリウム水溶液である。溶液Bは0.05規定のいわゆるPrideaux汎用緩衝液で、4.25グラムの硝酸ナトリウム(NaNO_3)、12.37

50

グラムのホウ酸(H_3BO_3)、23.06グラムのリン酸(H_3PO_4)、及び1.2.01グラムの酢酸($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$)を4リットルの蒸留水と合わせて作る。溶液Cは100%メタノール(CH_3OH)である。HPLCの実行に用いる移動相の勾配は、開始時には溶液A40%+溶液B60%からなり、組成を直線的に変化させて20分後に溶液A100%とする。次いで、移動相を再び直線的に変化させ、次の5分間で10%A+90%Cとし、この最終組成をカラム洗浄のために続く35分間維持する。移動相の流速は毎分1ミリリットルとする。検出器はUV-可視で、340ナノメートルに設定する。チャートスピードは通常、毎分0.5センチメートルである。試料ループのサイズは5~20マイクロリットルである。乾燥試料1~10グラムをpH8~10の0.1規定水酸化ナトリウム水溶液100ミリリットルに溶解して、分析用に溶液を調整する。

10

【0077】

本発明の化学的方法並びに分離及び単離法は、経済液に許容できる収率を提供する工業レベルへの直接のスケールアップに適している。本発明の化学的方法並びに分離及び単離法では、100%に近い合成生成物収率を得ることができる。さらに一般的に、300ml中10ミリモルの1つまたは複数の出発有機化合物から約0.08から0.65gの合成フミン酸が得られる。これらの手順は、1つまたは複数の出発有機化合物を含む初期溶液10,000から20,000リットル以上を用いる医薬品製造規模にスケールアップすることができる。10,000リットルの保温ジャケット付きステンレス・タンクで300ml中10ミリモルの出発有機化合物濃度を用いて、全収量約2.7から21.7kgまでの合成フミン酸が得られる。1回の抗ウイルス治療にミリグラム量の合成フミン酸を用いてもよい。合成フミン酸20kgはユニット当たり10mgで200万ユニットの抗ウイルス製剤に相当する。ユニット当たり0.10\$の治療コストでも、これは合成フミン酸200,000\$に相当する。本発明で用いる出発有機化合物は比較的安価であるため、本発明の化学的方法並びに分離及び単離法の合成収率は経済的に非常に良好である。

20

【0078】

参考例1から9は、本発明の方法で用いることのできる様々な出発有機化合物の実例である。様々な出発化合物を例示するために本発明の方法の全段階を実施する必要はないと考えられた。特に、参考例1から9は本発明の方法の段階e)を除く全段階の実例である。

30

【0079】

[参考例1]

2,5-ジオキシ安息香酸(ゲンチシン酸)からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物を表1に示す。本化合物のR1は $-\text{CO}_2\text{H}$ 、R2及びR5は $-\text{OH}$ 、R3、R4及びR5は $-\text{H}$ である。ゲンチシン酸1.55g(10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液300mLに溶解する。6NのHClで溶液のpHを8.5に調整する。過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)0.54g(2.5mM)を加え、溶液を50℃のウォーターバスに30分入れる。その後、溶液を室温で一晩放置する。沈殿物はすべて遠心分離で除去する。3,000ダルトンのカットオフフロースルーオープンチャンネルまたはスクリーン膜システム(Pall Filtron Ultrasette(R) 7 Tangential Flow DeviceまたはMini-Ultrasette(R) 7 Tangential Flow DeviceをPall Filtron Ultralab(R) 7 Specialized Pump and Reservoir Systemと共に使用)を用いて、蒸留水に対して導電率30 μs 以下になるまで溶液を透析する。次に、この透析器を用いて溶液を約200mLに濃縮する。その後の使用に備えて、この濃縮液をこの時点で水溶液として保存することが可能である。また、凍結乾燥して粉末にすることも出来る(凍結乾燥前に、マンノースなど適切な炭水化物0.05~0.2gを溶液に加え、凍結乾燥粉末による静電気作用を抑えることが可能である)。合成土壌抽出物の収量は0.2gである。

40

以下の参考例2~9では、参考例1の溶液のpH調整以降の合成手順を採用している。

【0080】

50

〔参考例2〕

3, 4-ジオキシフェニル酢酸 (ホモプロトカテチュ酸) からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物である3, 4-ジオキシフェニル酢酸を表1に示す。本化合物のR1は-CH₂CO₂H、R3及びR4は-OH、R2、R5及びR6は-Hである。ホモプロトカテチュ酸1.68g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は0.24gである。

【0081】

〔参考例3〕

d1-(3, 4-ジヒドロキシフェニル) ヒドロキシ酢酸 (d1-3, 4-ジヒドロキシマンデル酸) からの合成フミン酸の調製 10

出発有機化合物であるd1-(3, 4-ジヒドロキシフェニル) ヒドロキシ酢酸を表1に示す。本化合物のR1は-CH(OH)CO₂H、R3及びR4は-OH、R2、R5及びR6は-Hである。d1-3, 4-ジヒドロキシマンデル酸1.84g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は0.08gである。

【0082】

〔参考例4〕

オーリントリカルボン酸からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物の化学構造を表2に示す。オーリントリカルボン酸4.2g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は4.7gである。 20

【0083】

〔参考例5〕

3-(3, 4-ジヒドロキシフェニル) プロペノイン酸 (カフェイン酸) からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物を表1に示す。本化合物のR1は-CHCHCO₂H、R3及びR4は-OH、R2、R5及びR6は-Hである。カフェイン酸1.80g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は0.65gである。 30

【0084】

〔参考例6〕

テトラヒドロキシベンゾキノンからの合成フミン酸の調製

出発有機化合物の化学構造を表2に示す。テトラヒドロキシベンゾキノン1.72g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は0.016gである。

【0085】

〔参考例7〕

1, 4-ジヒドロキシベンゼン (ヒドロキノン) からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物を表1に示す。本化合物のR1及びR4は-OH、R2、R3、R5及びR6は-Hである。ヒドロキノン1.10g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は0.16gである。 40

【0086】

〔参考例8〕

3, 4, 5-トリオキシ安息香酸 (没食子酸) からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物を表1に示す。本化合物のR1は-CH₂CO₂H、R3、R4及びR5は-OH、R2及びR6は-Hである。没食子酸1.70g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は0.10gである。 50

【0087】

〔参考例9〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物を表1に示す。本化合物のR1は $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 、R2及びR5は $-\text{OH}$ 、R3、R4及びR6は $-\text{H}$ である。ホモゲンチジン酸1.68g (10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液300mLに溶解する。これ以降の手順は参考例1と同じである。合成土壌抽出物の収量は0.20gである。

【0088】

以下の実施例10～13に、段階e)を含む本発明の過程全体を示す。実施例10～13は、本発明の化学的処理・分離・単離過程に従って産生された合成フミン酸成分が、入手可能な典型的な天然フミン酸及びその他の土壌抽出物の性質及び物理化学的特性を示していることを説明している。また、実施例10～13は、本発明の化学的処理・分離・単離過程に従って産生された合成フミン酸の治療適応が、一般に土壌抽出物及びフミン酸の治療適応、すなわちウイルス関連障害及びその他の障害、炎症、微生物などによる疾患であることも示している。

【0089】

〔実施例10〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）からの合成フミン酸の調製

出発有機化合物を表1に示す。本化合物のR1は $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 、R2及びR5は $-\text{OH}$ 、R3、R4及びR6は $-\text{H}$ である。ホモゲンチジン酸1.0g (6mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液300mLに溶解する。6NのHClで溶液のpHを8.5に調整する。過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)0.32g (1.5mM)及び硫化ナトリウム九水和物($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)0.12g (0.5mM)を加え、溶液を50℃のウォーターバスに一晩入れる。続いて、ホウ酸(H_3BO_3)0.001g (0.016mM)、硫酸第一鉄($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.021g (0.075mM)、硫酸カルシウム二水和物($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)0.006g (0.035mM)を加え、溶液を室温で2時間攪拌する。沈殿物はすべて遠心分離で除去する。3000ダルトンのカットオフフロースルーオープンチャンネルまたはスクリーン膜システム(Pall Filtron Ultrasette (R) 7 Tangential Flow DeviceまたはMini-Ultrasette (R) 7 Tangential Flow DeviceをPall Filtron Ultralab(R) 7 Specialized Pump and Reservoir Systemと共に使用)を用いて、蒸留水に対して導電率30 μS 以下になるまで溶液を透析する。次に、この透析器を用いて溶液を約200mLに濃縮する。その後の使用に備えて、この濃縮液をこの時点で水溶液として保存することが可能である。また、凍結乾燥して粉末にすることも出来る(凍結乾燥前に、マンノースなど適切な炭水化物0.05～0.2gを溶液に加え、凍結乾燥粉末による静電気作用を抑えることが可能である)。合成土壌抽出物の収量は0.23gである。

【0090】

本実施例で得られた合成土壌抽出物のHPLCの結果を図1に示す。ピーク1～6は本実施例によって生じたものである。ピーク5はピーク4の肩の下に重なっており、はっきりしない。時間対検出信号の数学的一次導関数により、ピーク5を明らかに示すことが可能である。図2は、典型的な市販の天然フミン酸のHPLCの結果である。図1及び図2のピーク6は90～100% v/vメタノールによるカラム洗浄によって生じたもので、合成フミン酸も含有している。ピーク2、ピーク4及びピーク6中の成分の相対量を除くと、図1及び図2のHPLCの結果の他のピークは本質的に等しいことがわかる。したがって、本発明の合成方法は、市販の土壌抽出物と本質的に等しい物理化学的特性を有するフミン酸を産生したと言える。

【0091】

〔実施例11〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）からの他の合成フミン酸の調製

出発有機化合物を表1に示す。本化合物のR1は $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 、R2及びR5は $-\text{OH}$ 、R3、R4及びR6は $-\text{H}$ である。

OH、R3、R4及びR6は-Hである。ホモゲンチシン酸1.68g(10mM)を0.1Nの水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液300mLに溶解する。6NのHClで溶液のpHを8.5に調整する。過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO₄)0.75g(3.5mM)及び硫化ナトリウム九水和物(Na₂S·9H₂O)0.24g(1mM)を加え、溶液を50℃のウォーターバスに一晩入れる。続いて、ホウ酸(H₃BO₃)0.006g(0.1mM)、硫酸第一鉄(FeSO₄·7H₂O)0.28g(1mM)、硫酸カルシウム二水和物(CaSO₄·2H₂O)0.017g(0.1mM)を加え、溶液を室温で48時間攪拌する。沈殿物はすべて遠心分離で除去する。3,000ダルトンのカットオフフロースルーオープンチャンネルまたはスクリーン膜システム(Pall Filtron Ultrasette TM 7 Tangential Flow DeviceまたはMini-Ultrasette TM 7 Tangential Flow DeviceをPall Filtron Ultralab TM 7 Specialized Pump and Reservoir Systemと共に使用)を用いて、溶液を透析する。次に、この透析器を用いて溶液を約200mLに濃縮する。その後の使用に備えて、この濃縮液をこの時点で水溶液として保存することが可能である。また、凍結乾燥して粉末にすることも出来る(凍結乾燥前に、マンノースなど適切な炭水化物0.05~0.2gを溶液に加え、凍結乾燥粉末による静電気作用を抑えることが可能である)。合成土壌抽出物の収量は0.47gである。本実施例で得られた合成土壌抽出物のHPLCの結果は、実施例10に記載し、図1に示した結果と全く同じである。

【0092】

〔実施例12〕

実施例10及び11に従って調製した合成フミン酸の抗ウイルス特性

実施例10及び11に従って数百mgの合成フミン酸を調製する。以下の方法により、合成フミン酸の抗ウイルス特性を調べた。

American Type Culture Collection(米国メリーランド州ロックビル)から入手したJurkat細胞を、L-グルタミン2mM及び15%ウシ胎児血清(FBS)を添加したRPMI-1640培地を用いて5日ごとに継代培養する。Coulter粒子カウンター(Coulter社、米国フロリダ州ハイアリーア)を用いて細胞数を数える。細胞にHIV-1プラスミドpNL4-3(A.Adachi, H.E.Gendleman, S.Koenig, T.Folks, R.Willey, A.Rabson, and M.A.Martin, J.Virol.1986, 59, 284-291:これによって処理した細胞培養は、電子顕微鏡で数えて約1×10⁷個という高レベルのHIV-1を産生する)を接種する。L-グルタミン2mM、15%ウシ胎児血清、1%Pen-Strep(1mL当たりペニシリン100U及びストレプトマイシン100mg)を添加したRPMI-1640培地から成る完全培地で感染細胞を培養する。安定したHIV-1産生を得るため、使用前に細胞を約4週間観察する。

合成フミン酸の抗ウイルス作用をテストする前に、Jurkat細胞培養上澄み液のHIV-1 p24産生をまず調べ、前処理ベースラインを確立する。ウイルス産生のレベルを確認した後、増殖培地を変え、細胞数を1mL当たり1.5×10⁶個に調整する。次に、テストする合成フミン酸の投与2日前に、感染細胞を正常の未処理の細胞と等量混合し、ウイルス産生レベルをHIV-1 p24イムノアッセイの範囲内にする。24時間後、既知の量の合成フミン酸を細胞混合液に加える。合成フミン酸を投与して一定の日数が過ぎた後、HIV-1抗原用の固相アッセイ(HIVAG-1:Abbott Laboratories, Diagnostic Division、米国イリノイ州アボットパーク:Abbott Quantum II ELISA reader and data reduction module 1.21)でHIV-1 p24発現を測定する。

実施例10及び11に記載された方法に従って調製した合成フミン酸が、実施例12の手順に従って測定したHIV陽性細胞のp24発現に対して及ぼす影響を図3に示す。図3中の実施例11aは実施例11の手順に従って調製したものである。図3中の実施例11bは、実施例11の手順に最終溶液の凍結乾燥を追加した方法に従って調製したものである。比較のため、実施例1-11に記載されているとおりに透析した天然フミン酸の結果と、実施例1-11に記載されているとおりに透析した後に凍結乾燥させた天然フミン酸の結果も図に示す。これらの結果は、すべてのサンプルでp24の発現が有意に低下し

たことを示している。また、12日目には、方法の実験誤差内でp24は検出されなかった(C-対照よりも高いものはなかった)。

【0093】

〔実施例13〕

実施例10に従って調製した合成フミン酸の毒性

実施例10の手順に従って数百mgの合成フミン酸を調製する。ヒト全血450mLを1単位とし、5単位をCP2D/AS-3LeukotrapRC-PLシステムに採取する。血液は室温で3時間放置する。各サンプルの重量を測定した後、2820rpm(2312G)で3分44秒遠心分離する。続いて、ATS-LPLフィルターを用いて血液を血小板保存バッグ内にろ過する。その際、ろ過時間を記録する。LR-PRPを3600rpm(3768G)で7分間遠心分離する。血小板含有量の少ない血漿55gを残し、他の血漿を各サンプルから除去する。血小板濃縮液を室温で90分間放置した後、重量を測定し、血小板インキュベーターに入れる。RCMIフィルターをAS-3溶液で処理する。重力でろ過できるように、空のAS-3バッグの上方60インチの高さに予備バッグを吊す。ろ過時間を記録し、RCMIフィルターの下3インチの部分でLR-RCCシステムを密閉する。各RCMIフィルターの重量を、長さ6インチのチューブとLR-RCCシステム(提供者のIDチューブ部分を含む)と共に測定する。ろ過後のテスト(LR-RCC)のために、この時点でサンプルを取っておく。1日目に、各血小板濃縮液に合成フミン酸を十分加え、濃度を1mL当たり25 μ gにする。この血小板濃縮液を血小板インキュベーターに1時間入れ、テストのために各血小板濃縮液のサンプルを取っておく。その後のテストのために、5日目にもサンプルを取る。実施例10に記載された方法で調製した合成フミン酸が血小板濃縮液の生育能力に及ぼす作用を、本実施例の方法で測定した結果を表3に示す。

【0094】

【表 3】

Unit No.	pH at 22°C		pCO ₂ , mm Hg		pO ₂ , mm Hg		HCO ₃ , mmol/L		MPV, fl	
	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5
1	7.466	7.394	19.3	12.8	33.5	44.4	16.8	9.5	7.0	6.6
2	7.321	7.215	21.6	14.3	9.9	22.2	13.8	7.3	6.7	6.3
3	7.320	7.278	24.4	16.6	10.3	21.3	15.6	9.7	6.7	6.5
4	7.368	7.308	20.7	14.3	13.4	22.2	14.6	8.9	6.5	6.3
5	7.457	7.454	20.1	13.8	23.7	29.0	17.1	11.6	7.7	7.4
Mean	7.386	7.329	21.2	14.4	18.2	27.8	15.6	9.4	6.9	6.6
Std. Dev.	0.071	0.095	2.0	1.4	10.2	9.8	1.4	1.5	0.5	0.6

Unit No.	WBC Yield, x 10 ⁶	Platelet Yield, x 10 ¹⁰		Streaming		% ESC		% HSR		Lactate, mmol/L	
	Day 1	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5
1	0.1	8.3	9.0	3	3	24.2	16.9	78.0	64.0	5.1	12.1
2	0.2	14.5	14.2	3	3	27.5	20.3	81.7	71.5	6.6	13.4
3	0.4	13.3	13.4	3	3	28.7	26.3	81.7	79.4	6.3	12.4
4	0.3	11.7	12.3	3	2	22.1	19.2	81.4	77.1	6.6	13.1
5	0.3	8.9	9.1	3	3	19.1	14.4	74.7	70.2	4.5	9.7
Mean	0.3	11.3	11.6	3.0	2.8	24.3	19.4	79.5	72.4	5.8	12.1
Std. Dev.	0.1	2.7	2.4	0.0	0.4	3.9	4.5	3.1	6.1	1.0	1.4

【0095】

結果はすべて許容範囲内であり、合成フミン酸は血小板の生育能力に全く影響を与えない（つまり、毒性はない）ことが示された。血小板は様々な化学薬品に対して感受性が高いことが知られているため、この結果は特に注目値する。血小板用の安全な抗ウイルス治療がほとんどないのは、この高い感受性のためである。

実施例 12 及び 13 は、前述の方法及び本発明の分離・単離手順に従って調製した合成

10

20

30

40

50

フミン酸を抗ウイルス量で血液製剤と配合して血液製剤混合物を作ることが可能であることを示している。抗ウイルス量の合成フミン酸をヒトまたは動物の血液製剤、例えば全血や血漿、血小板など、血液蛋白（例：血友病第ⅤⅠⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、第Ⅴ因子、ⅠgG、ⅠgM）あるいはウイルス活性を低下または消失させる血液成分を含む血液製剤に加えてもよい。合成フミン酸は、液体の血液製剤にも固体の血液製剤にも抗ウイルス量で添加してよい。合成フミン酸は血液成分（溶媒・洗浄剤〔SD〕処理法が適用されるすべての血液成分を含む）に適用されるだろう。SD処理法と直接比較した場合、SD処理法はエンベロープを持たないウイルスには無効であるのに対し、本発明に従って調製した合成フミン酸はエンベロープを持つウイルスにもエンベロープを持たないウイルスにも抗ウイルス活性を有し、より広い適用範囲を持つ。合成フミン酸の抗ウイルス量は、フミン酸の抗ウイルス量に関する先行技術から、ウイルス活性を低下または消失させるのに有用であることが知られている量である。一般に、液体血液製剤中でウイルス活性を低下または消失させるのに血液製剤中で有用な抗ウイルス量は、液体血液製剤1mL当たり合成フミン酸5～1000μgである。この濃度範囲は、使用前に溶液に溶解する乾燥合成フミン酸を含有する固形血液製剤にも適用される。ウイルス活性を低下または消失させるのに利用される正確な量はウイルスや血液製剤の種類によって異なるが、技術上既知の従来の抗ウイルステスト法で測定可能である。HIVや肝炎ウイルスによる汚染が疑われたり、あるいはこれらのウイルスによって汚染されている全血や血漿などの血液製剤は、例えば約10～200μg/mLの合成フミン酸を添加することにより修飾が可能である。実施例14及び15に、本発明の処理及び分離・単離手順に従って調製した合成フミン酸を抗ウイルス量含有する血液製剤を示す。

【0096】

〔実施例14〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチシン酸）から調製した合成フミン酸25μg/mLを含有するヒト全血製剤

本血液製剤の組成は以下のとおりである。

ヒト全血：1L

合成フミン酸：25mg

【0097】

〔実施例15〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）から調製した合成フミン酸を含有するヒト血有病第ⅤⅠⅠⅠ因子製剤

本血液製剤の組成は以下のとおりである。

ヒト血有病第ⅤⅠⅠⅠ因子：1～5mLバイアル*

合成フミン酸：125μg

注：これは、注射可能な滅菌食塩水5mLで溶解するための滅菌高度精製凍結乾燥第ⅤⅠⅠⅠ因子濃縮物と、蛋白質濃度100IU/mgで3900単位（IU）の第ⅤⅠⅠⅠ因子を含有するバイアルである。

【0098】

本発明の前述の処理及び分離・単離手順に従って調製した合成フミン酸は、ヒトまたは動物の血液製剤中のウイルス量を減少または除去させる方法に、前述の定義の抗ウイルス量で利用することが可能である。一般に、このような方法では、抗ウイルス量の合成フミン酸と血液製剤とを何らかの方法で接触させなければならない。抗ウイルス量の合成フミン酸を含有する滅菌溶液を血液製剤に直接注入するなど、様々な接触方法が利用されている。特に好ましい方法には、静脈内投与溶液用のいわゆる「デュアルバッグ」技術が使われている。この方法では、内部が2つの部分に分かれているが、相互に交通のあるプラスチック製バッグが使われている。内部の2つの部分の各容量や両者の容量比は様々である。また、この2つの部分には各々異なる薬剤を入れてもよい。本発明の場合では、一方に血液製剤を、もう一方に合成フミン酸を入れる。使用準備が整うまで、両剤は互いに接触しないようにする。両剤を接触させるには2つの部分の間の弁を開くか、あるいは封印を

取る。通常、封印は両剤の滅菌性を損なわずに取ることが出来る。滅菌デュアルバッグは米国イリノイ州のAbbott Laboratories社や米国カリフォルニア州のMcGaw社などから入手可能である。これ以外の方法として、患者に使用する最終容器に血液製剤を入れる最終加工段階中またはその前に抗ウイルス量の合成フミン酸と血液製剤とを接触させてもよい。本発明で調製した合成フミン酸は毒性は持たないため、血液製剤の使用前に合成フミン酸と血液製剤を分ける必要はない。溶媒・洗浄剤（SD）血液処理法における洗浄剤は、大豆またはヒマシ油との抽出及び不溶性C18樹脂のクロマトグラフィを利用している血液製剤と分ける必要があることはすでに本書で開示してある。合成フミン酸を利用してヒト血液製剤中のウイルス量を減少または消失させる方法には、SD法と異なり、脂質エンベロープを持つウイルスも持たないウイルスも不活化できるという特長がある。さらに、血液製剤の様々な熱処理法や紫外線照射法と異なり、合成フミン酸による処理法では基本的に血液製剤の量は減らない。合成フミン酸を利用してヒト血液製剤中のウイルス量を減少または消失させる方法は、溶媒・洗浄剤（SD）血液処理法や他の血液処理法、例えば熱処理や紫外線照射などと組み合わせることも可能である。これらの血液処理法のうち1つまたは複数をフミン酸処理法と組み合わせてもよい。

実施例16に、本発明の前述の処理及び分離・単離手順に従って調製した合成フミン酸が、ヒト血液製剤中のウイルス量を減少させる方法に抗ウイルス量で利用できることを示す。

【0099】

〔実施例16〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）から調製した合成フミン酸を用いてヒト血液バッグ中のウイルス量を減少させる方法

実施例10の手順に従って調製した合成フミン酸の抗ウイルス特性を以下の方法で調べる。本実施例では、ウシウイルス性下痢症ウイルス（BVDV）を抗ウイルス活性の標準ウイルスとして使用する。BVDVは脂質エンベロープを持つウイルスで、抗ヒト免疫不全ウイルス活性などの抗ウイルス活性の良い指標であることが知られている。10E-7のTCID50で滴定したBVDVのウイルスストックを用意する。血小板を含有する血液バッグを12袋用意する（フミン酸濃度0 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ に対し各々1袋。これを3セット用意）。合成フミン酸を用いてヒト血液バッグ中のウイルス量を減少させる方法では、容積測定量の滅菌合成フミン酸水溶液を各血液バッグに加えるだけでよい。正確には、濃度100 $\mu\text{g/mL}$ の滅菌合成フミン酸液を蒸留水に溶解させたものを、血液製剤40～60 mLを含む血液バッグに加え、フミン酸の最終濃度が10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ のいずれかになるようにする。以下の間隔で血液バッグからサンプルを採取する。接種前の対照としてT0時間、ウイルスストック接種後T1時間（フミン酸添加接種後T1時間目）、接種後T2時間にサンプルを採取する。さらに、T24時間、T72時間、T120時間にもサンプルを採取する。採取したサンプルを用いて定量的ウイルス培養を行い、各フミン酸濃度についてTCID50及び対数減少を求める。このテストの結果は、ヒト血液製剤中のウイルス量を減らす方法に、本発明に従って調製した合成フミン酸が利用できることを示している。

【0100】

本発明の前述の処理及び分離・単離手順に従って調製した合成フミン酸は、ヒトまたは動物のウイルス性疾患の治療用または予防用の混合物に抗ウイルス量で利用できる。合成フミン酸を含有する混合物は、天然フミン酸が有用であると示されているヒトまたは動物のウイルス性疾患の治療または予防に適している。

したがって、合成フミン酸混合物は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）や単純ヘルペスウイルスなどヒトのウイルスによって生じるヒトの疾患の治療または予防に適している。また、合成フミン酸混合物は、（1）Aphovirus属、（2）Cardiovirus属、（3）Hepatovirus属（旧Enterovirus属）、（4）Renterovirus属（主に旧Rhinovirus属と旧Enterovirus属の組み合わせから成る）、（5）エコーウイルス22単独から成る新たな属の計5属が

現在認められているピコルナウイルス科によって生じる疾患の治療または予防にも適している。様々な投与経路や特定のウイルス性疾患に適した混合物を調製することが可能である。特定のウイルス性疾患用の合成フミン酸の抗ウイルス量は、同じ疾患に有用であることが知られている天然フミン酸の既知の抗ウイルス量から決めることが可能である。抗ウイルス量の合成フミン酸及び生理学的に認められる賦形剤（最低1剤）から成る様々な混合物を調製可能である。既知の賦形剤及び方法を用いて、静脈内注射剤や筋肉内注射剤、外用剤、経口剤、鼻内スプレー、計量吸入剤、錠剤、座剤などに適した、生理学的に認められる賦形剤を使用した製剤が調製可能である。実施例17～21にこれらの製剤を示す。

【0101】

10

〔実施例17〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）から調製した抗ウイルス量の合成フミン酸及び注射可能な溶液用賦形剤を含有する、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染治療用注射剤

塩化ナトリウム： 9.00 g

合成フミン酸： 500 mg

蒸留水： 適量（1 L未満）

上記溶液のpHは、蒸留水を全部加える前に1 Nの水酸化ナトリウムで7.4に調整できる。本注射剤は、滅菌注射剤の従来の製造法で調製できる。

【0102】

20

〔実施例18〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）から調製した抗ウイルス量の合成フミン酸及び外用剤用賦形剤を含有する、ヒト単純ヘルペスウイルス（HSV-IまたはHSV-II）感染治療用軟膏

合成フミン酸： 3.0 g

セトステアリルアルコール： 27 g

流動パラフィン： 20 g

白色ワセリン： 50 g

【0103】

〔実施例19〕

30

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）から調製した抗ウイルス量の合成フミン酸及び外用剤用賦形剤を含有する、ヒト単純ヘルペスウイルス（HSV-IまたはHSV-II）感染治療用クリーム

合成フミン酸： 2.4 g

セトステアリルアルコール： 5 g

流動パラフィン： 50 g

蒸留水： 100 gまで添加

【0104】

〔実施例20〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）から調製した抗ウイルス量の合成フミン酸及び外用剤用賦形剤を含有する、ヒト単純ヘルペスウイルス（HSV-IまたはHSV-II）感染治療用外用液剤

合成フミン酸： 2.4 g

硫化ナトリウム： 1.0 g

コロイド硫黄： 1.4 g

塩化ナトリウム： 2.2 g

カリウムソルベート： 0.2 g

蒸留水： 適量（100 mL未満）

上記の製剤は、ドイツ特許DE 3 830 333号でWagnerが開示しているのと同量のフミン酸を含有している。

50

【0105】

〔実施例21〕

2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチシン酸）から調製した抗ウイルス量の合成フミン酸及びトローチ剤用賦形剤を含有する、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染治療用トローチ剤

合成フミン酸： 500mg

メントール： 3.6mg

塩化セチルピリジニウム： 1.4mg

サクランボ香料： 100mg

ブドウ糖： 500mg

ショ糖： 500mg

10

上記の組成に他の賦形剤を加えてもよい。D&C赤色33号やFD&C赤色40号などの着色剤を使用してもよい。塩化セチルピリジニウム以外の保存剤と共に他の香料もトローチ剤に使用してもよい。前述の賦形剤やここに記載されていない他の賦形剤はすべて技術上知られており、トローチ剤ですでに使用されている量で使うことが可能である。実施例21に示した混合物は、ライノウイルス科に属するウイルスによって生じる普通感冒の治療にも有用である。合成フミン酸を含有する鼻内スプレーも普通感冒の治療に特に有用である。

【0106】

医療用具の消毒及び保存に適した、生理学的に認められる賦形剤を含有する製剤を既知の賦形剤及び方法を用いて調製することが可能である。合成フミン酸を含有する製剤を用いて、身体に接触する様々な医療用具を消毒または保存することが可能である。このような医療用具は、身体接触の前または後に消毒または保存して、ウイルス感染を予防することが可能である。合成フミン酸を含有する製剤を用いて、コンタクトレンズや眼内レンズ、歯科用インプラント、移植可能な医療用具（例：心臓弁）、身体に接触する医療器具（例：内視鏡、カテーテル）などを消毒または保存することが可能である。

20

【0107】

本発明の前述の処理及び分離・単離手順に従って調製した合成フミン酸は、ヒトまたは動物の微生物疾患の治療用または予防用製剤に抗菌量で使用可能である。合成フミン酸の抗菌量は、フミン酸の抗菌量に関して本書で引用されている先行技術から、抗菌活性を低下または消失させるのに有用であることが知られている量である。一般に、液体製剤中で抗菌活性を低下または消失させるのに製剤中で有用な抗菌量は、液体製剤1mL当たり合成フミン酸50～2000 μ gである。この濃度範囲は、使用前に溶液に溶解する乾燥合成フミン酸を含有する固形製剤にも適用される。Cronjeらは米国特許4,999,202号に、これよりも高い濃度のフミン酸を含有する殺菌剤または静菌剤を開示している。Cronjeらが使用している濃度はここでも使用可能である。抗菌活性を低下または消失させるのに利用される正確な量は微生物や製剤の種類によって異なるが、技術上既知の従来の抗菌テスト法で測定可能である。

30

本発明の合成フミン酸は、本書で引用されている他の合成フミン酸や天然フミン酸の抗菌活性に匹敵する抗菌活性を有する。したがって、本発明の合成フミン酸は、クリプトスポリジウムや*Candida albicans*、*Enterobacter cloacae*、*Proteus vulgaris*、緑膿菌、ネズミチフス菌、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、化膿連鎖球菌、*Streptococcus mutans*、大腸菌などに対して活性を有するだろう。

40

【0108】

抗菌量の合成フミン酸及び生理学的に認められる賦形剤（最低1剤）から成る様々な混合物が調製可能である。既知の賦形剤及び方法を用いて、静脈内注射剤や筋肉内注射剤、外用剤、経口剤、鼻内スプレー、計量吸入剤、錠剤、座剤などに適した、生理学的に認められる賦形剤を使用した製剤が調製可能である。実施例18～20の外用剤も抗菌活性を有し、抗菌剤を示している。

【0109】

50

既知の賦形剤及び方法を用いて、コンタクトレンズのような医療用具の消毒及び保存に適した、生理学的に認められる賦形剤を含有する製剤を調製することが可能である。合成フミン酸を含有する製剤を用いて、身体に接触する様々な医療用具を消毒または保存することが可能である。身体接触の前または後にこのような医療用具を消毒または保存し、微生物感染を予防することが可能である。合成フミン酸を含有する製剤を用いて、コンタクトレンズや眼内レンズ、歯科用インプラント、移植可能な医療用具(例：心臓弁)、身体に接触する医療器具(例：内視鏡、カテーテル)などを消毒または保存することが可能である。

【0110】

後述の実施例22には、コンタクトレンズの消毒及び保存に適した製剤を示す。実施例22に示す製剤は、1本でレンズの消毒、保存、洗浄、すすぎ、再湿潤に使用可能な多目的の溶液である。本溶液は、米国食品医薬品局(FDA)のコンタクトレンズ溶液用消毒効果ガイドラインで定められた、必要な抗菌消毒活性を有する。本溶液には毒性がなく、目に優しいため、別の食塩水ですすがずに直接目に装着することが可能である。本溶液は、従来のハードコンタクトレンズやソフトコンタクトレンズ、酸素透過性レンズ、シリコンレンズなど、あらゆる種類のコンタクトレンズに使用可能であるが、ヒドロキシエチルメタクリレートやビニルピロリドン、グリセロメタクリレート、メタクリル酸またはメタクリル酸エステル及びその類似化合物のようなモノマーから製造した、一般にヒドロゲルレンズと呼ばれるソフトコンタクトレンズに使用するのが望ましい。また、米国特許5,356,555号に開示されている蛋白分解酵素のように、コンタクトレンズの洗浄に使用されている蛋白分解酵素を、本発明の方法に従って調製した合成フミン酸を含有するコンタクトレンズ用多目的の溶液と配合することも可能である。合成フミン酸を含有する多目的の溶液を蛋白分解酵素と配合する方法や、使用する酵素や賦形剤の量は、本書に引用している米国特許5,356,555号に開示されているものと同じである。一般に、本発明の目的のため、0.0010~0.0100w/v%の合成フミン酸消毒剤を含有する水溶液をコンタクトレンズ用多目的の溶液として使用してもよい。本発明の方法に従って調製した合成フミン酸を含有するコンタクトレンズ用多目的の溶液には、他の消毒剤を含有する先行技術のコンタクトレンズ用多目的の溶液よりも優れた特長がある。合成フミン酸を含有する多目的の溶液は、より快適な装着感をコンタクトレンズ装着者に提供しながら、先行技術の多目的の溶液と同等またはそれ以上の消毒作用を発揮する。これは、コンタクトレンズ用多目的の溶液に現在使用されている先行技術の消毒剤と比較して、合成フミン酸消毒剤の細胞毒性または毒性が本質的に低いことによる。また、コンタクトレンズに適用した際の合成フミン酸の特長は、その中性陰イオンポリマーの性質の結果でもある。現在利用されているコンタクトレンズ用多目的の溶液は、本質的に中性~陰イオンのコンタクトレンズポリマーにかなり高い親和性を有するポリクォータニウム1やポリヘキサメチレンピグアニド(PHMB)などのような陽イオンポリマー消毒剤を含有している。しかし、本発明に従って調製した合成フミン酸は、色の着いた成分である。例えば、濃度0.0025w/v%の溶液は非常に淡い茶褐色を呈する。したがって、美容的理由から、すべての溶液が受け入れられるわけではない。しかし、合成フミン酸は中性~陰イオンポリマーであるため、プラスチック素材に対する親和性が低く、合成フミン酸製剤を適切に製造しても退色しないだろう。

【0111】

【実施例22】

2,5-ジヒドロキシフェニル酢酸(ホモゲンチシン酸)から調製した抗菌量の合成フミン酸を含有する、1本で消毒、保存、洗浄、すすぎ、再湿潤に使用可能なコンタクトレンズ用多目的の溶液

本水溶液の組成は以下のとおりである。

成分	%w/v
合成フミン酸	0.0025
エデト酸ナトリウム(USP)	0.050

10

20

30

40

50

ヒドロキシプロピルメチルセルロース	0.20
ホウ酸 (NF)	0.39
ホウ酸ナトリウム (NF)	0.20
塩化ナトリウム (USP)	0.40
ブルニック F-127	0.10
NaOHまたはHClでのpH調整	7.4

本発明はいくつかの実施例を特に強調しながら十分かつ完全に記載されているが、前述の範囲内で特に記載されていない限り、本発明は付属の請求の範囲内で実施してもよいことを理解しなければならない。

【図面の簡単な説明】

10

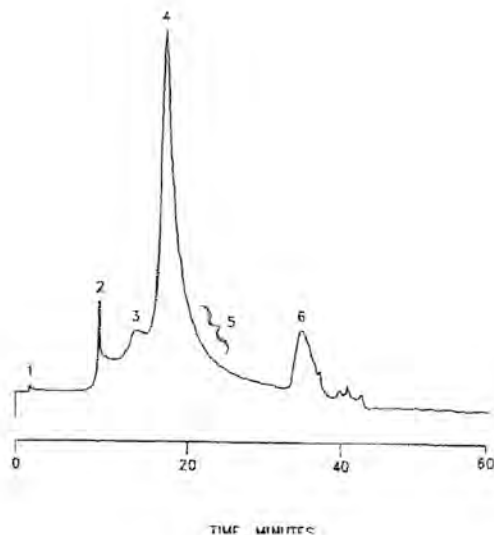
【0112】

【図1】実施例10及び11に記載の、2, 5-ジヒドロキシフェニル酢酸（ホモゲンチジン酸）から得た合成フミン酸の高性能液体クロマトグラフィ（HPLC）記録を示す図

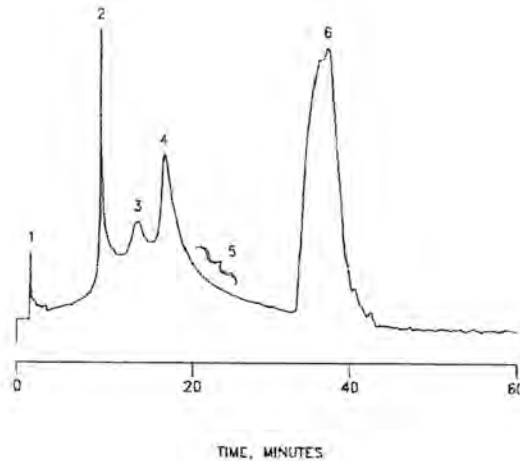
【図2】典型的な市販天然フミン酸の高性能液体クロマトグラフィ（HPLC）記録を示す図

【図3】実施例10及び11に記載のとおり調整した合成フミン酸による処理の6及び8日後に回収したHIV-陽性細胞のp24発現を示す図である。比較のために、透析した天然フミン酸と、透析及び凍結乾燥した天然フミン酸による結果

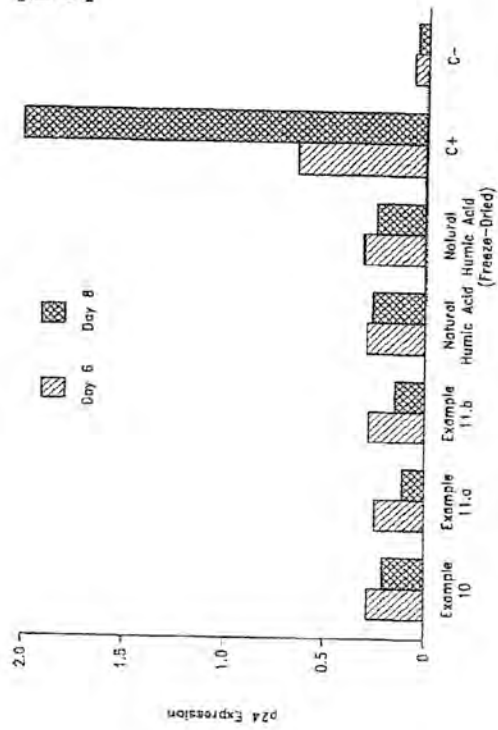
【図1】



【図2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/12
A 6 1 K	9/72	(2006.01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 K	9/72
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/20
C 0 8 G	61/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/22
			C 0 8 G	61/00

- (56)参考文献 特開平5-310767(JP, A)
 特開昭63-238097(JP, A)
 特開平5-294838(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31/775
 A 6 1 K 9/08
 A 6 1 K 9/12
 A 6 1 K 9/20
 A 6 1 K 9/72
 A 6 1 K 35/14
 A 6 1 K 35/16
 C 0 8 G 61/00