



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월12일
(11) 등록번호 10-2705487
(24) 등록일자 2024년09월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08J 3/075 (2006.01) A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)
C08J 3/12 (2006.01) C08J 3/24 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C08J 3/075 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7021270
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월18일
심사청구일자 2021년09월29일
- (85) 번역문제출일자 2020년07월21일
- (65) 공개번호 10-2020-0103758
- (43) 공개일자 2020년09월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/085504
- (87) 국제공개번호 WO 2019/121688
국제공개일자 2019년06월27일
- (30) 우선권주장
17210247.7 2017년12월22일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
EP2011816 B1
W02017114867 A1
KR1020140101018 A
US20170143870 A1
- (73) 특허권자
갈더마 홀딩 소시에떼 아노님
스위스 6300 추그 찰레백 10
- (72) 발명자
윌룬트, 아케
스웨덴 읍살라 752 60 베르타가배겐 8
칼손, 모르간
스웨덴 크니브스타 741 40 그레델비배겐 7
- (74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 52 항

심사관 : 김영국

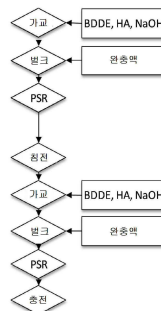
(54) 발명의 명칭 **주사가능한 젤 생성물**

(57) 요약

본 발명은 a) 제1 글리코사미노글리칸(GAG)을 제1 가교제에 의해 가교시켜 젤을 제조하는 단계로서, 가교제 대 이당류 단위의 충전비는 0.15 미만인 단계; b) 단계 a)로부터의 젤 입자를 제조하는 단계; c) 단계 b)의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자를 제2 글리코사미노글리칸(GAG)과 혼합하여 혼합물을 제공하는 단계; d) 단계 c)의

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



혼합물을 제2 가교제로 가교시켜 제2 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs) 사이에 가교를 형성시킴으로써, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자로 된 제1 내부상이, 제2 글리코사미노글리칸(GAG)을 포함하는 제2 외부상의 젤 내에 매립되어 있는 젤을 제공하는 단계, 및 e) 단계 d)로부터의 젤의 주사가능한 입자들으르 제조하는 단계로서, 상기 각 입자는 제1 내부상의 다수의 가교된 GAG 젤 입자들을 함유하는 것인 단계를 포함하는, 주사가능한 젤 생성물의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 주사가능한 젤 생성물, 수성 조성물, 및 예비-충전된 시린지도 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/48 (2013.01)

A61L 27/52 (2013.01)

C08B 37/0063 (2013.01)

C08B 37/0072 (2013.01)

C08J 3/126 (2021.05)

C08J 3/245 (2013.01)

C08L 5/08 (2013.01)

C08J 2305/08 (2013.01)

C08J 2405/08 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

a) 제1 글리코사미노글리칸(GAG)을 제1 가교제에 의해 가교시켜 젤을 제조하는 단계로서, 가교제 대 이당류 단위의 충전비는 0.15 미만인 단계;

b) 젤을 그리드를 통해 밀어 넣음으로써, 단계 a)로부터의 젤의 입자를 제조하는 단계;

c) 단계 b)의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자를 제2 글리코사미노글리칸(GAG)과 혼합하여 혼합물을 제공하는 단계;

d) 단계 c)의 혼합물을 제2 가교제로 가교시켜 제2 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs) 사이에 가교를 형성시킴으로써, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자로 된 제1 내부상이, 제2 글리코사미노글리칸(GAG)을 포함하는 제2 외부상의 젤 내에 매립되어 있는 젤을 제공하는 단계, 및

e) 젤을 그리드를 통해 밀어 넣음으로써, 단계 d)로부터의 젤의 주사용 입자를 제조하는 단계로서, 상기 각 입자는 제1 내부상의 다수의 가교된 GAG 젤 입자들을 함유하는 것인 단계

를 포함하는, 주사용 젤 생성물의 제조 방법으로서,

여기서,

상기 GAG는 히알루론산(HA)이고;

상기 제1 가교제와 제2 가교제는 (i) 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 다관능성 가교제, 및 (ii) 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제로부터 각각 독립적으로 선택되는 것인, 주사용 젤 생성물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 가교제와 제2 가교제는 두 가지 모두 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 스페이서 기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 스페이서 기는 이당류, 삼당류 및 사당류로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 제1 가교제와 제2 가교제는 두 가지 모두 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로부터 선택되는 다관능성 가교제인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 제1 가교제는 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로부터 선택되는 다관능성 가교제인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 제2 가교제는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 스페이서 기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 제2 가교제는 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로부터 선택되는 다관능성 가교제인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 제1 가교제는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 스페이서 기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 단계 d)에서 가교제 대 이당류의 충전비는 단계 a)의 충전비보다 낮은 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 단계 d)에서 가교제 대 이당류 단위의 충전비는 0.05 미만인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 단계 d)의 가교는 제1 내부상 및 제2 외부상의 젤들 간에 가교를 형성하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 단계 c)는 단계 b)의 건조 상태의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자를 건조 상태의 제2 글리코사미노글리칸(GAG)과 혼합하는 것을 포함하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 단계 b)의 입자를 제조하는 단계는 단계 a)의 젤로 만들어진 상기 입자를 침전 및 건조시키는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 단계 c)에서 제공된 혼합물은 단계 b)에서 수득된 GAG 젤 입자를 적어도 50 건조 중량% 함유하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 단계 a) 및/또는 단계 d)의 가교는 에테르 결합을 초래하는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 단계 a) 및/또는 단계 d)의 가교는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서기를 포함하는 가교를 통해 공유적으로 가교된 GAG 분자를 초래하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 적어도 75%의 가교는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서기를 포함하는 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 스페이서기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 스페이서기는 이당류, 삼당류 및 사당류로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 글리코사미노글리칸 분자와 가교 간의 결합의 적어도 90%의 결합은 아마이드 결합인 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 글리코사미노글리칸 분자와 가교 간의 결합 중 에스테르 결합은 5% 미만인 방법.

청구항 25

다수의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자로 된 제1 내부상 및 상기 제1 내부상이 매립되어 있는, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤로 된 제2 외부상을 포함하는 주사용 젤 생성물로서, 여기서:

제2 외부상은 입자 형태이고;

제1 내부상의 젤의 개질도(MoD)는 0.15 이하이며, 및

제2 외부상의 젤의 MoD는 제1 내부상의 젤의 MoD보다 낮으며,

상기 MoD는 반복 GAG 이당류 단위의 총 몰량에 대한 결합된 가교제(들)의 몰량이고, 여기서,

상기 GAG는 히알루론산(HA)이고;

상기 제1 내부상 및 상기 제2 외부상은 (i) 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 다관능성 가교제, 및 (ii) 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제로부터 독립적으로 선택되는 가교제에 의해 독립적으로 가교되는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 제1 내부상 및 상기 제2 외부상은 두 가지 모두 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제에 의해 가교되는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 스페이서 기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인, 주사용 젤 생성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 스페이서 기는 이당류, 삼당류, 및 사당류로 이루어진 군으로부터 선택되는, 주사용 젤 생성물.

청구항 29

제25항에 있어서, 제1 내부상 및 상기 제2 외부상은 두 가지 모두 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 다관능성 가교제에 의해 가교되는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 30

제25항에 있어서, 제1 내부상은 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로부터 선택되는 다관능성 가교제에 의해 가교되는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 제2 외부상은 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제에 의해 가교되는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 스페이서 기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인, 주사용 젤 생성물.

청구항 33

제25항에 있어서, 제2 외부상은 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로부터 선택되는 다관능성 가교제에 의해 가교되는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 제1 내부상은 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서 기를 포함하는 가교제에 의해 가교되는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 스페이서 기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인, 주사용 젤 생성물.

청구항 36

제25항에 있어서, 제2 외부상의 젤의 개질도(MoD)는 0.10 이하인, 주사용 젤 생성물.

청구항 37

제25항에 있어서, 제2 외부상의 팽윤 인자(SwF)는 3.0을 초과하는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 38

제25항에 있어서, 제1 내부상 및 제2 외부상의 젤은 서로 가교되어 있는 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 39

제25항에 있어서, 개질도(MoD)는 제2 외부상전체에서 실질적으로 균일하고 제1 내부상 전체에서 실질적으로 균일한 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 40

제25항에 있어서, 외부 젤 입자 크기는 내부 입자 크기의 적어도 3배 크기인, 주사용 젤 생성물.

청구항 41

제25항에 있어서, 제1 내부상의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG)의 건조 중량 함량은 내부상 및 외부상 중 글리코사미노글리칸들(GAGs)의 총 건조 중량 함량의 적어도 50%인, 주사용 젤 생성물.

청구항 42

제25항에 있어서, 글리코사미노글리칸(GAG)은 히알루론산인, 주사용 젤 생성물.

청구항 43

제25항에 있어서, 가교는 에테르 결합인, 주사용 젤 생성물.

청구항 44

제25항에 있어서, 제1 내부상의 글리코사미노글리칸 분자 및/또는 제2 외부상의 글리코사미노글리칸 분자는 이

당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서기를 포함하는 가교를 통해 공유적으로 가교된 것인, 주사용 젤 생성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 가교의 적어도 75%는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서기를 포함하는, 주사용 젤 생성물.

청구항 46

제44항에 있어서, 스페이서기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기인, 주사용 젤 생성물.

청구항 47

제44항에 있어서, 스페이서기는 이당류, 삼당류 및 사당류로 이루어진 군으로부터 선택되는, 주사용 젤 생성물.

청구항 48

제44항에 있어서, 글리코사미노글리칸 분자와 가교 사이의 결합의 적어도 90%는 아미드 결합인, 주사용 젤 생성물.

청구항 49

제44항에 있어서, 글리코사미노글리칸 분자와 가교 사이의 결합 중 에스테르 결합은 5% 미만인, 주사용 젤 생성물.

청구항 50

제25항 내지 제49항 중 어느 하나의 항에 따른 주사용 젤 생성물 및 선택적으로 완충제를 포함하는 수성 조성물.

청구항 51

제25항 내지 제49항 중 어느 하나의 항에 따른 주사용 젤 생성물로 예비-충전된 다음 멸균된, 예비-충전된 시린지.

청구항 52

제50항에 따른 멸균된 수성 조성물로 예비-충전된, 예비-충전된 시린지.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다당류 젤 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 미용 성형 분야에 사용되기 위한 주사가 가능한 젤 생성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 의약 용도로 가장 널리 사용되는 생물혼화성(biocompatible) 폴리머 중 하나는 히알루론산이다. 이것은 글리코사미노글리칸(GAG) 그룹에 속하는 자연발생적인 다당류이다. 히알루론산(HA) 및 다른 GAG는 다량의 물을 흡수할 수 있는 능력이 있는 음하전된 이질다당류(heteropolysaccharide) 사슬이다. 히알루론산 및 히알루론산으로부터 유래된 생성물은, 예컨대 점조수술(viscosurgery) 과정에서, 그리고 성형용 필러로서, 바이오의약 및 화장품 분야에서 널리 사용된다.

[0003] 주사가 가능한 필러로서 사용되는 경우, 경질의 조밀하게 가교된 재료가 종종 "리프팅 능력(lifting capacity)"이라 칭해지는, 보다 강한 임상 효과를 갖는 것으로 여겨진다. 이들 재료들은 또한 조직에서 수명이 더 긴 것으로 여겨지고 있다. 이와 동시에, 매우 경질인 재료는 때로 이물질 거부와 같은 원치 않는 조직 반응을 일으키는 것으로 의심되는 반면, 연질 재료는 이러한 관점에서 문제를 덜 일으키는 것으로 생각되고 있다.

[0004] EP 466 300 A2에는 제1상이 폴리머의 점탄성 용액의 제2상에 분산되어 있는 팽윤된 폴리머 젤 입자를 포함하는 2-상 젤 슬러리가 개시되어 있다.

[0005] US 2007/0196426 A1에는 점점 덜 가교되는 젤, 즉, 가교(교차결합)의 양이 점진적으로 감소하는 젤에 의해 상호 연결된, 강하게 가교된 다수의 허브를 포함하는 가교된 젤이 개시되어 있다.

[0006] US 2016/0143943 A1에는 중심부에서 표면으로 갈수록 팽윤 능력이 점차 증가하는, 코어-셸 HA 젤 입자가 개시되어 있다.

[0007] EP 02011816 A1에는 약하게 가교된 젤에 결합된 고도로 가교된 젤 입자를 갖는 공동-가교된 주사가능한 젤이 개시되어 있다. 그 목적은 주사 후 이중 작용을 제공하는 것으로; 처음 즉각적인 충전 및 두 번째 단계에서, 약하게 가교된 젤이 조직 내에서 생분해될 경우, 고도로 가교된 입자에 대한 약한 이물질 반응에 이은 섬유아세포 재활성화 현상이 그것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 발명의 개요

[0009] 히알루론산과 같은 글리코사미노글리칸 필러 재료는, 얇은 바늘을 통한 주사가 가능하도록 소립자들로 이루어져 있다. 본 발명자들은 주사를 위해 경질의 필러 재료와 연질의 필러 재료를 단순히 섞는 것만으로는 생체내에서 이중 기능이 제공되지 않을 것임을 발견하였는데, 이는 이들 입자들이 조직 내로 주사시 분산되어 상호간에 어느 정도 분리되기 때문이다. 따라서, 경질 입자와 연질 입자의 믹스로 이루어진 주사가능한 재료를 사용할 경우, 연질 입자와 경질 입자들이 분리되어 서로 다른 위치에 존재하게 되기 때문에, 조직은 주사시 경질의 입자들의 작용을 즉각적으로 받게될 수 있다.

[0010] 본 발명의 한 가지 목적은 필러 재료의 리프팅 능력을 향상시키는 것이다. 이 목적 및 이하의 개시 내용을 참조시 당업자에게 자명할 다른 목적들을 위해, 본 발명은 첫 번째 태양에서, 다수의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들로된 제1 내부상 및 상기 내부상이 매립되어 있는, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤로된 제2 외부상을 포함하는, 주사가능한 젤 생성물을 제공하며;

[0011] 여기서, 제2 외부상은 입자 형태이고;

[0012] 여기서, 제1 내부상의 젤의 개질도(Degree of Modification: MoD)는 0.15 이하이며,

[0013] 여기서 제2 외부상의 젤의 MoD는 제1 내부상의 젤의 MoD 미만이고, 여기서

[0014] MoD는 GAG 이당류 반복 단위의 총 몰 양(total molar amount)에 상대적인, 결합된 가교제(들)의 몰 양이다.

[0015] 본 발명의 제1 태양은 조직 내 입자 분포와 무관하게, 주사가능한 젤 생성물에서, 각 입자가 조직에 대해 연질 재료로 나타나, 조직 반응을 덜 일으킨다는 고찰에 기반한다. 보다 연질인 외부상이 경시적으로 분해됨에 따라, 내부상은 더 낮은 정도로 분해된다. 시간이 지날수록, 외부상은 용해되어 조직 유액에 의해 주사 부위로부터 떨어져 운반될 정도로 분해된다. 초기에 내부 및 보다 경질의 상 재료가 이 시기에 보다 연질인 재료로 분해되기 때문에, 주사 부위에 남아있는 재료는 초기 내부상 재료보다 더 연질이된다. 이것은 매립된 재료로 하여금 조직 내에서 제2의 작용 시기를 제공하게 해주며, 이제는 조직 반응을 줄이도록 경성이 감소된다. 달리 말해서, 외부 젤이 더 연질이 되도록 내부 젤과 외부 젤의 견고성을 선택함으로써, 조직은 외부 연질 젤에 먼저 노출되지만, 이 젤이 천천히 분해됨에 따라 조직은 결국, 외부 젤이 분해되는 동안 연화된, 최초 경질이었던 내부 젤에 노출되게된다. 즉, 내부 젤은 조직이 내부 젤과 직접 접촉하기 전에 생체 내에서 팽윤될 수 있다.

[0016] 또한, 더 긴 기간 동안, 예컨대 팽윤성 또는 견고성과 같은 유사한 특징을 갖는 젤에 조직이 노출되도록 주사가능한 젤 생성물을 제조할 수도 있다. 따라서, 어떤 응용에서는, 외부 젤 분해 후, 노출된 내부 젤이 초기 외부 젤 만큼 연질인 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 또 다른 응용에서는, 노출된 내부 젤이 초기 외부 젤만큼 연질일 필요는 없다. 내부 젤의 노출은 매우 더디고 장기간에 걸쳐 일어나므로, 조직 반응은 경질 젤을 직접 주사한 경우보다 훨씬 약할 수 있다.

[0017] 본 발명은 제2 태양에 따라 다음 단계들:

[0018] a) 제1 글리코사미노글리칸(GAG)을 제1 가교제에 의해 가교시켜 젤을 생성하는 단계로서, 가교제 대 이당류 단

위의 충전비(charging ratio)는 0.15인 단계;

- [0019] b) 단계 a)로부터 얻은 젤의 입자를 제조하는 단계;
- [0020] c) 단계 b)의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자를 제2 글리코사미노글리칸(GAG)과 혼합하여 혼합물을 제공하는 단계;
- [0021] d) 단계 c)의 혼합물을 제2 가교제에 의해 가교시켜 제2 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs) 간에 가교를 생성함으로써, 제2 글리코사미노글리칸(GAG)을 포함하는 제2 외부상의 젤 내에 매립된, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들로부터 제1 내부상을 갖는 젤을 제공하는 단계; 및
- [0022] e) 단계 d)로부터의 젤의 주사가능한 입자들을 제조하는 단계로서, 상기 각 입자들은 제1 내부상의 다수의 가교된 GAG 젤 입자들을 함유하는 것인 단계
- [0023] 를 포함하는, 주사가능한 젤 생성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 제3 태양으로서, 본 발명의 상기 제1 태양에 따른 주사가능한 젤 생성물 및 선택적으로 완충제를 포함하는 수성 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 제4 태양으로서 본 발명은 본 발명의 상기 제1 태양에 따른 주사가능한 젤 생성물로 예비-충전된 다음 멸균되거나 또는 본 발명의 제3 태양에 따른 멸균된 수성 조성물로 예비-충전된, 예비-충전된 시린지를 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0026] 발명의 상세한 설명
- [0027] 본 발명은 제1 태양으로서,
- [0028] 다수의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들로부터 제1 내부상 및 상기 내부상이 매립되어 있는, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤로부터 제2 외부상을 포함하되;
- [0029] 여기서, 제2 외부상은 입자 형태이고;
- [0030] 여기서, 제1 내부상의 젤의 개질도(MoD)는 0.15 이하이며,
- [0031] 여기서 제2 외부상의 젤의 MoD는 제1 내부상의 젤의 MoD 미만이고, 여기서
- [0032] MoD는 GAG 이당류 반복 단위의 총 몰 양에 상대적인, 결합된 가교제(들)의 몰 양인, 주사가능한 젤 생성물을 제공한다.
- [0033] 주사가능한 젤 생성물이라 함은 유동가능하고 시린지를 통해, 예컨대 미용 성형시 일반적으로 요구되는 미세 직경의 바늘을 갖는 시린지를 통하여 주사될 수 있는 젤을 가리킨다. 바늘은 27 게이지 유형일 수 있다. 따라서, 주사가능한 젤 생성물은 시린지 내에 즉시 패키징될 수 있다.
- [0034] 주사가능한 젤 생성물은 또한 예컨대 WO 11086458 A1에 정의된 바와 같이, 응집성이거나 응집성을 나타낼 수 있다.
- [0035] 글리코사미노글리칸(GAG)은 대량의 물을 흡수할 능력이 있는 음하전된 이질다당류이다. GAG는 예를 들어 히알루로난, 콘드로이틴 설페이트, 헤파란 설페이트, 헤파로산, 헤파린, 더마탄 설페이트 및 케라탄 설페이트 등, 황산화되거나 황산화되지 않은 글리코사미노글리칸일 수 있다.
- [0036] 내부상 및/또는 외부상의 젤은 하이드로젤일 수 있다. 즉, 이들은 수-불용성이지만, 액체, 일반적으로 수성 액체에 노출시 GAG 분자의 실질적으로 묽은, 가교된 시스템으로 간주될 수 있다.
- [0037] 제1 내부상의 젤과 제2 외부상의 젤은 가교된다. 따라서, 젤들은 공유 가교, GAG 사슬들의 물리적 엉킴, 및 예를 들어 수소 결합, 반 데어 발스 힘 및 정전기적 상호작용과 같은 다양한 상호작용에 의해 함께 유지되는 GAG 분자들의 연속적 형상의 네트워크를 포함한다.
- [0038] 개질도(MoD)는 가교도의 척도이다. MoD는 몰/몰(mole/mole), 무차원 수(dimensionless number), 또는 몰%로서 표현된다. MoD는 GAG에 결합된 가교제(들)의 양, 즉 GAG 이당류 반복 단위들의 총 몰량에 대한, 결합된 가교제(들)의 몰량이다. MoD는 따라서 GAG가 가교제(들)에 의해 화학적으로 어느 정도 개질되었는지를 반영한다.
- [0039] 가교도를 측정하는 또 다른 양은 충전비, 즉 가교 반응 수행시 반응 용기에 첨가된 가교제의 수와 반응 용기에

첨가된 이당류 단위의 총 수 사이의 비이다.

- [0040] 일례로서, 젤 생성물의 가교도는 제1 내부상 및 제2 외부상 두 가지 모두의 젤 제조시, 충전비가 0.1 미만인 되도록, 종기로는 0.02 이하가 되도록 할 수 있다.
- [0041] 제1 내부상의 젤과 제2 외부상의 젤은 또한 입자 형태, 즉 규칙적 또는 불규칙적인 입자의 형상을 가질 수 있는 단편 형태일 수 있다. 그 크기는 균일하지 않을 수 있다. 즉, 젤 생성물은 상이한 크기를 가진 입자들을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라 외부상의 젤 입자들은 다수의 내부 젤 입자들을 포함할 수 있다. 달리 말하면, 외부 젤의 입자 크기는 내부 젤의 입자 크기보다 더 크다.
- [0042] 제2 외부상의 젤 입자들은 그기가 ≥ 0.1 mm일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 제1 태양은 조밀하게 가교된, 따라서 경질인 재료를 가볍게 가교된, 따라서 연질인 재료 내로 매립함으로써, 조직 내에서 보다 강한 리프팅 능력을 부여할 수 있다는 고찰에 기반한다. 그러나, 본 발명자들은 내부상의 젤의 MoD를 0.15 미만으로 하고 외부상의 젤의 MoD는 이보다도 낮게 할 경우, 주사에 이상적인 젤 조합을 얻을 수 있음을 발견하였다. 본 발명의 젤 생성물은 따라서 주사시 조직 반응이 거의 일어나지 않을 정도로 연질이다.
- [0044] 시간이 지날수록, 연질 재료는 용해되어 조직 유액에 의해 주사 부위로부터 떨어져 운반될 정도로 분해된다. MoD가 0.15 미만이기 때문에, 초기의 경질 내부 재료는 이 기간 동안 보다 연질의 재료로 분해되게 된다. 따라서, 주사 부위에 잔류하는 재료는 초기 경질 재료에 비해 더 연화되게 될 것이다. 이것은 매립된 재료로 하여금, 조직 내에서 작용하는 제2 기간을 제공할 수 있게 해주고, 이제는 조직 반응을 줄이도록 경질도가 감소된다. 달리 말해서, 내부상의 젤의 MoD가 0.15 미만이고 외부상의 젤의 MoD는 이보다도 훨씬 낮음으로 해서, 조직은 장기간에 걸쳐 연질 젤에 노출된다.
- [0045] 가교된 다수의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들로된 제1 내부상 자체가, 추가의 상, 예컨대, 가교된 다수의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들로된 제1 내부상 내에 더 작은 매립 입자들을 포함할 수 있고, 그러한 더 작은 입자들은 다시 그보다 더 작은 매립 입자들을 포함할 수 있으며, 다시 이러한 상황이 반복될 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0046] 구체예들에서, 제1 내부상의 젤의 개질도(MoD)는 0.10 이하, 예컨대 0.05 이하, 예컨대 0.02 이하이다.
- [0047] 구체예들에서, 제2 내부상의 젤의 개질도(MoD)는 0.10 이하이다. 이러한 연질도를 갖는 젤은 주사 후 조직과 접촉하는데 적합할 수 있다.
- [0048] 그러나, 제2 외부상의 MoD는 0.05 초과, 예컨대 0.05를 초과할 수 있으나, 내부상의 젤의 MoD 보다 낮다. 일례로, 제2 외부상의 젤의 MoD는 0.08 내지 0.095일 수 있다. 이러한 MoD를 갖는 젤은 응집성 젤로서 한테 유지되기에 충분히 경질이라는 것이 밝혀졌으나 주사후 여전히 연질인 것으로 감지된다.
- [0049] 가교된 GAG 젤 생성물과 관련된 한 가지 물리적 특성은 젤이 흡수할 수 있는 액체의 부피이며, 젤의 구조적 안정성, 종종 젤 강도 또는 견고성으로 칭해지는, 젤의 구조 안정성과 관련된다. 액체 흡수에 대한 통상적인 표현은 팽윤, 팽윤 용량, 액체 보유 용량, 팽윤도, 팽윤 인자, 최대 액체 흡수 및 최대 팽윤이다. 본 명세서를 통해 팽윤 인자(SwF)라는 용어가 사용된다.
- [0050] 젤이 비-침전 조건에 처해지면, 그의 팽윤 인자, 또는 역으로 그의 최소 농도(C_{min}), 즉 젤 생성물이 완전 팽윤될 때의 GAG 농도를 결정하는 것이 가능하다. 액체를 추가 첨가해도 젤이 더 이상 희석되지는 않는데, 즉, 젤은 유리 분자의 용액과 같이 무한하게 희석될 수 없다. 더 경질인(저-팽윤) 젤은 일반적으로 더 연질인(고-팽윤) 젤보다 생체내에서 더 긴 반감기를 가질 것으로 예측된다.
- [0051] 구체예들에서, 제2 외부상의 젤의 팽윤 인자(SwF)는 3.0 초과, 예컨대 4.0을 초과한다. 이러한 젤은 조직에 대해 더 연질인 것으로 인식될 수 있다.
- [0052] 그러나, 제2 외부상의 젤의 팽윤 인자는 여전히 10.0 미만, 즉 3.0 내지 10.0, 예컨대 3.0 내지 5.0일 수 있다. 이러한 팽윤 인자를 갖는 젤은 연질인 것으로 인식되는데 충분히 연질일 수 있지만, 제조 동안, 예컨대 외부 젤의 입자 크기 감소(PSR) 후와 같이 젤에 매립된 복수의 내부 젤 입자를 보유하기에 충분히 견고할 수 있다. PSR은 젤을 그리드를 통해 밀어 넣음으로써, 젤을 그리드의 관통 구멍에 해당하는 평균 입자 크기를 갖는 입자들로 분해하는 공정이다.

- [0053] 구체예들에서, 제1 내부상 및 제2 외부상의 젤들은 서로 가교된다.
- [0054] 따라서, 내부 젤 입자들을 외부 젤에 분산시키는 것과 대조적으로, 젤들은 서로 가교되어 단일의 응집성 젤이 형성될 수 있다. 내부 젤과 외부 젤 사이의 가교는 외부 젤이 가교되는 동안 수행될 수 있다. 이는 주사 후 외부 젤이 완전히 용해되기 전에 내부 젤 입자가 외부 젤로부터 분리되는 것을 방지할 수 있다는 점에서 유리할 수 있다.
- [0055] 구체예들에서, 개질도(MoD)는 제2 외부상에 걸쳐 실질적으로 균일하고 제1 내부상에 걸쳐 실질적으로 균일하다.
- [0056] 따라서, 가교도는 젤 중심으로부터 바깥쪽으로 볼 때 일정한 것과 같이 두 가지 젤 상 모두에서 실질적으로 균일할 수 있다. 이는 따라서, 젤 내의 가교도가 다양한 젤과 대조적이다.
- [0057] 외부 젤 입자는 적어도 5개의 내부 젤 입자, 예컨대 적어도 10개의 내부 젤 입자, 예컨대 적어도 20개의 내부 젤 입자를 포함할 수 있다.
- [0058] 구체예들에서, 외부 젤 입자 크기는 내부 입자 크기의 적어도 3배이다.
- [0059] 또한, 내부 입자는 0.200 mm 미만의 평균 크기를 가질 수 있다.
- [0060] 구체예들에서, 제 1 내부상의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG)의 건조 중량 함량은 내부상 및 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs)의 총 건조 중량 함량의 적어도 25%, 예컨대 내부상 및 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs)의 총 건조 중량 함량의 적어도 50%이다.
- [0061] 이러한 젤은 생체내에서 초기 연결성을 제공하기에 충분히 부드럽지만 일단 외부 젤이 용해되면 제2 기능을 제공하기에 충분히 높은 내부 입자 함량을 갖는다.
- [0062] 일례로서, 제1 내부상의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG)의 건조 중량 함량은 내부상 및 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs)의 총 건조 중량 함량의 적어도 60%일 수 있다.
- [0063] 또 다른 예로서, 제1 내부상의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG)의 건조 중량 함량은 내부상 및 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs)의 총 건조 중량 함량의 65% 내지 95%일 수 있다.
- [0064] 구체예들에서, 글리코사미노글리칸(GAG)은 히알루론산이다.
- [0065] 달리 언급되지 않는 한, 용어 "히알루론산"은 다양한 사슬 길이 및 전하 상태 뿐만 아니라 다양한 화학적 개질의 히알루론산 또는 히알루로난의 모든 변이체 및 변이체들의 조합을 포함한다. 즉, 이 용어는 또한 히알루론산 나트륨과 같은, 히알루론산의 다양한 히알루로네이트 염도 포괄한다. 예컨대 CH₂OH 기의 COOH로의 산화; 선택적으로 환원 또는 이민 형성 등을 수반하는, 인접(vicinal) 히드록실기의 과요오드산염(periodate) 산화; 예컨대 COOH의 CH₂OH로의 환원과 같은 환원; 셀레이트화; 임의로 새로운 산에 의한 아마이드 형성 또는 탈아민화를 수반하는 탈아미드화; 에스테르화; 예컨대 가교제 또는 카르보디이미드를 사용한, 다양한 화합물에 의한 치환; 단백질, 펩타이드 및 활성 약물 성분과 같은 여러 상이한 분자들의 히알루론산과의 커플링; 및 탈아세틸화와 같은, 히알루론산의 다양한 개질이 이 용어에 의해 포괄된다.
- [0066] 일례로서, 히알루론산은 화학적으로 개질되지 않은 히알루론산 또는 히알루로네이트 염, 좋기로는 평균 분자량이 0.1-10 MDa, 좋기로는 0.8-5 MDa, 더욱 좋기로는 0.8-1.2 MDa 범위인 히알루론산 나트륨일 수 있다. 히알루론산은 비-동물 기원인 것이 좋고, 세균으로부터 얻는 것이 바람직하다.
- [0067] 일부 구체예들에서, 내부젤 및/또는 외부젤의 가교는 디비닐 설펜, 멀티에폭사이드 및 디에폭사이드로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택되는 하나 이상의 다관능성 가교제(들)을 이용하여 수행된다. 특정 구체예에서, 다관능성 가교제(들)은 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE), 1,2-에탄디올 디글리시딜 에테르(EDDE) 및 디에폭시옥탄으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택된다. 특정 구체예에서, 다관능성 가교제는 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르(BDDE)이다.
- [0068] 따라서, 구체예들에서, 가교는 에테르 결합이다.
- [0069] 구체예들에서, 글리코사미노글리칸의 가교는 글리코사미노글리칸 분자의 아마이드 커플링에 의해 달성된다. 아마이드 커플링은 이친핵 또는 다친핵 관능성 크로스링커를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0070] 커플링제와 함께 디아민 또는 멀티아민 관능성 크로스링커를 이용하는 아마이드 커플링은 본 발명에 유용한 가교된 글리코사미노글리칸 분자를 제조하는 매력적인 경로이다.

- [0071] 가교는 비-탄수화물 기반 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커, 예컨대 헥사메틸렌디아민 (HMDA), 또는 탄수화물 기반 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커, 예컨대 디아미노트레할로스(DATH)를 글리코사미노글리칸과 함께 이용하여 달성할 수 있다.
- [0072] 따라서, 적어도 2개의 친핵성 관능기를 포함하는 크로스링커는 예를 들어 비-탄수화물 기반 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커 또는 탄수화물 기반 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커일 수 있다.
- [0073] 이친핵 또는 다친핵 관능성 크로스링커의 바람직한 그룹에는 동중이기능성 또는 이중 이기능성 일차 아민, 히드라진, 히드라지드, 카르바제이트, 세미-카르바지드, 티오세미카르바지드, 티오카르바제이트 및 아미녹시가 포함된다.
- [0074] 이친핵 또는 다친핵 관능성 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당은 키틴으로부터 유래한 키토바이오스와 같은, 친핵 관능성 다당류로부터 유래할 수 있다. 이친핵 또는 다친핵 관능성 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당은 또한 2 이상의 친핵성 관능기의 도입에 의해 개질된 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당일 수도 있다.
- [0075] 탄수화물 기반 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커가 유리할 수 있는데, 이는 이들이 글리코사미노글리칸의 본래 성질에 대한 가교 교란을 최소화하는, 탄수화물형 구조 또는 이의 유도체에 전적으로 기반하는 하이드로젤 생성물을 제공하기 때문이다. 크로스링커 자체는 예컨대 히알루론산과 연관된 구조와 가교시 또는 높은 수분 보유 특성을 갖는 구조와의 가교시, 하이드로젤의 유지 또는 증가된 특성에 기여할 수도 있다.
- [0076] 구체예들에서, 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커는 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 다당류, 즉, 적어도 부분적으로 탈아세틸화되어 유리 아민기를 갖는 다당류를 제공하는, 아세틸화된 다당류이다. 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸은, 단독으로 또는 제2 글리코사미노글리칸과 조합하여 가교될 수 있음으로써, 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용한다.
- [0077] 본 발명의 제1 태양의 구체예들에서, 제1 내부상의 글리코사미노글리칸 분자 및/또는 제2 외부상의 글리코사미노글리칸 분자는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서기를 포함하는 가교를 통해 공유적으로 가교된다.
- [0078] 가교는 일반적으로 i) 스페이서기 및 ii) 크로스링커의 관능기와 GAG 상의 카르복실산기와의 반응에 의해 형성되는 결합기로 구성된다. 스페이서기는 예를 들어, 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기를 포함할 수 있다.
- [0079] 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 스페이서기를 포함하는 크로스링커를 통한 가교는 탄수화물 유형의 구조 또는 이의 유도체에만 전적으로 기반하는 하이드로젤 생성물을 제공하여, 글리코사미노글리칸의 본래 성질에 미치는 가교의 교란을 최소화시켜준다. 바람직하게 이당류, 삼당류, 사당류 또는 올리고당은 그 구조 및 분자량 관점에서 잘 정의된다. 좋기로는 스페이서는 하나의 특이적인 이당류, 삼당류, 사당류 또는 올리고당 구조로부터 선택되는 것이 바람직하다. 좋기로는, 이당류, 삼당류, 사당류 또는 올리고당은 단분산(mono-disperse)되거나 또는 좁은 분자량 분포를 갖는 것이 좋다. 고도로 효율적인 축합 반응과 함께 잘 정의된 이당류, 삼당류, 사당류 또는 올리고당 기반 크로스링커를 사용함으로써 생성물을 제어된 방식으로 조립할 수 있다. 예를 들어 히알루론산과 연관된 구조(예컨대 디아미노 히알루론산 사당류)와의 가교시 또는 높은 수분 보유 특성을 갖는 구조(예컨대 트레할로스)와의 가교시, 크로스링커는 또한 그 자체로 하이드로젤의 유지 또는 증가된 특성에 기여할 수 있다.
- [0080] 일례로서, 가교의 적어도 75%는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서기를 포함할 수 있다.
- [0081] 또한, 스페이서기는 히알루론산 사당류, 히알루론산 육당류, 트레할로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 셀로바이오스 또는 라피노스 잔기일 수 있다.
- [0082] 뿐만 아니라, 스페이서기는 이당류, 삼당류 및 사당류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0083] 본 발명의 제1 태양의 구체예들에서, 글리코사미노글리칸 분자와 가교 사이의 결합의 적어도 90%는 아마이드 결합이다.
- [0084] 또한, 글리코사미노글리칸 분자와 가교 사이의 결합 중 5% 미만은 에스테르 결합일 수 있다.
- [0085] 제1 및/또는 제2 글리코사미노글리칸은 또한 펩타이드 커플링 시약을 이용하여 더욱 가교될 수 있다. 펩타이드 커플링제를 이용하는 가교는 글리코사미노글리칸 분자를 최소한도로 분해하면서 중성 pH에서 가교가 수행될 수

있으므로 다른 많은 일반적인 가교 방법(예컨대 BDDE 가교)에 비해 유리하다.

- [0086] 일부 구체예에서, 펩타이드 커플링 시약은 트리아진계 커플링 시약, 카르보디이미드 커플링 시약, 이미다졸륨-유도된 커플링 시약, Oxyrna 및 COMU로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0087] 일부 구체예에서, 펩타이드 커플링 시약은 트리아진계 커플링 시약이다. 일부 구체예에서, 트리아진계 커플링 시약은 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드(DMTMM) 및 2-클로로-4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진(CDMT)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 트리아진계 커플링 시약은 DMTMM이다.
- [0088] 일부 구체예에서, 펩타이드 커플링 시약은 카르보디이미드 커플링 시약이다. 일부 구체예에서, 카르보디이미드 커플링 시약은 N-히드록시숙신이미드(NHS)와 조합된 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드(EDC)이다.
- [0089] 주사가능한 젤 생성물은 또한 가교되지 않은, 즉 3차원 가교된 GAG 분자 네트워크에 결합되지 않은, GAG 분자를 일부 포함할 수도 있다. 그러나, GAG 분자 주사가능한 젤 생성물의 적어도 50 중량%, 좋기로는 적어도 60 중량%, 더욱 좋기로는 적어도 70 중량%, 및 가장 좋기로는 적어도 80 중량%는 가교된 GAG 분자 네트워크의 일부를 형성하는 것이 바람직하다.
- [0090] 본 발명의 제2 태양에 따라, 다음 단계들, 즉:
- [0091] a) 제1 글리코사미노글리칸(GAG)을 제1 가교제에 의해 가교시켜 젤을 생성하는 단계로서, 가교제 대 이당류 단위의 충전비는 0.15 미만인 단계;
- [0092] b) 단계 a)로부터의 젤의 입자를 제조하는 단계;
- [0093] c) 단계 b)의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자와 제2 글리코사미노글리칸(GAG)을 혼합하여 혼합물을 제공하는 단계;
- [0094] d) 단계 c)의 혼합물을 제2 가교제에 의해 가교시켜 제2 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs) 사이에 가교를 형성함으로써, 제2 글리코사미노글리칸(GAG)으로된 제2 외부상의 젤 내에, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들로된 제1 내부상이 매립되어 있는 젤을 제공하는 단계; 및
- [0095] e) 단계 d)의 젤의 주사가능한 입자들을 제조하는 단계로서, 상기 입자 각각은 제1 내부상의 가교된 GAG 젤 입자들을 다수 함유하는 것인 단계
- [0096] 를 포함하는, 주사가능한 젤 생성물의 제조 방법이 제공된다.
- [0097] 본 발명의 제2 태양과 관련하여 사용된 용어 및 정의는 전술한 제1 태양에서 논의된 것과 같다.
- [0098] 구체예들에서, 단계 e)에서 생성된 주사가능한 입자들은 전술한 제1 태양의 임의의 구체예들과 관련하여 개시된 것과 같은 젤 생성물이다.
- [0099] 제2 태양의 방법은 조합 젤을 생성하기 위한, 즉, 조밀하게 가교되고 따라서 경질인 재료를, 가볍게 가교되고 따라서 연질인 재료 내로 매립하기 위한 간편한 방법이라는 점에서 유리하다. 이러한 조합 젤은 조직 내에서 보다 강한 리프팅 능력을 부여할 수 있다. 본 발명자들은 단계 a)에서 즉 "내부" GAG 젤 입자 제조시 충전비를 0.15 미만으로 설정하고, 단계 d)에서, 즉 외부 매트릭스에 내부 GAG 젤 입자들을 매립시 충전비를 더욱 낮게 설정함으로써, 조직 내에서 더욱 강력한 리프팅 능력을 부여할 수 있는 젤 생성물을 용이하게 형성할 수 있음을 발견하였다.
- [0100] 또한, 본 발명의 제2 태양의 방법은 가교제를 소량 사용함에 따라, 주사가능한 젤-생성물을 제조하기 위한 효과적인 공정을 가능케한다는 점에서 유리하다.
- [0101] 이미 가교된 입자들을 후에 가교되는 젤에 매립시키는 단계는 임의의 횟수만큼, 예컨대 적어도 2회 또는 적어도 3회 반복할 수 있다. 따라서, 단계 d)는 제공된 젤의 입자를 제조하는 단계를 더 포함할 수 있고 이들 제조된 입자들은 이들이 예컨대 제3 글리코사미노글리칸(GAG)과 혼합되어 혼합물을 제공하게 되는 반복 단계 c)에서 이용될 수 있으며 상기 혼합물은 이어서 반복 단계 d)에서 가교되어 젤을 형성할 수 있다. 이 젤의 입자들은 다시 추가의 GAGs와 혼합되고 이 과정은 더 반복가능하다.
- [0102] 그러므로, 단계 c) 및 d)는 임의의 횟수만큼 반복될 수 있다. 가교 단계에서 사용되는 가교제는 전술한 본 발명

의 제1 태양에서 논의된 바와 같다.

- [0103] 일례로서, 단계 a) 및/또는 단계 b)에서의 가교는 에테르 결합이 초래될 수 있다.
- [0104] 또 다른 예로서, 단계 a) 및/또는 단계 b)에서의 가교는 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당으로 이루어진 군으로부터 선택된 스페이서기를 포함하는 가교를 통해 공유적으로 가교되는 GAG 분자를 초래할 수 있다.
- [0105] 단계 d)의 가교는 단계 a)의 가교와 동일한 가교 조건을 이용하여 수행가능하다. 단계 d)에서의 충전비는 단계 a)의 그것과 동일 또는 상이할 수 있다.
- [0106] 또한, 단계 d)의 가교는 단계 a)에서의 가교제와 동일한 가교제를 이용하거나 또는 단계 a)에서의 가교제와 상이한 가교제를 사용하여 수행될 수 있다. 결국 제1 및 제2 가교제는 동일 또는 상이할 수 있다.
- [0107] 뿐만 아니라, 단계 a) 및/또는 d)의 가교는 제1 및/또는 외부 젤에서의 가교 균일성을 증가시키기 위해 가교제를 초기 첨가함으로써 수행될 수 있다.
- [0108] 단계 a)의 충전비는 0.10 미만, 예컨대, 0.05 미만이다.
- [0109] 일례로서, 단계 a)의 충전비는 0.002-0.10, 예컨대 0.005-0.10, 예컨대 0.005-0.05, 예컨대 0.005-0.03, 예컨대 0.01-0.3이다.
- [0110] 구체예들에서, 단계 d)에서 가교제 대 이당류 단위의 충전비는 0.10 미만, 예컨대 0.05 미만이다. 본 발명자들은 외부 젤 매트릭스 제조시 이러한 낮은 충전비로도 현장(in situ)에서의 적절한 분해 특징을 갖는 젤 생성물을 여전히 제공할 수 있음을 발견하였다.
- [0111] 구체예들에서, 단계 d)에서 가교제 대 이당류 단위의 충전비는 단계 a)에서의 충전비 미만이다.
- [0112] 구체예들에서, 단계 d)의 가교는 제1 내부상 및 제2 외부상의 젤들 사이에 가교를 형성하는 것을 더 포함한다. 따라서, 단계 d)에서 사용된 제2 가교제는 매립된 젤 입자들에 외부 젤 매트릭스를 가교시키는 것을 더 도울 수 있고, 따라서 단계 e)에서 주사가능한 입자들의 제조시, 매립된 젤 입자들을 젤 내에 유지하는 것을 더울 수 있다.
- [0113] 구체예들에서, 단계 c)는 단계 b)의 건조한 상태의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들을 건조한 상태의 제2 글리코사미노글리칸(GAG)과 혼합하는 것을 포함한다. 건조 상태의 젤 입자들은 예를 들어 분말 형태 또는 건조한 영킨 스트링 형태일 수 있다. 건조 상태로 혼합하는 것은 제1 및 제2 GAGs 사이에 우수한 혼합을 제공한다는 점에서 유리하다. 즉, 제1 내부상의 젤 입자들을 외부상에 균질하게 분포시킨다.
- [0114] 그러나, 단계 c)는 단계 b)의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들을 먼저 용해시키고 이 용액을 제2 글리코사미노글리칸(GAG)를 포함하는 용액과 혼합하는 것을 포함할 수 있다.
- [0115] 구체예들에서, 단계 b)의 입자들을 제조하는 단계는 단계 a)의 젤로 제조된 상기 입자들을 침전 및 건조시키는 것을 더 포함한다.
- [0116] 내부 젤 입자들의 침전은 예컨대 미반응 가교제와 같은, 몇몇 부산물들을 감소시키기 위한 제1 내부상의 젤 입자들의 세척 가능성을 더 증가시킨다는 점에서 유리하다. 침전은 그 자체로 세척 단계 역할을 할 수 있다: 즉 원치 않는 부산물들이 실제 침전이 일어나는 동안 젤 입자들로부터 분리될 수 있다.
- [0117] 또한, 내부 젤 입자들의 침전은 내부 젤 입자들을, 제2 가교 단계, 즉 단계 d) 동안 가교제에 더 접근가능하게 만들 수 있다. 이것은 제2 가교 단계에서, 가교제를 더 적은 양으로 사용할 수 있음을 의미한다. 즉, 침전이 가교제의 유용성을 증가시킴에 따라 전체 방법의 효율성도 증가된다.
- [0118] 또한, 침전된 분말은 보관이 가능하므로, 단계 d)의 제2 가교는 침전 직후 수행될 필요가 없다. 따라서, 단계 c)는 침전으로부터 적어도 1시간 후, 예컨대 침전으로부터 적어도 5시간, 예컨대 적어도 10시간, 예컨대 적어도 24시간, 예컨대 적어도 48시간 후에 수행될 수 있다. 따라서, 단계 a)의 젤로 만들어진 입자들을 침전 및 건조시키는 단계는 공정의 유연성을 증가시켜 준다.
- [0119] 결국, 침전 단계는 젤 입자들의 세정을 허용한다는 점에서 유리하며, 이 공정은 2개의 가교 단계가 보다 확실히 구분되어 분할될 수 있다는 점에서 보다 유연하며 분리된 가교 단계와 공정의 전반적인 효율성이 가교제를 더 감소된 양으로 사용함에 따라 증가된다.
- [0120] 제2 태양의 구체예에서, 단계 c)의 혼합물은 단계 b)에서 수득된 GAG 젤 입자의 적어도 45 건조 중량%, 예컨대

단계 b)에서 수득된 GAG 젤 입자의 적어도 50 건조 중량%를 함유한다. 따라서, 제1 내부상의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG)의 건조 중량 함량은 단계 c)에서 글리코사미노글리칸들(GAGs)의 총 건조 중량 함량의 적어도 50%일 수 있다.

- [0121] 일례로서, 단계 c)의 혼합물은 단계 b)에서 수득된 GAG 젤 입자들을 적어도 60 건조 중량% 함유할 수 있다.
- [0122] 또 다른 예로서, 단계 c)의 혼합물은 단계 b)에서 수득된 GAG 젤 입자들을 적어도 65 내지 95 건조 중량% 함유할 수 있다. 따라서, 제1 내부상의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG)의 건조 중량 함량은 내부상과 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs)들의 총 건조 중량의 65% 내지 95%일 수 있다.
- [0123] 본 발명의 제3 태양에서, 상기 제1 태양에 따른 주사가능한 젤 생성물과 선택적으로 완충제를 포함하는 수성 조성물이 제공된다.
- [0124] 수성 조성물은 주사에 적합할 수 있다. 수성 조성물은 일반적으로 생리식염수 완충액을 함유할 수 있다. 이 조성물은 또한 다른 적절한 첨가제, 예를 들어 국소마취제(예컨대 리도카인 염산염), 소염 약물, 항생제 및 다른 적절한 보충 의약, 예를 들어 뼈 성장 인자 또는 세포를 더 포함할 수 있다.
- [0125] 주사가능한 젤 생성물 또는 수성 조성물의 투여는 표준 커놀라 및 적절한 크기의 바늘로부터의 주사를 통해 또는 예컨대 필름 투여의 경우 외과용 삽입체를 통해 적절한 방식으로 수행가능하다. 턱, 뺨 또는 얼굴 또는 신체의 다른 곳과 같은 연조직 확대가 필요한 경우에 투여가 수행된다.
- [0126] 그러므로, 본 발명의 제4 태양으로서, 전술한 제1 태양의 임의의 구체예에 따른 멸균된 주사가능한 젤 생성물 또는 전술한 제3 태양에 따른 멸균된 수성 조성물이 예비-충진된(pre-filled), 예비-충진된 시린지가 제공된다.
- [0127] 젤 생성물은 시린지에 침전된 형태로 유지되어 주사 전에 또는 주사 후에 신체에서 침전되지 않은 형태로 될 수 있다.
- [0128] 젤 생성물은 추가로 오토클레이브될 수 있는데, 이는 최종 생성물을 멸균하는 가장 편리한 방법이기 때문이다. 이를 통해 멸균되고 주사가능한 젤 생성물을 제조할 수 있다.
- [0129] 특정 구체예에서, 전술한 제1 및 제3 태양에 따른 주사가능한 젤 생성물 또는 수성 조성물은 의료 또는 수술방법에서 의약 또는 의료 장치로서 유용하다.
- [0130] 추가 태양에서, 전술한 제1 태양에 따른 주사가능한 젤 생성물 또는 제3 태양에 따른 수성 조성물을 미용 또는 의학적 성형수술에 사용하기 위한 용도가 제공된다. 달리 설명하면, 미용 또는 의학적 외과수술에 사용하기 위한 주사가능한 젤 생성물 또는 an 수성 조성물이 제공된다.
- [0131] 일부 구체예들에서, 상기 용도는 피부 충전(dermal filling) 및 신체 윤곽 성형(body countouring)으로부터 선택되는 미용 성형술에 있다. 또 다른 일부 구체예에서, 상기 용도는 피부 충전, 신체 윤곽성형, 조직 유착 방지, 채널 형성, 요실금 치료, 및 정형외과적 응용으로부터 선택된 의학적 외과수술에서의 및/또는 이러한 치료시 의약으로서의 용도이다.
- [0132] 일 태양에 따라, 전술한 제1 태양에 따른 주사가능한 젤 생성물 또는 제3 태양에 따른 수성 조성물을 이를 필요로 하는 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 미용 또는 의학적 외과수술을 받는 대상자의 치료 방법이 제공된다.
- [0133] 특정 구체예에서, 대상자는 피부 충전 및 신체 윤곽성형으로 이루어진 미용 수술을 받는 자이다. 또 다른 특정 구체예에서 대상자는 피부 충전, 신체 윤곽성형, 조직 유착 방지, 채널 형성, 요실금 치료, 및 정형외과적 응용으로부터 선택된 상태에 대한 의학적 외과수술 또는 의학적 치료를 받는 자이다.
- [0134] 글리코사미노글리칸은 가교된 젤에서, 예컨대 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸이 사용될 때, 그 자체로 크로스링커로서 작용할 수 있다. 이러한 경우, 글리코사미노글리칸 자체가 아닌 다른 가교제를 사용할 때 관련된 특성인 개질도(MoD)는, 글리코사미노글리칸의 탈아세틸화도에 상응할 수 있다. 따라서, 이전 태양과 관련하여 논의된 전술한 모든 MoD의 모든 구체예와 실시예들 역시 글리코사미노글리칸 자체가 크로스링커로서 작용될 때, 그러나 글리코사미노글리칸의 탈아세틸화도로서 관련될 수 있다.
- [0135] 그러므로, 본 발명의 일반적인 태양으로서, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤의 제2 외부상에 매립된 다수의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들의 제1 내부성을 포함하는 주사가능한 젤 생성물이 제공되며; 여기서
- [0136] 제2 외부상은 입자 형태이고;

- [0137] 제1 내부상의 젤의 반복 GAG 이당류 단위의 총 몰량에 대한 가교의 최대량은 0.15 이하이며, 및
- [0138] 제2 외부상의 젤의 반복 GAG 이당류 단위의 총 몰량에 대한 가교의 최대량은 제1 내부상의 젤의 반복 GAG 이당류 단위의 총 몰량에 대한 가교의 최대량 미만이다.
- [0139] 반복 GAG 이당류 단위의 총 몰량에 대한 가교의 최대량은 예를 들어 GAG 자체가 아닌 별도 가교체가 가교에 사용된 경우 MoD일 수 있고, 또는 GAG 자체가 크로스링커로서 작용한 경우 탈아세틸화도일 수 있다. 또한, 글리코사미노글리칸 자체를 가교된 젤에서 크로스링커로서 사용한 경우, 후술하는 별도 태양이 타당하게될 수 있다. 이들 별도 태양과 관련하여 사용되는 용어 및 정의는 전술한 이전 태양과 관련하여 논의된 것과 같다.
- [0140] 그러므로, 본 발명의 별도 태양으로서, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤의 제2 외부상에 매립된 다수의 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자로된 제1 내부상을 포함하는 주사가능한 젤 생성물이 제공되며, 여기서:
- [0141] 제2 외부상은 입자 형태이고
- [0142] 제1 내부상의 글리코사미노글리칸(GAG) 및/또는 제2 외부상의 글리코사미노글리칸(GAG)은 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용하는 가교를 포함한다.
- [0143] 구체예들에서, 제1 내부상의 젤의 탈아세틸화도는 0.15 이하이고,
- [0144] 여기서 제2 외부상의 젤의 탈아세틸화도는 제1 내부상의 젤의 탈아세틸화도 보다 낮다.
- [0145] 일 구체예에서 오직 제1 내부상의 글리코사미노글리칸(GAG) 만이, 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용하는 가교를 포함한다.
- [0146] 일 구체예에서, 오직 제2 외부상의 글리코사미노글리칸(GAG) 만이, 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용하는 가교를 포함한다.
- [0148] 일 구체예에서, 제1 내부상의 글리코사미노글리칸(GAG) 및 제2 외부상의 글리코사미노글리칸(GAG)은 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용하는 가교를 포함한다.
- [0149] 일례로서, 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용할 수 있다.
- [0150] 그러므로, 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용하는 글리코사미노글리칸 자체는 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸, 즉, 적어도 부분적으로 탈아세틸화되어 유리 아민기를 갖는 글리코사미노글리칸을 제공하는 아세틸화된 글리코사미노글리칸일 수 있다. 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸은 단독으로 또는 제2 글리코사미노글리칸과 조합하여 가교될 수 있으므로, 이에 따라 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용한다.
- [0151] 본 발명의 또 다른 태양에서, 다음 단계들, 즉:
- [0152] a) 제1 글리코사미노글리칸(GAG)을 가교하여 젤을 생성하는 단계;
- [0153] b) 단계 a)로부터의 젤의 입자들을 제조하는 단계;
- [0154] c) 단계 b)의 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자들을 제2 글리코사미노글리칸(GAG)과 혼합하여 혼합물을 제공하는 단계;
- [0155] d) 단계 c)의 혼합물을 가교시켜 제2 외부상의 글리코사미노글리칸들(GAGs) 간에 가교를 형성함으로써, 가교된 글리코사미노글리칸(GAG) 젤 입자로된 제1 내부상이, 제2 글리코사미노글리칸(GAG)을 포함하는 제2 외부상의 젤 내에 매립되어 있는 젤을 제공하는 단계; 및
- [0156] e) 단계 d)로부터의 젤의 주사가능한 입자들을 제조하는 단계로서, 상기 각 입자는 제1 내부상의 다수의 가교된 GAG 젤 입자들을 함유하는 것인 단계
- [0157] 를 포함하는, 주사가능한 젤 생성물의 제조 방법이 제공된다.
- [0158] 단계 a) 및/또는 단계 d)의 가교는 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸을 단독으로, 또는 제2 글리코사미노글리칸과 조합 사용함으로써 달성되며, 이에 의해 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸 자체가 이친핵성 또는 다친핵성 크로스링커로서 작용한다.
- [0159] 단계 a)에서 제1 글리코사미노글리칸의 탈아세틸화도는 0.15 미만일 수 있다. 단계 d)에서 제2 글리코사미노글리칸의 탈아세틸화도는 제1 글리코사미노글리칸의 탈아세틸화도보다 낮을 수 있다.

- [0160] 본 명세서에서 글리코사미노글리칸과 관련하여 "적어도 부분적으로 탈아세틸화된"이라는 용어는, N-아세틸기를 포함하는 글리코사미노글리칸으로서, 여기서 N-아세틸기들의 적어도 일부가 절단되어, 글리코사미노글리칸 내에 유리 아민기가 형성되게 된 것을 의미한다. 본 명세서에서 "적어도 부분적으로 탈아세틸화된"이라는 의미는, 글리코사미노글리칸의 N-아세틸기의 상당 부분, 특히 글리코사미노글리칸의 N-아세틸기의 적어도 1%, 좋기로는 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%가 유리 아민 기로 전환되었음을 가리킨다. 더욱 좋기로는, 글리코사미노글리칸의 N-아세틸기의 적어도 3%가 유리 아민기로 전환된 것이 바람직하다.
- [0161] 일부 구체예에서, 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸은 아세틸화도가 99% 미만, 좋기로는 98% 미만, 97% 미만, 97% 미만, 96% 미만, 95% 미만, 94% 또는 93% 미만일 수 있다.
- [0162] 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸의 가교는 펩타이드 커플링 시약과 같은 커플링제의 도움을 받아 수행될 수 있다.
- [0163] 일부 구체예에서, 펩타이드 커플링 시약은 트리아진계 커플링 시약, 카르보디이미드 커플링 시약, 이미다졸륨-유도된 커플링 시약, Oxyrna 및 COMU로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0164] 일부 구체예에서, 펩타이드 커플링 시약은 트리아진계 커플링 시약이다. 일부 구체예에서, 트리아진계 커플링 시약은 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드(DMTMM) 및 2-클로로-4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진(CDMT)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 트리아진계 커플링 시약은 DMTMM이다
- [0165] 일부 구체예에서, 펩타이드 커플링 시약은 카르보디이미드 커플링 시약이다. 일부 구체예에서, 카르보디이미드 커플링 시약은 N-히드록시숙신이미드 (NHS)과 조합된 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드(EDC)이다.
- [0166] 결국, 단계 a)는 다음 하부 단계들, 즉:
- [0167] i) 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸 및 선택적으로 추가의 글리코사미노글리칸을 포함하는 용액을 제공하는 단계;
- [0168] ii) 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸 및/또는 선택적인 추가의 글리코사미노글리칸 상의 카르복실기를 커플링제로 활성화시켜, 활성화된 글리코사미노글리칸을 제공하는 단계
- [0169] iii) 활성화된 글리코사미노글리칸을, 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸의 아미노기를 이용하여 그들의 활성화된 카르복실기를 통해 가교시킴으로써 아미드 결합에 의해 가교된 글리코사미노글리칸의 젤을 제공하는 단계
- [0170] 를 더 포함할 수 있다.
- [0171] 또 다른 예로서, 제2 글리코사미노글리칸은 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸일 수 있고 단계 d)는 다음의 하부 단계들, 즉;
- [0172] i) 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 제2 글리코사미노글리칸의 카르복실기들을 커플링제로 활성화시켜, 활성화된 글리코사미노글리칸을 형성하는 단계;
- [0173] ii) 활성화된 글리코사미노글리칸을, 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸의 아미노기를 이용하여 그들의 활성화된 카르복실기를 통해 가교시킴으로써 아미드 결합에 의해 가교된 제2글리코사미노글리칸(GAG)를 포함하는 제2 외부상을 제공하는 단계
- [0174] 를 더 포함할 수 있다.
- [0175] 또 다른 구체예에서, 단계 a) 및/또는 단계 d)의 가교된 GAG는:
- [0176] 1) 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 GAG를, 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 GAGs 내에 존재하는 유리 아민 및 카르복실산기를 이용하여 커플링제 존재 하에 부분적으로 탈아세틸화된 GAG로 가교시키거나; 또는
- [0177] 2) 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 GAG를, 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 GAG 내에 존재하는 아민기 및 GAG 내에 존재하는 카르복실산기를 이용하여 커플링제 존재 하에 비-탈아세틸화된 GAG로 가교시킴으로써 취득된다.
- [0178] 구체예들에서, 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸은 아세틸화도가 99% 이하, 좋기로는 98% 이하, 좋기로는 97% 이하, 좋기로는 96% 이하, 좋기로는 95% 이하, 좋기로는 94% 이하, 좋기로는 93% 이하이고, 중량 평균 분자량은 0.1 MDa 이하, 좋기로는 0.5 MDa 이하이다.

- [0179] 일부 구체예에서, 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸은:
- [0180] a1) 아세틸기를 포함하는 글리코사미노글리칸을 제공하는 단계;
- [0181] a2) 아세틸기를 포함하는 글리코사미노글리칸을 히드록실아민(NH₂OH) 또는 그의 염과 100℃ 이하의 온도에서 2-200시간 동안 반응시킴으로써 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸을 형성하는 단계; 및
- [0182] a3) 적어도 부분적으로 탈아세틸화된 글리코사미노글리칸을 회수하는 단계
- [0183] 를 포함하는, 글리코사미노글리칸의 적어도 부분적인 탈아세틸화 방법에 의해 수득된다.

도면의 간단한 설명

- [0184] 도 1은 본 발명의 방법의 일 구체예를 그래프적으로 나타낸 개략도이다. PSR = 입자 크기 감소
- 도 2는 분해 시험 결과를 나타낸다.
- 도 3은 분해 시험 결과를 나타낸다.
- 도 4는 매립된 젤 입자들이 있는 젤 입자들의 10x 배율 사진이다.
- 도 5는 실시예 6에서 수득된 젤 입자들의 10x 배율의 현미경 이미지이다.
- 도 6은 실시예 9에서 수득된 젤 입자들의 현미경 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0185] 실험예

[0186] 다음의 비제한적인 예들은 본 발명을 더욱 설명한다. 이하의 예에서, 사용된 GAG는 히알루론산, HA로 표시되고 히알루론산 나트륨을 지칭한다.

[0187] 분석 시험 방법

[0188] 젤 함량(GeIC)

[0189] GeIC는 젤 형태로 결합된 총 HA의 비율을 %로 나타낸 것이다. 젤 함량은 0.22 μm 필터를 통과하지 못하는 샘플 내 HA의 양으로서 정의된다. GeIC는 여액 중에 수집된 HA의 양으로부터 계산되며 젤 샘플 중 HA의 총량의 백분율로서 주어진다

[0190] MoD(개질도)

[0191] MoD는 반복 HA 이당류 단위의 총 수에 대한 결합된 가교제(들)의 몰량을 설명한다. 이 척도는 모노-링크 및 실질적으로 가교된 가교제(들)을 구별하지 않는다. 즉 하나 이상의 공유 결합을 통해 HA에 결합된 모든 가교제(들)이 포함된다. 예를 들어, BDDE와 가교된 HA 젤의 MoD가 1%라는 것은 HA 젤 중 100개의 이당류 단위 당 BDDE의 결합된(모노-링크되거나 가교된) 분자가 1개 존재함을 의미한다.

[0192] MoD는 효소적으로 분해된 젤 생성물에 대한 NMR 분광법을 이용하여 결정될 수 있다. 가용성, HA, 잔류(비-결합) 가교제(들) 및 이의 유도체들은 0.22 μm 필터 상에서 여과에 의해 젤 분해되기 전에 세척된다. 젤 생성물은 아르트로박터 아우레센스(*Arthrobacter aurescens*)로부터의 콘드로이티나제 A를 이용하는 효소 처리에 의해 37℃에서 분해된다. 분해된 젤 생성물은 표준 5 mm 프로브가 장착된 400 MHz 분광기 상에서 1차원 ¹H NMR 스펙트럼을 기록함으로써 NMR 분광법으로 처리된다.

[0193] NMR 스펙트럼은 연결된 BDDE 분자 내 4개의 양성자에서 유래한 d_H 1.6 ppm에서의 신호와 HA 이당류의 N- 아세틸 글루코사민 잔기 상의 CH₃기 내 3개의 양성자에서 유래한 d_H 2.0 ppm에서의 신호를 적분함으로써 평가할 수 있다. 이들 두 신호에 대한 적분 사이의 비는 각 신호를 담당하는 양성자의 수를 보정한 후 결합된 BDDE와 이당류의 몰량 사이의 비에 비례하며, 이에 따라 MoD가 제공된다.

[0194] $MoD = (n_{\text{결합된 가교제}}) / (n_{\text{이당류 단위}})$

[0195] 충전비(Charging ratio)

[0196] 가교도를 측정하는 또 다른 양은 충전비, 즉 가교 반응 수행시 반응 용기에 첨가된 가교제의 수와 반응 용기에 첨가된 이당류 단위의 총 수 사이의 비이다. 충전비는 MoD와 동일하지 않을 수 있는데, 이는 가교 반응이 불완전하기 때문, 즉 모든 크로스링커들이 가교를 형성하는 반응을 수행하지 않았을 수 있기 때문이다.

[0197] **팽윤 인자(SwF)**

[0198] 가교 후 젤 네트워크의 강도 또는 밀도는 예컨대 젤로 하여금 평형에 이를 때까지 물 또는 염수를 흡수케 함으로써 평가/결정될 수 있다. 젤 분해 동안의 사슬 파괴 결과, 네트워크는 점점 약해지고 성글어지는데, 이는 증가하는 팽윤 인자(SwF)에 의해 감지될 수 있다. SwF는 다음 프로토콜에 따라 측정된다: 약 1 g의 젤 생성물을 칭량하여 측정 글래스에 넣는다. 염수를 첨가하고, 젤을 완전히 분산시켜 평형에 이를 때까지 물을 흡수시킨다. 침강 후, 포화된 젤의 부피를 판독한다. 최종 부피 대 최초 부피의 비를 팽윤 인자(SwF)라 칭한다

[0199]

[0200] **실시예 1 - 복합 젤을 제조하기 위한 일반 공정 개관**

[0201] BDDE와 가교된 주사가능한 젤 생성물을 제조하는 방법의 일 구체예를 도 1에 그래프적으로 개략적으로 나타내었다. 이 공정에서, 벌크는 제1 입자 크기 감소 단계(PSR) 후에 침전 및 건조된다. 그 후 건조하고 가교된 젤 분말이 2차 가교를 위해 HA, BDDE 및 NaOH와 혼합되며, 2차 가교시 이미 가교된 젤 입자들이 제2 젤 재료 내로 매립된다. 제2 재료는 이어서 보통 공정에서와 같이 동일한 공정 단계를 거치게된다. 제1 PSR로부터의 입자들은 제2 PSR로부터의 입자들보다 작아서, 내부 젤이 외부 젤에 포함될 여지가 있다.

[0202] 제1 및 제2 가교는 일반적으로 10-75°C, 예컨대 10-40°C, 예컨대 10-35°C 또는 10-35°C의 온도에서 수행되지만, 이 단계는 15-35°C, 예컨대 15-30°C, 및 특히 실온, 예컨대 20-25°C에서 수행되는 것이 좋다. 바람직한 온도 범위는 10-50°C, 예컨대 18-40°C이다.

[0203] 반응 온도는 2-40 시간 범위, 예컨대 4-36 시간이 적합하다. 반응 시간이 2 시간보다 길면 재생산성에 유용하며, 특히 보다 대규모인 경우 유용하다. 반응 시간이 40 시간을 초과하면 젤 강도가 낮은 젤이 생성되거나 또는 젤이 완전히 과열될 수 있다. 반응 시간은 종기로는 8-30 시간, 예컨대 12-24 시간, 예컨대 16-24 시간이 바람직하다.

[0204] 일례로서, 가교 단계는 15-35°C에서 2-40 시간, 예컨대 실온에서 16-24 시간 수행될 수 있다.

[0205] 도 4는 본 발명의 방법으로 수득된 젤 입자들의 10x 배율의 현미경 이미지로서, 큰 입자 내에 작은 입자들이 매립되어 있다.

[0206] **실시예 2 - 단일 성분 젤의 제조**

[0207] 단일 성분 젤을 다음과 같이 제조하였다: 100 g HA (Mw 1MDa)를 200 g NaOH 3% w/w 및 1.8 g BDDE와 0.036의 충전비로 혼합 및 반응시켰다. 가교 후, 젤을 중화하고 열처리하여 모든 잔류 크로스링커들을 불활성화시켰다. 80 µm 메쉬를 이용하여 입자 크기 감소(PSR)을 수행하였다. 젤을 EtOH에서 침전시켜 젤 분말을 얻고 이를 세척 및 건조시켰다.

[0208] **실시예 3 - 단일 성분 젤의 제조**

[0209] 30 g HA, 73.5 g NaOH 2.5% w/w 및 0.22g BDDE를 이용한 것을 제외하고 실시예 2처럼 수행하여 충전비 0.015를 얻었다.

[0210] **실시예 4 - 2 성분 젤의 제조**

[0211] 2 성분 젤을 다음과 같이 제조하였다: 실시예 2로부터 얻은 5 g의 젤 분말을, 5 g HA (mw 1MDa), 45.5 g NaOH 1.33% w/w 및 90 mg BDDE와 혼합 및 반응시켜 충전비 0.036가 되도록 하였다. 실시예 2로부터의 PSR을 반복하되, 단 315 µm 메쉬를 이용하였다. 2 성분 젤 분말을 인산염 완충액 중 20 mg/ml의 최종 농도가 되도록 수화시켜 오토클레이브 처리하였다. 젤을 90°C로 가열하고 젤 함량을 16 시간 간격으로 측정하였다 (도 2 참조). 이에 따라, 실시예 4에서, 제1 가교 반응과 제2 가교 반응 양자 간의 충전비는 0.036이었다.

[0212] **실시예 5 - 2 성분 젤의 제조**

[0213] 실시예 2로부터의 젤 분말 7 g 및 3 g HA를 이용한 것을 제외하고 실시예 4에서와 같이 반응을 수행하여 충전비 0.043을 달성하였다. 젤을 90°C로 가열하고, 젤 함량을 16 시간 간격으로 측정하였다 (도 2). Restylane

Lyft(Galderma사 제품)를 레퍼런스로서 사용하였다. 이에 따라, 실시예 5에서, 제1 가교 반응에서는 충전비가 0.036, 제2 가교 반응에서는 충전비가 0.043이었다.

[0214] 실시예 4 및 5의 젤들은 다음의 초기 특징을 가졌다:

샘플	내부 젤의 건조 중량		[HA] (mg/ml)
	함량	GelC %	
실시예 4	50%	83	20
실시예 5	70%	91	19
Restylane Lyft	-	86	20

[0215]

[0216] 도 2에 도시된 바와 같이, 70% 복합 젤은 외부 젤이 없어질 때까지 분해되다가 약 70% 잔류될 때 안정화되어 (levels out) 보다 저속으로 분해된다. 동일한 유형의 거동이 50% 복합 젤에서도 관찰되었으나, 이 젤은 50%에서 안정화된다. 단일 젤 유형만을 함유하는 레퍼런스 젤은, 보다 일정한 속도로 분해된다. 이러한 결과는 복합 젤 개념, 즉, 내부 젤의 분해가 개시되기 전에 외부 젤의 분해가 먼저 일어나는 복합 젤의 개념을 명쾌하게 입증한다. 동일한 거동이 생체내에서도 예측된다.

[0217]

실시예 6 - 2 성분 젤의 제조

[0218]

실시예 3으로부터의 젤 입자 2.5 g 및 2.5 g HA (Mw 1MDa), 15 g NaOH 2% w/w 및 35 mg BDDE를 사용한 것을 제외하고 실시예 4에서처럼 반응을 수행하여 충전비 0.022를 얻었다. 젤을 90°C로 가열하고, 팽윤 인자를 16 h 시간 간격으로 측정하였다(도 3). 레퍼런스로서, 실시예 3으로부터의 젤 입자를 2회 가교시켜 실시예 6 및 7의 내부 젤에 대응시켰다. 도 5는 실시예 6에서 수득한 젤 입자를 10x 배율로 찍은 현미경 이미지이다.

[0219]

그러므로, 실시예 6에서, 충전비는 제1 가교 반응에서 0.015, 제2 가교 반응에서 0.022였다.

[0220]

실시예 7 - 2 성분 젤의 제조

[0221]

실시예 3으로부터의 젤 입자 3.5 g 및 1.5 g HA를 사용한 것을 제외하고 실시예 6에서처럼 반응을 수행하여 충전비 0.025를 얻었다. 젤을 90°C로 가열하고, 팽윤 인자를 16 h 시간 간격으로 측정하였다(도 3). 이에 따라, 실시예 7에서, 제1 가교 반응에서의 충전비는 0.015, 제2 가교 반응에서의 충전비는 0.025였다.

[0222]

실시예 6 및 7의 젤들은 다음의 초기 특징들을 가졌다:

샘플	내부 젤의 건조		[HA] (mg/ml)	GelC %
	중량	함량		
실시예 6	50%	4.0	20	93
실시예 7	70%	3.7	20	94
Ref	-	3.1	20	96

[0223]

[0224]

50% 복합 젤은 대부분의 팽윤에 기여하는 연질의 외부 젤을 더 큰 비율로 포함하므로, 외부 젤보다 그의 팽윤이 증가한다. 일정 기간 후(50% 복합 젤의 경우 약 40 시간), 외부 젤이 사라지고 보다 경질인 내부 젤만이 팽윤에 기여한다. 이에 따라 측정된 SwF가 급락하게 되고, 이어서 내부 젤의 팽윤으로 인해 서서히 상승한다. 70% 복합 젤은 이와 유사하지만, 덜 분명한 거동을 나타내는데, 이는, 이 젤은 외부 젤의 함량이 더 낮기 때문이다. 내부 젤만을 갖는 젤(단일 젤)은 팽윤 거동의 보다 일정한 증가를 나타낸다. 따라서, 내부 젤은, 외부 젤 분해 후, 내부 복합 젤의 그것과 유사한 팽윤 인자를 나타낸다.

[0225] 다음의 표는 전술한 실시예 4-7에서의 2 성분 젤을 제조하는데 사용된 충전비를 요약한 것이다:

샘플	충전비 제 1 가교 반응	충전비 제 2 가교 반응
실시예 4	0.036	0.036
실시예 5	0.036	0.043
실시예 6	0.015	0.022
실시예 7	0.015	0.025

[0226]

[0227] 또한, 전술한 표에 따른 충전비를 갖는 제1 및 제2 가교 반응을 수행함으로써 실시예 4-7에서 제조된 2-성분 젤의 내부 및 외부 젤들에 대해 다음과 같은 개질도(MoD)가 초래되었다:

샘플	MoD 2 성분 젤의 내부 젤 (%)	MoD 2 성분 젤의 외부 젤(%)
실시예 4	3.9	1.1
실시예 5	3.9	1.1
실시예 6	2.2	1.0
실시예 7	2.2	1.0

[0228]

[0229] 따라서, 모든 실시예에서 내부 젤의 MoD는 외부 젤의 MoD 보다 높는데, 이는 이 젤의 가교를 위해, 제2 가교 반응이 일어나는 동안 내부 젤로 확산하는 크로스링커에 기인하며 이에 따라 제2 가교 반응 동안 내부 젤의 MoD가 증가하기 때문이다.

[0230]

실시예 8- 아미드 결합을 갖는 가교된 단일 성분 젤의 제조

[0231] 히알루론산 (HA), DATH (디아미노트레할로스) 및 DMTMM (4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드)이 혼합 및 반응되도록, 아미드 결합과의 가교를 이용하여 젤을 제조하였다. DMTMM은 커플링제로서 기능하는 반면 DATH는 크로스링커 역할을 한다.

[0232] 단일 성분 젤을 다음과 같이 제조하였다: HA를 물에 용해된 적정량의 DATH 및 DMTMM과 혼합 및 반응시켰다. 가교 후, 젤을 염수 중 20 mg/g으로 희석하고 약 20 시간 동안 70℃로 가열하였다. 125µm 메쉬를 이용하여 입자 크기 감소(PSR)을 수행하였다. 젤을 EtOH에 침전시켜 젤 분말을 얻고, 이를 세척 및 건조하였다.

실시예 9 - 아미드 결합과 가교된 2 성분 젤의 제조

[0234] 실시예 8에서 제조된 아미드 결합과 가교된 HA의 건조한, 가교된 젤 분말을, 제2 가교를 위해 물에 용해된 적정량의 HA, DATH 및 DMTMM과 혼합 및 반응시켜, 이미 가교된 젤 입자들을 제2 젤 재료 내로 매립시켰다.

[0235] 제2 가교 후, 젤을 염수에 20 mg/g으로 희석하고 약 20 시간 동안 70℃로 가열하였다. 315µm 메쉬를 이용하여 입자 크기 감소(PSR)를 실시하였다. 젤을 EtOH에 침전시켜 젤 분말을 얻고, 이를 세척 및 건조하였다. 2 성분 젤 분말을 최종 농도 20 mg/ml로 인산염 완충액에서 수화시킨 다음 오프클레이브 처리하였다.

[0236] 실시예 9로부터 제조된 2 성분 젤의 현미경을 도 6에 나타내었다.

[0237] 아미드 결합과 가교된 젤의 젤 특징을 다음 표에 나타내었다:

실시예	HA - 농도 (mg/g)	GelC (%)	SwF (ml/g)	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tanδ
8	20	96	2.9	1261	115	0.09
9	20	82	4.4	288	36	0.12

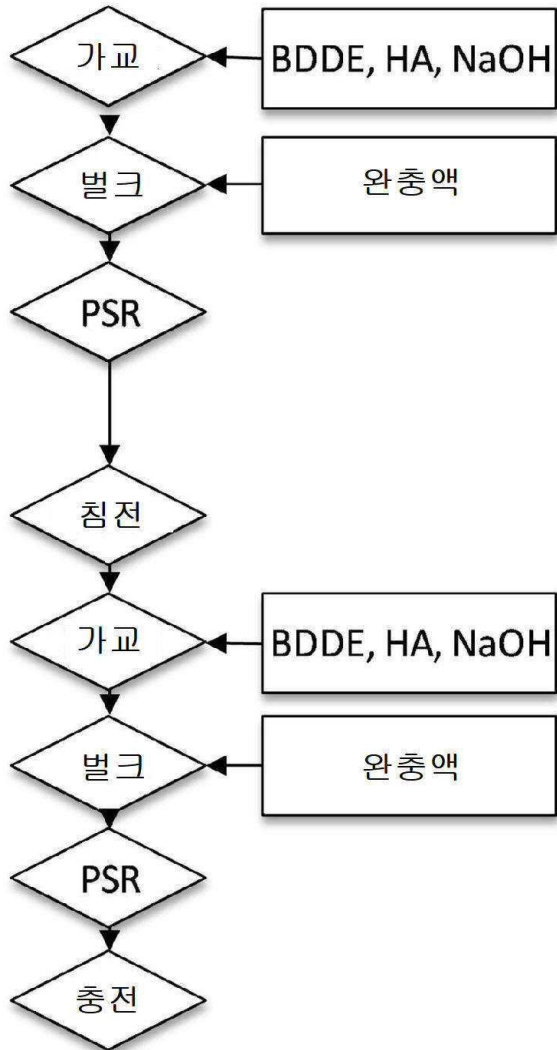
[0238]

[0239] 당업자라면 본 발명이 결코 전술한 바람직한 구체예로 한정되지 않음을 인식할 것이다. 오히려, 첨부된 청구범

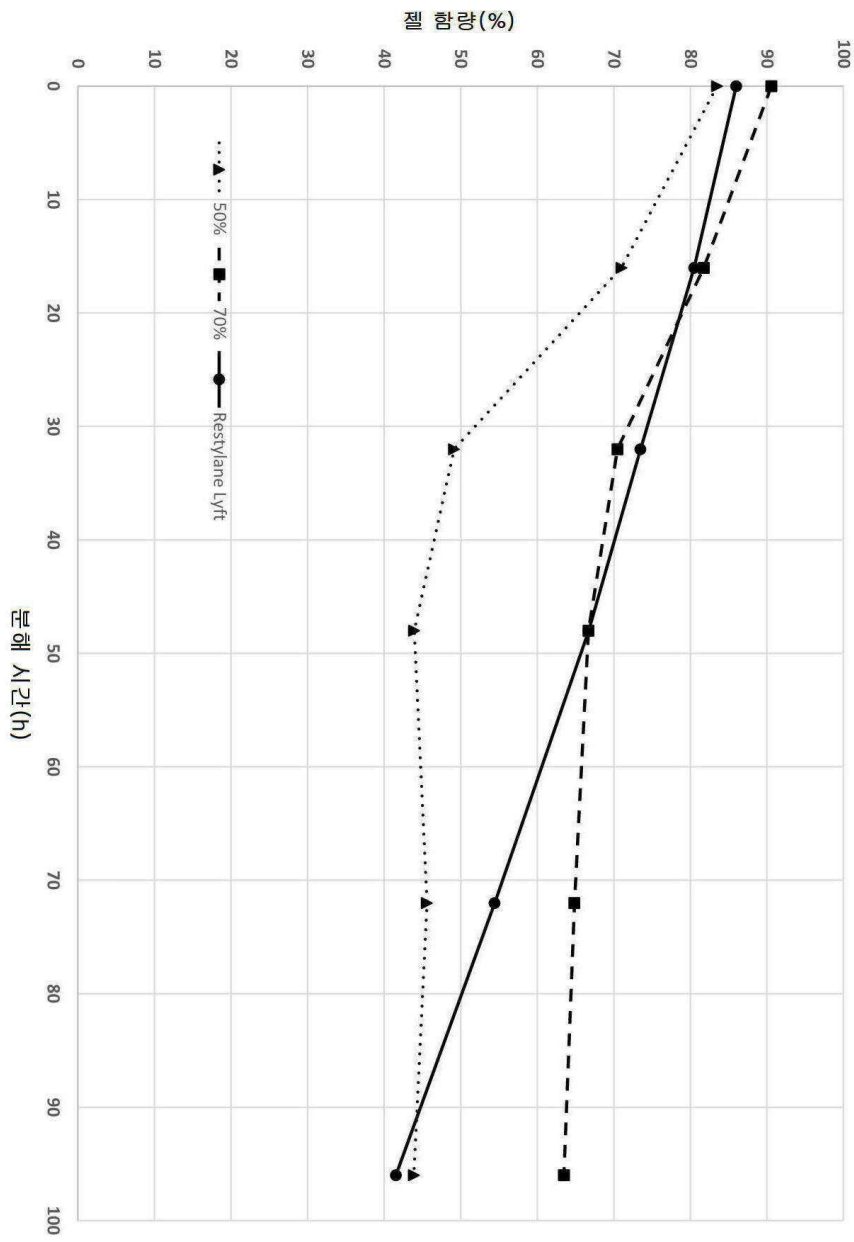
위의 범위 내에서 많은 변화와 변형이 가능하다. 또한, 개시된 구체예에 대한 변형은 도면, 명세서 개시 내용 및 첨부된 청구범위의 연구로부터 청구된 발명을 실시함에 있어 당업자에 의해 이해되고 영향을 받을 수 있다. 청구범위에서, "포함하는"이라는 단어는 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않으며, 부정 관사 "a" 또는 "an"은 복수를 배제하지 않는다. 특정 수단이 서로 다른 종속항에 인용되어 있다는 사실이 곧 이들 수단의 조합이 유리하게 사용될 수 없음을 가리키는 것은 아니다.

도면

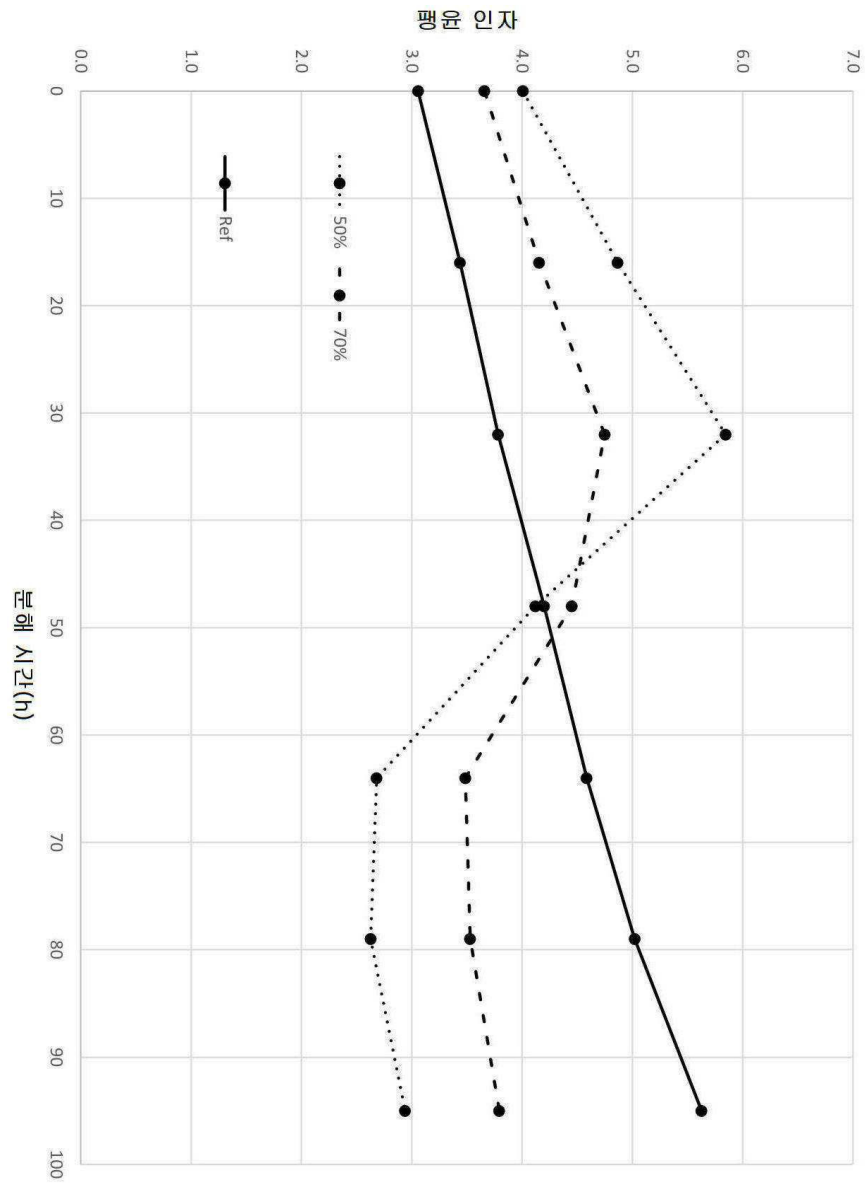
도면1



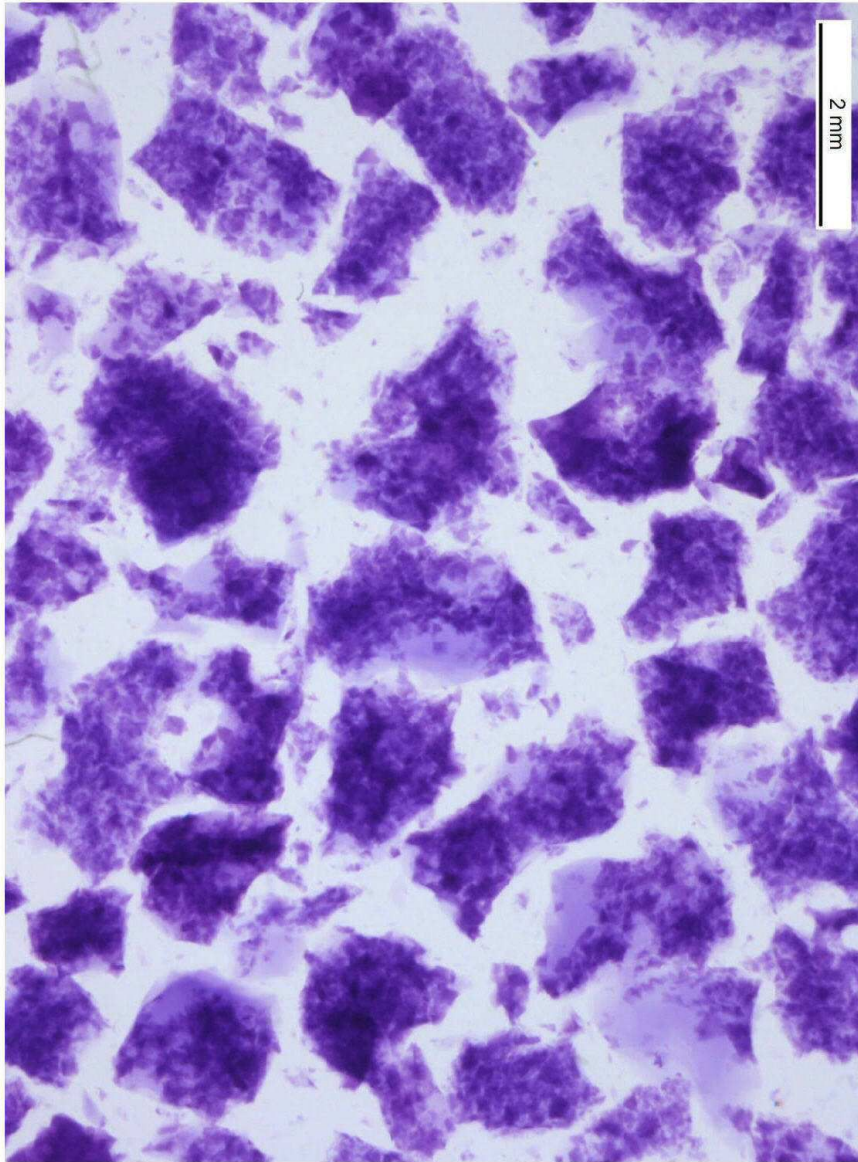
도면2



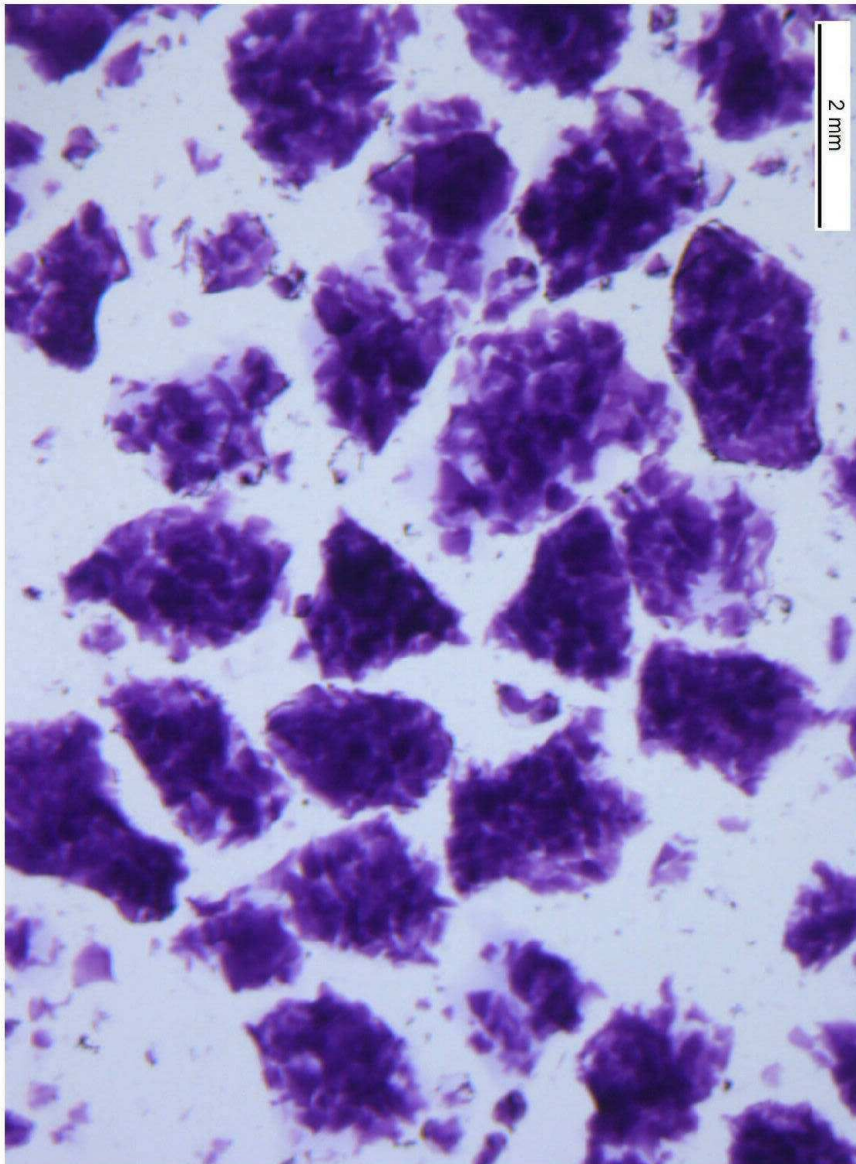
도면3



도면4



도면5



도면6

