(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0013682
(43) 공개일자 2023년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/20 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
A61M 5/28 (2006.01) *C08B 37/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0093368
(22) 출원일자 2021년07월16일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 휴메딕스
경기도 성남시 수정구 창업로 17, 에이동 6층 603호
(72) 발명자
채서광
경기도 안양시 만안구 경수대로 1193, 105동 303호 (석수동, 석수e-편한세상아파트)
임채영
경기도 화성시 동탄반석로 232, 136동 1803호 (석우동, 동탄에당마을 신일유토빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

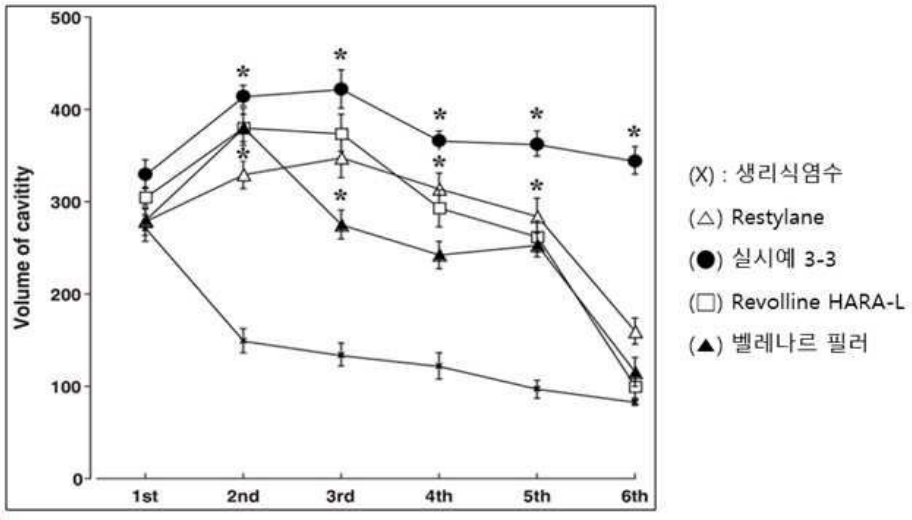
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **PEGDE로 가교된 히알루론산 필러 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

생체적합성이 높은 PEGDE를 기존 널리 사용되는 BDDE 가교제보다 더 낮은 몰비로 사용함으로써 안전성이 높으면서도 물성 및 지속성이 우수한 히알루론산 하이드로겔 필러 및 이의 제조방법을 제공한다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61M 5/28 (2013.01)
C08B 37/0072 (2013.01)
A61L 2300/236 (2013.01)
A61L 2300/402 (2013.01)
A61L 2430/34 (2013.01)

(72) 발명자
민선홍
인천광역시 연수구 송도과학로 27번길 70, 104동 802호 (송도동, 롯데캐슬)
하혜란
경기도 안산시 상록구 반석로 44, 112동 504호 (본오동, 신안1차아파트)
구민경
서울시 송파구 양재대로71길 1-10, 401호 (방이동, 올림픽하이빌)
한가득
충청남도 천안시 동남구 새말4길 5, 102동 1009호 (신방동, 신동아아파트)
권순민
서울특별시 성동구 왕십리로21가길 12, 804호 (행당동, K타워)

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(PEGDE)로 가교된 히알루론산을 포함하며,

상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르의 농도는 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.05 내지 0.2 mol%인,

히알루론산 하이드로겔 필러.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 히알루론산 하이드로겔 필러는 레오미터(Rheometer)로 측정시 1Hz의 각속도에서 5 내지 200의 복소점도를 갖는,

히알루론산 하이드로겔 필러.

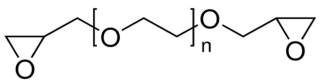
청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르는 하기 화학식 1로 표현되고, n은 평균 400인,

하일루론산 하이드로겔 필러.

[화학식 1]



청구항 4

제1항에 있어서,

상기 히알루론산 하이드로겔 필러는 마취제를 더 포함하는,

히알루론산 하이드로겔 필러.

청구항 5

제1항의 히알루론산 하이드로겔 필러가 충진된 프리필드시린지.

청구항 6

히알루론산 또는 이의 염, 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르, 및 알칼리 수용액을 혼합하고 가교 반응시키는 단계를 포함하고,

상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르는 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.05 내지 0.2 mol% 만큼 혼합하는 것인,

히알루론산 하이드로겔 필러의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PEGDE로 가교된 히알루론산 필러 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 히알루론산은 N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine)과 D-글루쿠론산(D-glucuronic acid)으로 이루어진 반복 단위가 선형으로 연결되어 있는 생체 고분자 물질이다. 히알루론산은 높은 생체적합성을 가지므로 의료 및 미용 목적의 연부조직 확장제(soft tissue augmentation material), 소위 피부용 필러(dermal filler)로도 널리 사용되고 있다.

[0003] 히알루론산은 체내 주입시 반감기가 수시간으로 매우 짧고 탄성이 부족하지만, 가교를 통해 체내 지속성과 탄성을 증가시킬 수 있다. 기존의 히알루론산 필러 제품은 주로 BDDE(1,4-Butanediol diglycidyl ether), DVS(divinyl sulfone) 등의 화학적 가교제를 사용하여 제조되는데, 최근 화학적 가교제에 의한 부작용 및 안전성에 대한 이슈가 제기되고 있다.

[0004] 따라서 기존의 가교제보다 독성이 더 낮은 가교제를 더 낮은 몰비로 사용하여 안전성을 높임과 동시에 물성과 지속성 또한 우수한 히알루론산 필러가 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제10-2020-0032103호(2020.03.25)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 구체예에 따르면, 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 낮은 몰%의 PEGDE를 사용하면서도 안전성이 높으면서도 물성 및 지속성이 우수한 히알루론산 하이드로겔 필러 및 이의 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(PEGDE)로 가교된 히알루론산을 포함하는 히알루론산 하이드로겔 필러를 제공한다.

[0008] 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(PEGDE)는 기존에 사용되던 가교제인 BDDE(1,4-Butanediol diglycidyl ether) 및 DVS(divinyl sulfone)보다 독성이 낮은 장점이 있다. Rat에 대한 반수치사량(LD_{50})은 DVS가 32 mg/kg, BDDE가 1,134 mg/kg인 반면 PEGDE는 5000mg/kg 이상이며 상대적으로 안전성이 매우 높다.

[0009] 일 구체예에 따르면, 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르의 농도는 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.05 내지 0.2 mol%, 0.075 내지 0.15 mol%, 0.09 내지 0.11 mol% 또는 0.1 mol%인 히알루론산 하이드로겔 필러를 제공한다. 상기 단위유닛은 N-아세틸-D-글루코사민 및 D-글루쿠론산으로 이루어져 있으며, 단위유닛의 평균 분자량은 약 378, 또는 378.3일 수 있으며, 일 실시예에 따르면 Na이 결합된 염을 기준으로 약 403 일 수 있다.

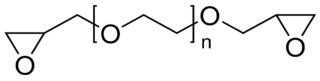
[0010] 일 구체예에 따르면, 상기 히알루론산 하이드로겔은 레오미터(Rheometer)로 측정시 1Hz에서 5 내지 200 Pa.s, 또는 30 내지 60 Pa.s의 복소점도(complex viscosity)를 가질 수 있다.

[0011] 상기 필러는 가교되지 않은 히알루론산 또는 이의 염을 더 포함할 수 있다. 상기 히알루론산의 염은 예를 들면 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 또는 히알루론산 코발트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 상기 히알루론산의 평균 분자량은 100,000 Da 내지 2,500,000 Da일 수 있고, 예를 들면 약 1,000,000 Da일 수 있다.

[0013] 일 구체예에 따르면, 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르는 하기 화학식 1로 표현되고, n은 평균 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500일 수 있다.

[0014] [화학식 1]

[0015] 

[0016] 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(PEGDE)는 분자량은 400 내지 20000, 500 내지 20000, 1000 내지 20000, 2000 내지 20000, 3000 내지 20000, 4000 내지 20000, 5000 내지 20000, 10000 내지 20000, 또는 15000 내지 20000일 수 있다. 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(PEGDE)의 평균 분자량은 약 17725 (n = 약 400)일 수 있다.

[0017] 일 구체예에 따르면, 상기 필러는 마취제를 더 포함할 수 있다. 상기 마취제는 국소마취제일 수 있으며, 예를 들면 리도카인(Lidocaine), 부피바카인(bupivacaine), 메피바카인(mepivacaine), 또는 이들의 염일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 상기 히알루론산 하이드로겔 필러는 조직수복용 재료, 심부체강창상피복, 체강창상피복, 관절활액보충 등의 용도로 사용될 수 있다. 상기 히알루론산 하이드로겔 필러는 조직수복용 재료로서 생물학적 조직의 필링(filling), 주름개선, 안면의 윤곽 교정, 또는 입술, 코, 엉덩이, 볼 또는 가슴과 같은 연조직의 용적(volume)의 수복 또는 부피확대를 위해 사용될 수 있으며, 미백, 피부톤 개선 및 보습 목적으로도 사용될 수 있다. 상기 히알루론산 하이드로겔 필러는 심부체강창상피복재 또는 체강창상피복재로서 상처치유, 상처부위 유착방지 목적으로 사용될 수 있다. 상기 히알루론산 하이드로겔 필러는 피부의 주름살(wrinkle) 및 주름(line), 미간 주름(glabellar line), 비구순 주름(nasolabial fold), 턱 주름(chin fold), 마리오네트 주름(marionette line), 아래턱선(jawline), 구강 교련(buccal commissure), 입주위 주름살(perioral wrinkle), 눈가 잔주름(crow's feet), 피부 함몰부, 흉터, 관자, 눈썹의 진피하 지지부, 광대 및 볼 지방 패드, 눈물 도랑(tear trough), 코, 입술, 뺨, 턱, 입주위 영역, 안와하 영역, 및 안면 비대칭의 미용 용도 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0019] 다른 양상은 상기 히알루론산 하이드로겔 필러가 충진된 프리필드시린지를 제공한다. 히알루론산 하이드로겔 필러가 충진된 프리필드시린지는 상기 언급한 의료 및 미용의 용도로 사용될 수 있다.

[0021] 또 다른 양상에 따르면, 히알루론산 또는 이의 염, 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르, 및 알칼리 수용액을 혼합하고 가교 반응시키는 단계를 포함하는 히알루론산 하이드로겔 필러의 제조방법을 제공한다.

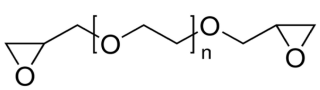
[0022] 일 구체예에 따르면, 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르는 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.05 내지 0.2mol%, 0.075 내지 0.15 mol%, 0.09 내지 0.11 mol% 또는 0.1 mol%만큼 혼합하는 것일 수 있다.

[0023] 상기 히알루론산의 평균 분자량은 100,000 Da 내지 2,500,000 Da일 수 있고, 예를 들면 약 1,000,000 Da일 수 있다.

[0024] 상기 히알루론산 단위유닛은 N-아세틸-D-글루코사민 및 D-글루쿠론산으로 이루어져 있으며, 단위유닛의 평균 분자량은 약 378, 또는 378.3일 수 있으며, Na이 결합된 염을 기준으로는 약 403 일 수 있다.

[0025] 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르는 하기 화학식 1로 표현되고, n은 평균 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500일 수 있다.

[0026] [화학식 1]

[0027] 

[0028] 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(PEGDE)는 분자량은 400 내지 20000, 500 내지 20000, 1000 내지 20000, 2000 내지 20000, 3000 내지 20000, 4000 내지 20000, 5000 내지 20000, 10000 내지 20000, 또는 15000 내지 20000일 수 있다. 상기 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(PEGDE)의 평균 분자량은 약 17725 (n = 약 400)일 수 있다.

[0029] 상기 알칼리 수용액은 NaOH, KOH, $NaHCO_3$, LiOH 또는 이들의 조합의 수용액일 수 있다. 수산화나트륨(NaOH) 수용액을 사용하는 경우 농도는 예를 들면 약 0.25M(약 1%(w/w))일 수 있고, pH는 12 내지 15, 13 내지 15, 14 내지 15, 12 내지 14, 13 내지 14, 또는 12 내지 13일 수 있다. 상기 알칼리 수용액 대신 산 수용액을 사용할

수 있으며, 예를 들면 HCl, H_2SO_4, H_2PO_4 또는 이들의 조합의 수용액을 사용할 수 있다. 상기 상기 알칼리 또는 산 수용액의 농도는 pH가 12 이상 또는 3 이하일 수 있다.

[0030] 상기 히알루론산 또는 이의 염의 농도는 히알루론산 또는 이의 염 및 알칼리수용액 혼합물의 전체 중량 대비 히알루론산 또는 이의 염의 중량 비율로서 10 내지 50 w/w%, 10 내지 40 w/w%, 10 내지 30 w/w%, 15 내지 25 w/w%, 또는 약 20 w/w%일 수 있다.

[0031] 상기 제조방법은 가교 반응시키는 단계 이후에 가교된 히알루론산 하이드로겔을 조분쇄 하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0032] 상기 제조방법은 가교 반응시키는 단계 또는 조분쇄하는 단계 이후에 완충액을 사용하여 히알루론산 하이드로겔을 세척 및 팽윤시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 완충액은 예를 들면 구연산, 인산일수소나트륨, 인산이수소나트륨, 아세트산, 디에틸바비투르산(diethyl barbituric acid), 아세트산 나트륨(sodium acetate), 염화나트륨(Sodium Chloride), TAPS(트리스(하이드록시메틸)메틸아미노)프로판술폰산), Bicine(2-비스(2-하이드록시에틸)아미노)아세트산), 트리스(트리스(하이드록시메틸)암모늄메탄), Tricine(N-(2-하이드록시-1,1-비스(하이드록시메틸)에틸)글라이신), HEPES (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산), TES (2-[[1,3-디하이드록시-2-(하이드록시메틸)프로판-2-일]아미노]메탄술폰산) 및 PIPES(피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0033] 상기 제조방법은 세척 및 팽윤시키는 단계 이후에 팽윤된 히알루론산 하이드로겔을 분쇄하는 단계를 더 포함할 수 있다. 팽윤된 히알루론산을 분쇄하면 시린지에 충전 및 니들을 통한 주사를 용이하게 할 수 있다.

[0034] 상기 제조방법은 분쇄된 히알루론산 하이드로겔을 탈포(defoaming)하는 단계; 분쇄된 히알루론산 하이드로겔과 마취제를 혼합하고 탈포하는 단계; 또는 분쇄된 히알루론산 하이드로겔, 및 마취제 및 미가교 히알루론산의 혼합액을 혼합하고 탈포하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0035] 상기 제조방법은 히알루론산 하이드로겔을 용기에 충전하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 용기는 예를 들면 바이알 또는 시린지일 수 있고, 재질은 유리, 고무, 플라스틱를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 제조방법은 히알루론산 하이드로겔이 충전된 용기를 멸균하는 단계를 더 포함할 수 있다. 다만 무균화된 원재료를 사용하고 각 단계를 무균시설에서 수행함으로써 멸균하는 단계를 수행하지 않을 수 있다.

발명의 효과

[0037] 일 구체예에 따른 히알루론산 하이드로겔 필러는 BDDE보다 생체적합성이 우수한 PEGDE를 사용하여 가교함으로써 안전성이 높을 수 있다.

[0038] 일 구체예에 따른 히알루론산 하이드로겔 필러는 종래 제조방법보다 더 낮은 몰%의 가교제를 사용하면서도 탄력성 및 지속성이 동등하거나 우수할 수 있다.

[0039] 일 구체예에 따른 히알루론산 하이드로겔 필러는 종래 제조방법으로 제조한 히알루론산 필러보다 콜라겐 발현을 더 촉진시킴으로써 피부 보습, 주름개선 등 미용효과가 우수할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1 및 도 2는 히알루론산과 PEGDE를 다양한 몰비로 혼합하여 제조한 히알루론산 하이드로겔의 복소점도를 측정한 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로 히알루론산의 농도는 15 mg/ml, 17 mg/ml, 및 20 mg/ml이고, 이들 각각에 대해 PEGDE를 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.05 mol%, 0.075 mol%, 0.1 mol%, 0.15 mol%, 또는 0.2 mol%로 혼합하였다.

도 3은 마우스에 히알루론산 필러를 피하주사하는 과정을 나타낸 것이다.

도 4는 주름양상 관찰을 위한 레플리카 제작 과정 및 주기를 나타낸 것이다.

도 5는 일 실시예에 따른 히알루론산 하이드로겔 필러의 체내 지속성 및 부피 유지력이 BDDE 가교제로 제조된 히알루론산 필러들보다 우수함을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 일 실시예에 따른 히알루론산 하이드로겔의 콜라겐 생성 촉진 효과가 BDDE 가교제로 제조된 히알루론산 필러들보다 우수함을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1: 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.05 mol%의 PEGDE로 가교한 히알루론산 하이드로겔 제조**

[0044] 히알루론산(평균 분자량 약 1,000,000Da)을 NaOH 수용액(0.25M, 약 1%(w/w), pH 13 이상)에 각각 15 mg/ml, 17 mg/ml, 또는 20 mg/ml를 용해시켰다. 각각의 용액에 히알루론산 단위유닛 1몰 (단위유닛 1몰은 Na 염을 기준으로 평균 분자량 403) 대비 0.05 mol%의 폴리에틸렌글리콜 디글리시딜에테르(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether, PEGDE)를 가하고 30℃에서 20시간 동안 반응시켜 가교된 히알루론산 하이드로겔을 제조하였다. 상기 사용된 PEGDE의 n은 약 400이고, 평균 분자량은 약 17725이었다.

[0045] 가교된 히알루론산 겔을 조분쇄하였다. 분쇄된 겔을 pH 6.8의 50mM 인산염 완충액에서 세척 및 팽윤(swelling)시켰다. 세척 및 팽윤이 완료된 히알루론산 겔을 시린지 니들의 내경을 통과할 수 있는 크기로 분쇄하고 시린지에 충진하였다. 충진된 시린지를 고무전으로 밀봉하고 고압증기멸균을 실시하였다.

[0046] 제조된 히알루론산 겔은 히알루론산의 함량에 따라 실시예 1-1(히알루론산 15 mg/ml), 실시예 1-2(17 mg/ml), 및 실시예 1-3(20 mg/ml)으로 구별하였다.

[0048] **실시예 2: 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.075 mol%의 PEGDE로 가교한 히알루론산 하이드로겔 제조**

[0049] 상기 실시예 1에서 PEGDE의 농도를 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.075 mol%로 한 것을 제외하면 동일한 방법으로 히알루론산 겔을 제조하였다.

[0050] 제조된 히알루론산 겔은 히알루론산의 함량에 따라 실시예 2-1(히알루론산 15 mg/ml), 실시예 2-2(17 mg/ml), 및 실시예 2-3(20 mg/ml)으로 구별하였다.

[0052] **실시예 3: 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.1 mol%의 PEGDE로 가교한 히알루론산 하이드로겔 제조**

[0053] 상기 실시예 1에서 PEGDE의 농도를 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.1 mol%로 한 것을 제외하면 동일한 방법으로 히알루론산 겔을 제조하였다.

[0054] 제조된 히알루론산 겔은 히알루론산의 함량에 따라 실시예 3-1(히알루론산 15 mg/ml), 실시예 3-2(17 mg/ml), 및 실시예 3-3(20 mg/ml)으로 구별하였다.

[0056] **실시예 4: 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.15 mol%의 PEGDE로 가교한 히알루론산 하이드로겔 제조**

[0057] 상기 실시예 1에서 PEGDE의 농도를 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.15 mol%로 한 것을 제외하면 동일한 방법으로 히알루론산 겔을 제조하였다.

[0058] 제조된 히알루론산 겔은 히알루론산의 함량에 따라 실시예 4-1(히알루론산 15 mg/ml), 실시예 4-2(17 mg/ml), 및 실시예 4-3(20 mg/ml)으로 구별하였다.

[0060] **실시예 5: 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.2 mol%의 PEGDE로 가교한 히알루론산 하이드로겔 제조**

[0061] 상기 실시예 1에서 PEGDE의 농도를 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.2 mol%로 한 것을 제외하면 동일한 방법으로 히알루론산 겔을 제조하였다.

[0062] 제조된 히알루론산 겔은 히알루론산의 함량에 따라 실시예 5-1(히알루론산 15 mg/ml), 실시예 5-2(17 mg/ml), 및 실시예 5-3(20 mg/ml)으로 구별하였다.

[0064] **실험예 1: PEGDE로 가교한 히알루론산 하이드로겔의 복소점도 측정**

[0065] 상시 실시예 1 내지 5의 히알루론산 겔의 복소점도(Complex Viscosity)를 측정하였다. 복소점도는 레오미터(Rheometer)로 하기 측정조건에서 측정하였다.

[0066] [측정조건]

[0067] 장비: Malvern 사의 Kinexus 회전 레오미터; Geometry: PU SC0033 SS(직경 20 mm); 측정온도: 25도씨; Gap 0.5 mm; 1Hz에서의 복소점도 측정.

[0068] 복소점도 측정 결과를 도 1 내지 도 2, 및 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0069]

실시예	히알루론산 함량 (mg/ml)	히알루론산 대비 PEGDE 몰비(%)	평균 복소점도 (Pa.s)	복소점도 범위 (Pa.s)
1-1	15	0.050	5.097	5 ~ 8
1-2	17		5.219	
1-3	20		8.082	
2-1	15	0.075	16.98	15 ~ 26
2-2	17		19.70	
2-3	20		26.23	
3-1	15	0.100	31.17	30 ~ 60
3-2	17		47.95	
3-3	20		60.67	
4-1	15	0.150	56.42	60 ~ 105
4-2	17		82.34	
4-3	20		104.10	
5-1	15	0.200	54.99	55 ~ 200
5-2	17		141.1	
5-3	20		192.4	

[0070] 실험결과, 히알루론산 20 mg/ml 및 히알루론산 단위유닛 1몰 대비 0.1 mol%의 PEGDE를 첨가하여 가교한 히알루론산 겔은 낮은 가교제 사용에도 불구하고 복소점도가 60 Pas.s 이상으로 점탄성(viscoelasticity)이 우수한 것으로 확인되었다.

[0072] **실험예 2: BDDE로 가교한 히알루론산 하이드로겔의 가교제 함량 및 복소점도 비교**

[0073] 가교제로서 BDDE를 사용하는 것을 제외하고 상기 실시예 1 내지 5와 동일한 방법으로 히알루론산 하이드로겔을 제조하였다. 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 복소점도를 측정하고, PEGDE로 가교한 히알루론산 겔과 동등한 복소점도를 달성하기 위한 BDDE의 함량을 확인하였다.

[0074] 실험결과에 따르면, PEGDE는 BDDE 대비 1/8 내지 1/10의 낮은 mol%로도 동등한 복소점도를 달성할 수 있음이 확인되었다. (표 2 참고)

표 2

[0075]

No	물성(복소점도, Pa.s, at 1Hz)	PEGDE 비율(mol%)	BDDE 비율(mol%)
1	5-8	0.05	4
2	15-26	0.075	8
3	30-60	0.1	8.5
4	60-105	0.15	10
5	55-200	0.2	14.5

[0077] **실험예 3: PEGDE로 가교한 히알루론산 겔의 지속력 및 콜라겐 생성 평가**

[0078] 20 주령 된 암컷 hairless 마우스(체중 28±1g)를 군당 10 마리씩 사용하여 상기 제조된 히알루론산 필러를 동일한 복강부위에 투여하였다. 투여 후 1일, 7일, 30일, 60일, 120일, 180일째 주름평가하였고, 마지막 180일차에는 개체를 희생하여 조직검사(H&E stain) 및 면역학적 검사(웨스턴 블롯)를 수행하였다. 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

[0079] 3-1. 실험동물 준비

[0080] 본 실험에 사용된 실험동물은 20 주령 된 암컷 hairless 마우스 (28 ± 1g) 50마리를 사용하였다. 모든 실험동물은 전 실험기간을 통하여 고형 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하고, 온도는 22~24℃, 습도는 60% 유지되며, 밤낮주기(12시간 light/12시간 dark)가 조절되는 실험실 환경에서 사육하였다. 집단분류는 무작위 추출법에 의해 총 5집단으로 분류하였으며, 각각 10마리씩 분류하였음. 집단분류와 투여한 히알루론산 필러는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0081]

집단분류	투여한 필러	투여용량 (㎕)	집단별 동물 수 (마리)
A	0.9% 생리식염수	400	10
B	레스틸렌(Restylane)	400	10
C	PEGDE (실시예 3-3)	400	10
D	고점탄성-1(Revolline HARA-L)	400	10
E	고점탄성-2(벨레나르)	400	10

[0082] 이 중 레스틸렌(Restylane), 리볼라인 하라-L, 및 벨레나르는 시판되고 있는 제품으로, 세 제품 모두 히알루론산 20 mg/ml를 함유하며, 레스틸렌은 BDDE 1 내지 3 mol%, 고점탄성-1 및 고점탄성-2는 BDDE 1.9 mol%를 첨가하여 가교한 필러이다. 본 실험은 경희대학교 동물실험윤리위원회 규정의 심의를 거쳤으며 국립수의과학검역원의 동물보호법과 세계동물보건기구의 동물 복지 가이드라인을 준수하였다.

[0083] 3-2. 약물투여

[0084] 약물투여를 위해 Zoletil 50® (10 mg/kg, i.p.; Virbac Laboratories, Carros, France)을 복강 주사하여 마취시켰다. 개체별 투여부위의 동일함을 유지하기 위해 양측하단에 가로 1.2 cm × 세로 1.2 cm의 크기의 사각형 모형에 각 모서리부위에 점을 찍어 투여 부위를 표기하였다. 주사기(31 G)를 이용하여 사각형 부위의 한 가운데 피하에 히알루론산 필러를 400㎕씩 투여하였다. (도 3 참고)

[0085] 3-3. 필러의 부피 유지력 관찰

[0086] 필러 투여 후 주름 및 부피 유지 양상을 관찰하였다. 주입된 필러의 지속성이 낮다면 부피가 감소하고 주름이 증가하므로, 부피 및 주름 양상을 관찰함으로써 필러의 부피변화 및 지속성을 확인할 수 있다. 필러 투여 후 동일한 조건하에서 사진을 촬영하고 육안으로 부피와 형태를 관찰하였다. 그 후 투여 부위에 실리콘 폴리머(SILFLO impression material, Flexico, England)를 이용하여 레플리카 (replica)를 채취하였다. 실리콘 폴리머를 이용한 레플리카의 채취는 우선 Zoletil 50® (10 mg/kg, i.p.; Virbac Laboratories)을 복강 주사하여 마취시킨 후 실리콘 폴리머를 투여부위에 바른 뒤 충분히 응고될 때까지 기다린 후 채취하였다. 주름양상 관찰은 최초 투여 및 첫 번째 레플리카를 채취한 날로부터 7일 후 두번째 레플리카를 채취하였고, 두번째 레플리카를 채취한 날로부터 21일 뒤 세번째 레플리카 (약물투여 후 약 1개월)를 채취하였다. 이후 실험 종료시점(약물투여 후 6개월)까지 3번 더 레플리카를 채취하여 총 6번의 레플리카를 채취하였다. (도 4 참고) Visioline VL650(Courage & Khazaka, Koln, Germany)을 사용하여 채취한 레플리카로부터 부피 및 주름 지표를 측정하였다. 측정된 부피 및 주름지표를 종합하여 필러 주입 후 시간 경과에 따른 부피의 유지력을 확인하였다.

[0087] 3-4. 실험동물 희생 및 조직처리

[0088] 약물투여 6개월(168일차) 후에 모든 실험동물은 마지막 실리콘 레플리카를 제작한 후 희생되었다. 모든 실험동물들은 Zoletil 50® (Virbac Laboratories, 10 mg/kg, i.p.)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 약물 투여 부위의 1.5 cm × 1.5 cm 크기로 피부 및 근육 층을 채취하였다.

[0089] 적출된 조직 중 웨스턴 블롯팅을 통해 collagen fiber를 평가할 일부 조직은 -80℃에 보관하고, 일부는 100 mM 인산 완충액에 녹인 4% paraformaldehyde (PFA) 고정액 24시간 후 고정(Post-fixed)을 실시하였다. 이후 70%,

80%, 90%, 100% 에탄올에 넣어 탈수시켰으며, xylene에 침착 시킨 후 경질 파라핀 (Leica, Nussloch, Germany) 용액에 3단계의 과정을 거쳐 조직에 파라핀을 침습시켰다. 침습이 끝난 조직은 절편을 제작하기 위해 블록을 만들고 고정된 파라핀 조직은 파라핀 절편기 (Shandon Finesse 325, Thermo Electron Co., Cambridge, England)를 사용하여, 5㎛ 두께로 절편을 제작하였으며, 코팅 슬라이드에 붙인 후 37℃ 슬라이드 오븐에 overnight 하였다.

[0090] 3-5. Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

[0091] 조직학적 평가를 위해 H&E 염색을 실시하였다. 슬라이드에 침착된 조직을 Mayer's hematoxylin (Mayer's hematoxylin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 30초간 반응시킨 후, 흐르는 물에서 10분간 세척하였다. 이후 eosin (Eosin, Sigma Chemical Co,) 용액에 3초간 반응시켰다. 염색이 완료된 조직은 탈수과정을 거쳐 Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)로 봉입하였다. 조직학적 평가는 피부층과 근육층 사이에 투여된 약물의 잔존 유무 및 이상 반응 정도를 관찰하였다.

[0092] 3-6. Collagen type Ⅰ, Ⅱ 웨스턴 블롯

[0093] 약물투여 후 유형별 collagen fiber 발현을 측정하기 위해 웨스턴 블롯을 실시하였다. 우선 조직을 분쇄한 뒤 lysis buffer로 단백질을 추출한 후 원심 분리하여 상층액을 얻었다. Bio-Rad 시약을 사용해 상층액의 단백질 농도를 정량하고 50 ㎍의 단백질을 얻었다. 추출된 단백질은 10%의 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyarylamide gel에 전기 영동시킨 후 nitro cellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot 하였다. 그 후 5% skin milk로 하루 밤 동안 blocking한 후 collagen type Ⅰ과 collagen type Ⅱ 일차항체를 4℃에서 overnight 시킨 후 tris-buffered saline with 0.05% tween 20 (TBST)으로 10분 간격으로 3회 세척하였다. 다음 각각의 이차항체를 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 TBST로 15분 간격으로 3회 세척하였다. 마지막으로 chemiluminescence로 현상하였다.

[0094] 3-7. Collagen type Ⅰ, Ⅱ 면역조직화학염색

[0095] 약물 투여 부위의 유형별 collagen fiber 발현을 측정하기 위해 면역조직화학법을 실시하였다. 조직을 그룹별로 같은 부위를 선택한 후 50 mM PBS에 5분 3회 세척하였다. 세척 후, 30% H_2O_2 용액으로 20분간 반응시켰다. 반응 후 다시 50 mM PBS에 세척하고 항체와 반응하기 전에 blocking 용액으로 한 시간 동안 반응시켰다. 각각의 조직에 collagen type Ⅰ과 collagen type Ⅱ의 일차항체를 50 mM PBS에 0.5% BSA와 0.5% sodium azide를 함유한 일차 항체 용액에 1:500의 비율로 희석한 후 48시간 이상 반응시켰다. 이후 50 mM PBS로 세척한 후, 각각에 해당하는 이차항체 (secondary antibody)를 50 mM PBS에 0.3% Triton X-100을 함유한 이차 항체용액에 1:200의 비율로 희석한 후 2시간 동안 반응시켰다. 50 mM PBS로 세척한 후, avidine-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에서 1시간 동안 반응시켰다. 50 mM PBS로 세척한 후, 50 mM Tris 완충액에 과산화수소와 DAB을 함유하는 발색제로 발색반응을 실시한 다음 세척하였다. 발색이 완료된 조직은 탈수과정을 걸쳐 Permount® (Fischer Scientific)로 봉입했다.

[0096] 3-8. 자료처리

[0097] H&E 염색 및 collagen fiber type I, II 측정을 위한 조직의 관찰은 Image-Pro® Plus software (Media Cybernetic, Siver Spring, MD, USA)를 사용하였다. 본 실험에서 측정된 결과들의 각 항목에 대한 평균(mean) 및 표준오차(standard error mean, SEM)는 SPSS(ver. 18.0) 통계 프로그램을 이용하여 산출하였다. 집단 간 비교는 one-way ANOVA을 이용하였고, 결과에 따라 Duncan's 사후검정을 실시하였으며, 통계적 유의수준은 P = 0.05로 설정하였다.

[0098] 3-9. 주입된 필러의 체내지속성

[0099] 상기 주입된 필러의 부피관찰 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 1st는 1일, 2nd는 7일, 3rd는 30일, 4th는 60일, 5th는 120일, 6th는 180일에 대응된다. 도 5에 따르면, 레스틸렌(Restylane), 리볼라인 하라-L, 및 벨레나르는 5th 이후에 부피가 현저히 감소하였으나, 실시예 3-3 필러는 (히알루론산 20 mg/ml 및 PEGDE 0.1 mol%) 6th 에서도 부피가 유지되었다. 따라서 실시예 3-3의 히알루론산 겔은 BDDE보다 독성이 더 낮은 PEGDE를 더 낮은 몰비로 사용했음에도 시판되는 BDDE 가교 히알루론산 필러 제품 대비 체내 지속력이 우수한 것으로 확인되었다.

[0100] 3-10. 주입된 필러가 콜라겐 발현에 미치는 영향

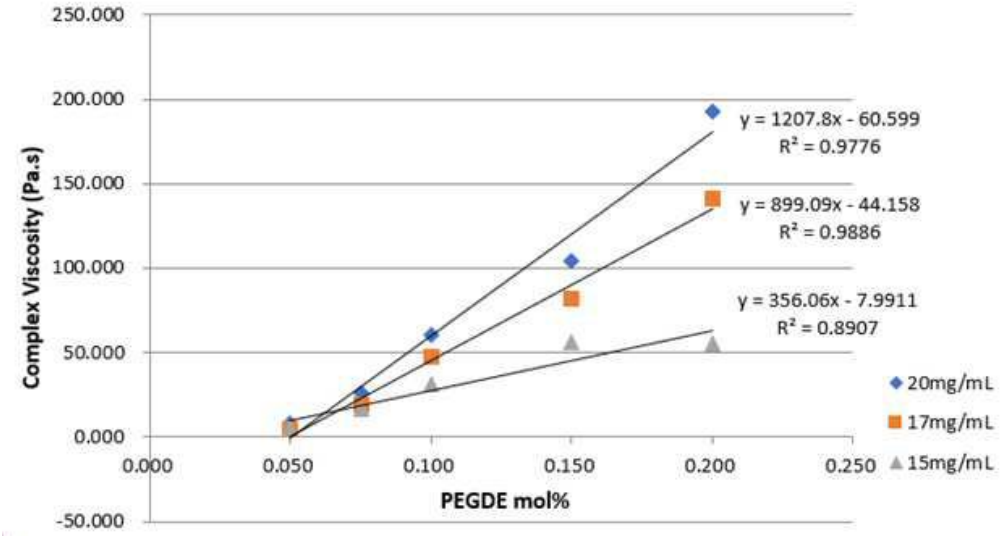
[0101] 본 발명의 히알루론산 겔을 주입한 피하조직(subcutaneous area)의 1형 콜라겐 및 2형 콜라겐 발현 양상을 면역조직화학 및 웨스턴 블로팅으로 확인하였다.

[0102] 도 6에서, (A)는 생리식염수, (B)는 레스틸렌(Restylane), (C)는 실시예 3-3 (히알루론산 20 mg/ml 및 PEGDE 0.1 mol%), (D)는 리볼라인 하라-L, (E)는 벨레나르이다. 도 6에 따르면, 실시예 3-3의 히알루론산 겔은 다른 시판 히알루론산 필러보다 1형(Type 1) 및 2형(Type 2) 콜라겐의 발현을 현저히 증가시키는 것으로 확인되었다. 이에 기초하면 PEGDE로 가교한 히알루론산 겔은 BDDE로 가교한 겔보다 피부의 주름 개선, 보습 및 탄력 개선 효과가 우수한 것으로 볼 수 있다.

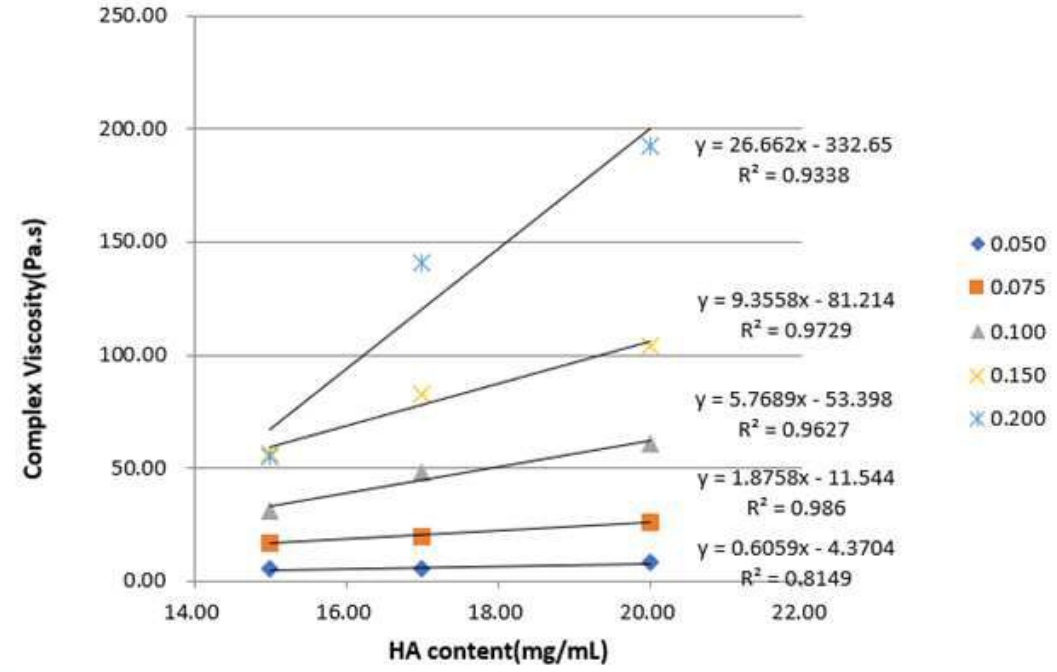
[0103] 상기 실험결과들을 종합하면, PEGDE로 가교한 히알루론산 겔은 BDDE보다 더 낮은 몰비의 PEGDE로도 우수한 물성을 가지며, 체내 지속기간이 더 길고, 콜라겐 발현 효과가 우수하므로 주름 개선 효과뿐만 아니라 피부 보습 및 탄력 개선 효과도 우수함이 확인되었다.

도면

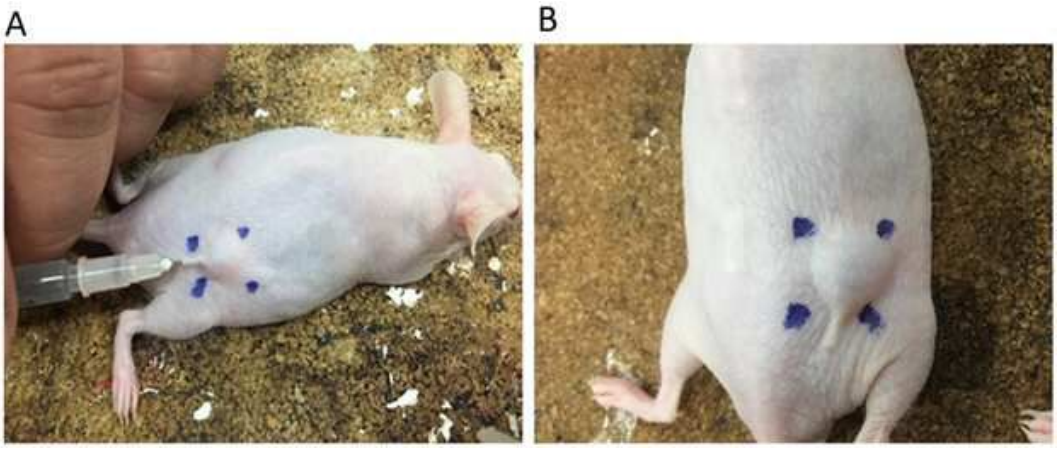
도면1



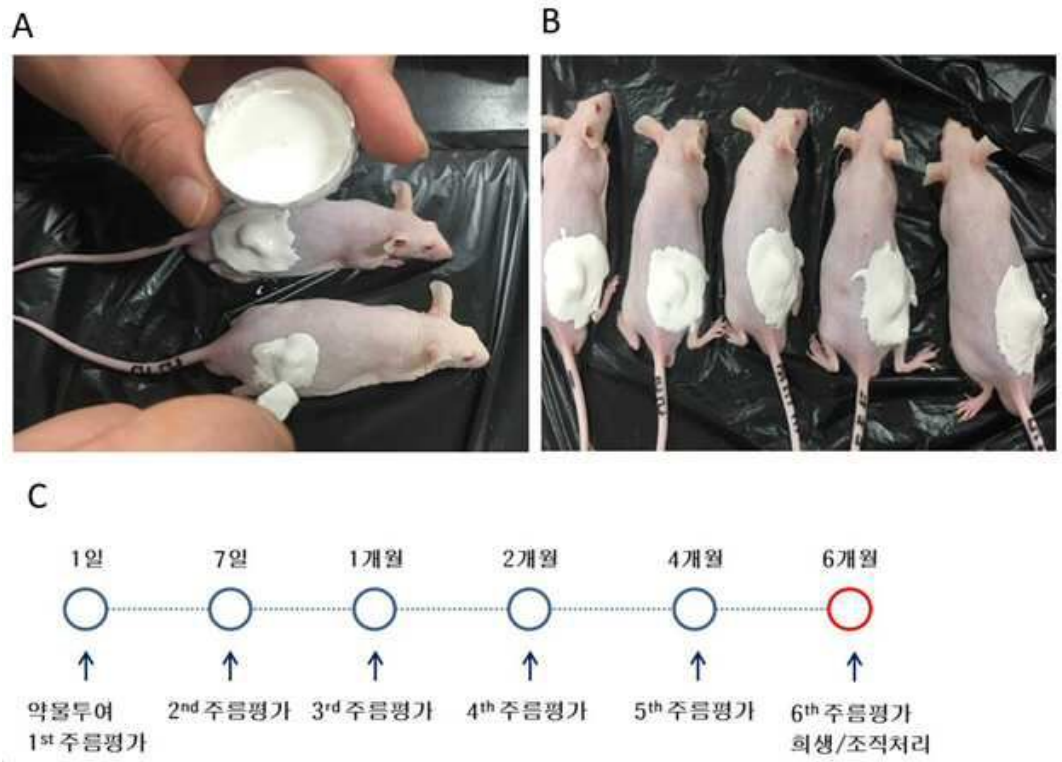
도면2


250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
Complex Viscosity(Pa.s)
HA content(mg/mL)
y = 26.662x - 332.65
R² = 0.9338
y = 9.3558x - 81.214
R² = 0.9729
y = 5.7689x - 53.398
R² = 0.9627
y = 1.8758x - 11.544
R² = 0.986
y = 0.6059x - 4.3704
R² = 0.8149
0.050
0.075
0.100
0.150
0.200

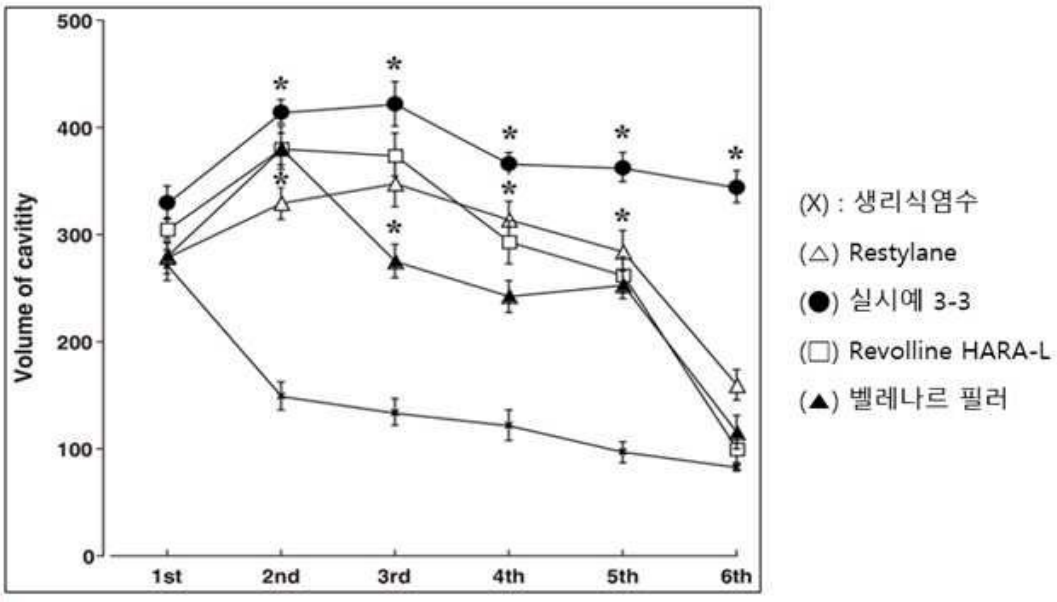
도면3


A
B

도면4

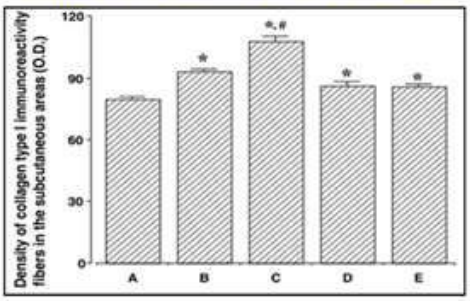

A
B
C
1일
7일
1개월
2개월
4개월
6개월
약물투여
1st 주름평가
2nd 주름평가
3rd 주름평가
4th 주름평가
5th 주름평가
6th 주름평가
희생/조직처리

도면5

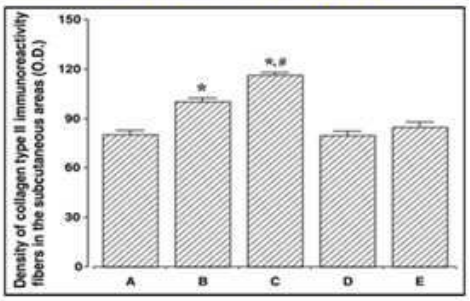

Volume of cavitity
500
400
300
200
100
0
1st
2nd
3rd
4th
5th
6th
(X) : 생리식염수
(△) Restylane
(●) 실시예 3-3
(□) Revolline HARA-L
(▲) 벨레나르 필러

도면6

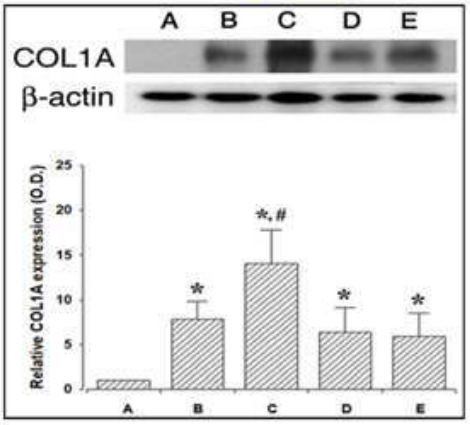
면역조직화학법 (Collagen Type 1 Fiber)



면역조직화학법 (Collagen Type 2 Fiber)



웨스턴 블롯팅 (Collagen Type 1 Fiber)



웨스턴 블롯팅 (Collagen Type 2 Fiber)

