



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0038047
 (43) 공개일자 2016년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인 테옥산 스위스 105 씨에이치-1203 제네바 뤼 드 리옹 레 샤르미흐
A61K 31/451 (2006.01) A61K 31/167 (2006.01)	
A61K 31/445 (2006.01) A61K 31/728 (2006.01)	
A61K 8/49 (2006.01) A61K 8/73 (2006.01)	
A61Q 19/08 (2006.01)	
(52) CPC특허분류	(72) 벌명자 뷔호동, 프랑수아 프랑스, 에프-74240 가이야흐, 레지당스 르 베르 나, 3 알레 데 이리스 뇌니에, 스텔판 프랑스 에프-01710 뚜아리, 38 뤼 뒤 클로 데 트 레브
A61K 31/451 (2013.01)	
A61K 31/167 (2013.01)	
(21) 출원번호 10-2016-7005500	
(22) 출원일자(국제) 2014년07월29일	
심사청구일자 없음	
(85) 번역문제출일자 2016년02월29일	
(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/063503	(74) 대리인 특허법인필엔온지
(87) 국제공개번호 WO 2015/015407	
국제공개일자 2015년02월05일	
(30) 우선권주장	
13/954,360 2013년07월30일 미국(US)	

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 히알루론산 및 메피바카인을 포함하는 조성물

(57) 요 약

- (a) 적어도 유효량의 히알루론산 또는 이의 염; 및
- (b) 마취제로 적어도 유효량의 메피바카인 또는 이의 염을,
이를 필요로 하는 환자에게 적어도 주사로 투여하는 단계를 포함하며,
상기 메피바카인은 히알루론산 전에 또는 히알루론산과 동시에 투여되는 방법.

(52) CPC특허분류

A61K 31/445 (2013.01)

A61K 31/728 (2013.01)

A61K 8/4926 (2013.01)

A61K 8/735 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

A61K 2800/91 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 적어도 유효량의 히알루론산 또는 이의 염; 및
- (b) 마취제로 적어도 유효량의 메피바카인 또는 이의 염을,
이를 필요로 하는 환자에게 적어도 주사로 투여하는 단계를 포함하며,
상기 메피바카인은 히알루론산 전에 또는 히알루론산과 동시에 투여되는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, (i) 피부의 외관, (ii) 생활 연령의 피부 신호 및/또는 스트레스, 공해, 담배 또는 자외선(UV)에 지속적인 노출과 같은 외부 요소들에 의해 유도되는 피부의 신호, (iii) 피부의 손상된 외관, (iv) 피부의 손상된 점탄성 또는 생체역학적 특성들, (v) 피부 불륨 결점의 오래 지속되는 채움(filling)을 위한 예방 및/또는 치료를 위한, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 잇몸의 구조 및 형태 및 뼈조직에서 결손 및 결합의 부위를 치료하기 위한, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 여기서 상기 히알루론산 또는 이의 염은 메피바카인 또는 이의 염과 동시에 투여되는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 여기서 상기 방법은 (c) 적어도 평형 염류 용액을 상기 히알루론산 및/또는 메피바카인과 동시에, 상기 환자에 투여하는 단계를 적어도 더 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 여기서 상기 히알루론산은 가교결합된 히알루론산, 비-가교결합된 히알루론산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 여기서 메피바카인의 염은 메피바카인 염산염인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 여기서 메피바카인 또는 이의 염은 용액으로 존재하며, 메피바카인 또는 이의 염의 유효량이 상기 용액 총 중량 대비 0.05 내지 3 중량%의 범위인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 방법은 적어도 리도카인 또는 이의 염의 투여를 더 포함하는, 방법.

청구항 10

적어도 히알루론산 또는 이의 염의 유효량을 포함하고, 마취제로 적어도 메피바카인 또는 이의 염의 유효량을 포함하는 멀균되고 주사가능한 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 여기서 상기 히알루론산은 평균분자량 범위 50,000 내지 10,000,000 달톤을 갖는, 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 여기서 상기 히알루론산은 가교결합된 히알루론산, 비-가교결합된 히알루론산 및 이들의 혼합물에서 선택된, 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서, 여기서 상기 조성물은 상기 조성을 총 중량 대비 0.1 내지 5 중량%의 히알루론산을 포함하는, 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서, 여기서 상기 히알루론산은, 가교결합된 때에, 변형도가 0.1 내지 20% 범위를 가지는, 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서, 여기서 상기 조성물은 상기 조성을 총 중량에 기초하여, 마취제(들) 0.01 내지 5 중량%를 포함하는, 조성물.

청구항 16

제10항에 있어서, 여기서 상기 조성물은 적어도 평형 염류 용액(balanced salt solution)을 더 포함하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 여기서 상기 평형 염류 용액은 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 완충 용액인 조성물.

청구항 18

제10항에 있어서, 여기서 상기 조성물은 알파-리포산; N-아세틸-L-시스테인; 환원된 글루타치온; L-아르기닌, L-이소류신, L-류신, 일수소화 L-리신, 글리신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린과 같은 아미노산; 피리독신 염산 염; 무수화된 아연 아세테이트; 황산구리 5수화물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 화합물을 더 포함하는, 조성물.

청구항 19

- a) 적어도 하나의 히알루론산 또는 이의 염의 겔을 준비하는 단계, 상기 히알루론산은 가교결합된 히알루론산 형태, 비-가교결합된 히알루론산 형태 또는 이의 혼합물 중에서 선택되며;
 - b) 상기 히알루론산의 겔에 마취제로 적어도 메피바카인 또는 이의 염을 추가하는 단계; 및
 - c) b) 단계에서 얻어진 혼합물을 멸균하는 단계를 적어도 포함하는,
- 멸균되고 주사가능한 조성물을 제조하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 여기서 상기 단계 c)는 120 내지 140°C 범위의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 여기서 상기 히알루론산은 평균 분자량 범위 50,000 내지 10,000,000 달톤을 갖는, 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 여기서 상기 단계 a)의 가교결합된 히알루론산은 1,4-부탄다이올 디아글리시딜 에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE)), 1,4-비스(2,3-에폭시프로포록시)부탄(1,4-bis(2,3-epoxypropoxy)butane), 1,4-비스글리시딜옥시부탄(1,4-bisglycidyloxybutane), 1,2-비스(2,3-에폭시프로포록시)에틸렌(1,2-bis(2,3-epoxypropoxy)ethylene), 1-(2,3-에폭시프로필-2,3-에폭시사이클로헥산, 내생 폴리아민, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 가교제의 유효량을 이용하여 비-가교결합된 히알루론산을 가교결합시켜 사전에 획득되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 히알루론산 또는 이의 염을 포함하는 멸균되고 주사가능한 조성물 분야에 관한 것이며, 특히 치주 조직(periodontal tissue)을 포함하는, 연조직(soft tissue)의 증강(augmentation) 및/또는 회복용, 그리고 특히 피부와 같은 케라틴 성분의 결점(defect) 및 결함(imperfection)의 치료(treatment)용, 연조직 필러 조성물 분야에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 상처 및 주름과 같은 피부 결점을 바로 잡거나 피부, 특히 얼굴 피부의 외관을 향상시키기 위하여 조직을 증강시키기 유용한 조성물들을 개발하기 위한 노력들이 있었다. 그러한 결점들을 바로잡기 위해 적용되는 주요 방법은 원하거나 목적으로 하는 조직 증강에 가장 가깝게 피부의 진피충안으로 필러(filler) 조성물을 주사하는 것을 포함한다.

[0003] 히알루론산은 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 주요 성분이다. 따라서 대다수가 주로 피부에서 발견되었다. 또한 관절 연골(articular cartilage) 조직의 주요 생리학적 구성성분이며 특히 관절 낭액(synovial fluid)에 매우 많이 존재한다.

[0004] 따라서, 상기 히알루론산, 이의 산 또는 염 형태는 조직 엔지니어링 분야, 그리고 특히 진피 조직 또는 잇몸 조직(gingival tissue)과 같은 다른 연조직을 위한 주사가능한 필러 물질로 많이 사용되는 생체적합 물질이다.

[0005] 히알루론산은 D-글루쿠론산(D-glucuronic acid) 및 N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine)의 반복 단위로 구성된 선형 비-황화 글리코사미노글리칸이다(Tammi R., Agren UM., Tuukkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry 29 (2): 1. -81, 1994).

[0006] 피부에서, 히알루론산은 일차적으로 피부 섬유 아세포(dermal fibroblasts) 및 표피 각질 세포(epidermal keratinocytes). 음전하를 갖는 잔기들을 통하여, 히알루론산은 피부의 탄력성(elasticity)을 유지하기 위한 수분 펌프로서 역할한다.

[0007] 게다가, ECM은 조직 구조 및 조절 역할을 갖는 다이나믹한 구조이다. 상기 ECM은 콜라겐(collagen) 및 엘라스틴(elastin)으로 이루어지고 또한 필수적인 성분, 주로 물, 미네랄 및 프로테오글리칸(proteoglycans)으로 이루어진다. 이러한 매트릭스는 피부에 긴장감(turgor) 및 견고함, 탄력성 및 톤과 같은 역학적 성질들을 부여한다.

[0008] 피부와 관련하여, 나이에 따라서 히알루론산의 양 및 이의 중합 정도가 줄어들고 결과적으로 연결 조직에 함유되는 물의 양이 감소된다는 것을 알아야 한다.

[0009] 한편, ECM 구성성분들은 분해되며, 주로 매트릭스 메탈로프로테인네이즈(matrix metalloproteinases) 또는 MMPs로 불리는 엔도펩티다아제(endopeptidase) 유형의 효소들에 의해 분해된다.

[0010] 최종적으로, 세포 방어의 감소는 산화 스트레스와 같은 외부 스트레스에 의해 유도되는 손상 및 장애를 증가시킨다.

[0011] 피부는 그 다음 특히 피부의 케라틴성 물질의 결점 및 흠이 나타나는 노화 과정을 겪게 된다.

[0012] 주름 필러의 분야에서, 화학적으로 가교가 일어나는 경우, 주로 히알루론산으로 이루어진 젤은 매개체(ride)에 의해 우울증 약(depression dug)을 채우기 위하여 피부내부에 주사되어진다. 가교결합은 피부 내에 산물(product)들의 잔류를 증가시킬 수 있다. 히알루론산에 기초한 그러한 젤들은, 필요할 경우 가교되고, 이들은 진공 피부 주름(vacuum skin wrinkle)에 기인하는 필러의 기계적 효과에 의해 주름의 감소를 허용한다.

[0013] 그러나, 그러한 젤의 주사는 종종 환자에게 통증을 유발하고 이러한 느낌은 젤이 점성 및/또는 탄력이 커질수록 더욱 악화된다.

[0014] 오늘날, 이러한 기술적 문제를 극복하기 위하여, 히알루론산에 기초한 주요 필러들은 환자에게 편안함을 주기 위하여 국소 마취제(anesthetic agent)와 함께 이용한다. 이러한 국소 마취제는 약 0.3%의 리도카인(lidocaine)이 유일하다.

[0015] 그러나, 리도카인은 문제점들을 나타내고 있는 것으로 알려져 있는데, 그것의 혈관확장 특성(vasodilatory

properties)으로. 환자의 체내로 너무 빠르게 흡수되며 때때로 혈종의 발생을 악화시키며, 눈으로 분명히 드러나는 심미적 이유로, 가능한 사용이 꺼려지고 있다. 상기 언급된 문제점들을 극복하기 위한 해결책은 리도카인을 혈관수축약(vasoconstrictor), 특히 에피네프린(epinephrine)과 함께 사용하는 것을 포함할 수 있다 (J. Endod. 2013 May; 39(5):597-9). 그러나, 에피네프린과 같은 혈관수축약의 존재는 환자에게 항상 활성을 나타내지 않도록 하고 알러지를 유발하지 않는 첨가제를 추가할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016]

그러므로, 주사하는 동안 환자에게 고통을 유발하는 상기 언급된 기술적인 문제점을 극복하고 알러지나 혈종 발생을 악화시키지 않는 화학적으로 가교결합이 일어나는, 주로 히알루론산을 포함하는 젤의 개발이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0017]

일 측면에 따르면, 본 발명은 (a) 적어도 유효량의 히알루론산 또는 이의 염; 및 (b) 마취제로 적어도 유효량의 메피바카인 또는 이의 염을, 이를 필요로 하는 환자에게 적어도 주사로 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이며, 상기 메피바카인은 히알루론산 전에 투여되거나 또는 히알루론산과 함께 투여된다.

[0018]

구체적인 측면에 따르면, 본 발명의 방법은 연조직 증강에 관련된다.

[0019]

상기 타겟 조직은 피부뿐만 아니라 잇몸 조직(gingival tissue)일 수 있다.

[0020]

더 구체적으로, 본 방법은 (i) 피부의 외관 치료 및/또는 예방용으로 효과적일 수 있다.

[0021]

본 방법은 따라서 (ii) 생활 연령(chronological aging) 및/또는 스트레스, 공해, 담배 또는 자외선(UV)에 지속적인 노출과 같은 외부 요소들에 의해 유도되는 피부의 신호(cutaneous signs) 예방 및/또는 치료에, (iii) 피부의 손상된 외관 예방 및/또는 치료에, (iv) 피부의 손상된 점탄성(viscoelastic) 또는 생체역학적(biomechanical) 특성을 예방 및/또는 치료에, (v) 피부 볼륨 결점의 오래 지속되는(long-lasting) 채움(fillings), 특히 주름의 채움을 위해 유리하게 이용될 수 있다.

[0022]

게다가, 본 발명의 방법은, 임플란트, 크라운, 브릿지 등을 포함하나, 이들에 제한되지 않는, 치과 보철의 조화(fit) 및 기능(function) 향상을 위해, 잇몸 구조 및 형상 그리고 치아 결손, 연령 증가, 치주 질환 및 장애, 치주 외상 및 치아 이식 후에 발생할 수 있는 뼈 조직의 결손 및 결함 부위 치료용으로 유리하게 이용될 수 있다.

[0023]

다른 실시예에 따르면, 본 발명의 방법은 또한 연골 재생에 유용하게 이용될 수 있다.

[0024]

다른 실시예에 따르면, 본 발명의 방법은 관절염(arthritis) 치료로 이용될 수 있다.

[0025]

마지막으로, 히알루론산은 안구에 위치하는 천연 액체와 유사한, 두꺼운 투명한 액체이다. 따라서, 이미 수술하는 동안 눈의 액체 볼륨을 유지하기 위하여 제안되어져 왔다. 따라서 본 발명의 방법은 또한 백내장 추출(cataract extraction), 인공 수정체(IOL) 삽입 및 제거, 각막(corneal) 수술, 녹내장(glaucoma) 수술, 외상 수술, 눈 성형 수술(ocular plastic surgery) 및 근육 수술을 포함하는, 대부분의 안과의 안구내의 수술(intraocular surgeries)에 유용하다.

[0026]

두번째 측면에 따르면, 본 발명은, 적어도 유효량의 히알루론산 또는 이의 염을 포함하고, 마취제로 적어도 유효량의 메피바카인 또는 이의 염을 포함하는, 멸균되고 주사가능한 조성물, 더 구체적으로 연조직 필러 조성물에 관한 것이다.

[0027]

마지막으로, 다른 측면에 따르면, 본 발명은 멸균되고 주사가능한 조성물, 더 구체적으로 연조직 필러 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 적어도 다음의 단계를 포함한다:

[0028]

a) 히알루론산 또는 이의 염의 적어도 하나의 젤을 제공하는 단계, 상기 히알루론산은 가교결합된 히알루론산 형태, 비-가교결합된 히알루론산 형태 또는 이의 혼합물중에서 선택된 히알루론산이며;

[0029]

b) 마취제로 적어도 메피바카인 또는 이의 염을 히알루론산의 상기 젤에 추가하는 단계; 및

[0030]

c) 단계 b)에서 얻어진 혼합물을 멸균하는 단계.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 연조직(soft tissue)의 증강(augmentation) 및/또는 회복용, 그리고 특히 피부와 같은 케라틴 성분의 결점(defect) 및 결함(imperfection)의 치료(treatment) 효과가 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 일 측면에 따르면, 본 발명은 (a) 적어도 유효량의 히알루론산 또는 이의 염; 및 (b) 마취제로 적어도 유효량의 메피바카인 또는 이의 염을, 이를 필요로 하는 환자에게 적어도 주사로 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이며, 상기 메피바카인은 히알루론산 전에 투여되거나 또는 히알루론산과 함께 투여된다.

[0033] 본 발명의 발명자들은 본 발명에 따른 방법은 특히, 리도카인과 함께 히알루론산을 이용하는 것을 고려하는 피부의 외관(surface appearance) 예방용 및/또는 치료용으로 현재 방법을 대신하여 실행가능한 대안이 될 수 있을 뿐만 아니라, (i) 잇몸 구조 및 형태 그리고 뼈 조직의 결손 및 결점 부위를 치료하기 위한, (ii) 안과의 안구내의 수술을 위한, (iii) 연골의 재생을 위한 그리고 (iv) 관절염 치료를 위한 방법을 대신하여 실행가능한 대안이 될 수 있다.

[0034] 우선, 리도카인에 반해, 메피바카인은 리도카인보다는 뚜렷한 혈관 확장 특성을 나타내지 않는다.

[0035] 게다가, 메피바카인은 pKa 7,6을 나타내지만 반면에 리도카인은 pKa 7,9를 갖는다.

[0036] 그러므로, 리도카인보다 더 낮은 pKa 갖는 메피바카인은, 더 우수한 지질 용해성을 가지며, 이는 지질 막(lipid barrier)을 통한 확산을 향상시킨다. 그러므로, 메피바카인은 리도카인보다 더 빠르게 흡수될 수 있다는 사실 때문에, 메피바카인은 주사과정 동안 고통을 예방하는데 더 적절하다.

[0037] 하지만 무엇보다, 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명에 따른 필러 조성물, 즉, 마취제 메피바카인을 포함하는, 은 히알루론산 젤의 안정성에는 뚜렷한 영향을 미치지 않고 멸균시킬 수 있다는 점을 밝혔다.

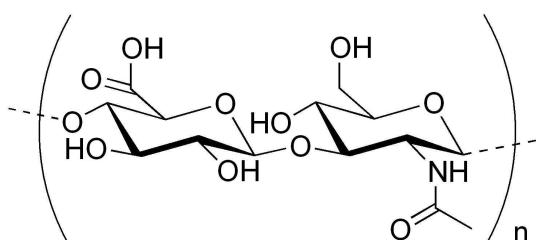
[0038] 히알루론산 젤은 특히 멸균을 위해 필요한 열처리에 민감하며 이러한 낮은 안정성은 마취제와 같은 성분들의 존재에 의해 증가될 수 있다. 놀랍게도, 이러한 목적으로 하지 않은 현상은 다음의 실시예 1 및 2에서 나타나는 바와 같이, 리도카인과 비교하여 메피바카인에서 분명히 더 적다. 게다가, 본 발명의 발명자들은 이후 확인할 실시예 3에서 볼 수 있듯이, 시간에 따른 안정성 측면에서 본 발명에 따른 조성물은 이러한 요구를 더 만족한다는 것을 확인하였다.

[0039] 본 발명자들에 따르면, 히알루론산을 포함하는 연조직 필러 조성물에서 상기 언급한 이러한 유리한 효과들의 현상들은 알려지지 않았다.

[0040] 바람직하게, 상기 히알루론산 또는 이의 염은 메피바카인 또는 이의 염과 동시에 투여된다.

[0041] 바람직하게, 주사에 의한 투여는 표피(intraepidermal) 및/또는 진피(intradermal) 및/또는 피하(subcutaneous) 주사로 투여된다. 그러나, 또한 잇몸(gingival), 관절(articular) 및 안내(intraocular) 경로로 투여될 수 있다.

히알루론산



[0043]

[0044] 상기 언급한 히알루론산(또한, 히알루론난(hyaluronan), 또는 히알루로네이트(hyaluronate)로도 불리는)은 D-글루코로닉산 및 N-아세틸-D-글루코사민의 반복단위로 구성되는 선형 비-황화 글리코사미노글리칸이다 (Tammi R., Agren UM., Tuhkanen AL., Tammi M. Hyaluronan metabolism in skin. Progress in Histochemistry & Cytochemistry 29 (2): 1. -81, 1994).

[0045]

피부에서, 히알루론산은 주로 피부 섬유 아세포 및 표피 각질세포에 의해 합성된다(Tammi R., 상기 인용됨). 음

전하를 띠는 이들의 잔기를 통하여, 히알루론산은 피부의 탄력성을 유지하기 위한 수분 펌프로서 역할을 한다.

[0046] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명은 엄밀하게 히알루론산의 적용 뿐만 아니라 이의 염의 적용도 고려한다.

[0047] 그러므로, 본 발명에 따른 히알루론산은 더 구체적으로 나트륨염, 칼륨염, 아연염, 은염 및 이의 혼합물과 같은 생리학적으로 허용 가능한 염들로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 나트륨염일 수 있다.

[0048] 바람직하게, 본 발명에 따른 히알루론산은 높은 평균 분자량을 가지며, 바람직하게 50,000 내지 10,000,000 달톤(Daltons), 바람직하게 500,000 내지 4,000,000 달톤(Daltons) 범위를 가진다.

[0049] 특히 바람직한 히알루론산의 염은 히알루론산 나트륨(sodium hyaluronate(NaHA))이다.

[0050] 상기 언급된 바와 같이, 히알루론산은 유효량을 주사로 투여한다.

[0051] 히알루론산의 "유효량(effective amount)"은 목적으로 하는 기술적 효과를 얻기 위해 적절한 양이며, 특히 피부의 외관에 눈으로 확인할 수 있는 결과를 가져올 수 있는 양이다. 특히, 히알루론산의 유효량은 피부의 볼륨 결점을 채우기 위해 적절한 양의 히알루론산이며, 특히 주름을 채우기 위한 양이다.

[0052] 히알루론산의 양을 조정하는 것은 통상의 기술자들의 기능 범위 내이다.

[0053] 유리하게, 본 발명에 따른 방법에서 히알루론산 또는 이의 염은 용액(solution)으로 존재한다.

[0054] 이것과 관련하여, 히알루론산의 유효량은 히알루론산 또는 이의 염을 포함하는 상기 용액의 총 중량 대비 0.1 내지 5 중량% 범위, 바람직하게 1 내지 3 중량% 범위일 수 있다.

[0055] 구체적인 실시예에 따르면, 상기 히알루론산은 가교결합되지 않은 형태로 존재할 수 있다.

[0056] 본 발명의 목적을 위하여, 상기 용어 "가교결합되지 않은(uncrosslinked)" 또는 "비-가교결합된(non-crosslinked)"은 본 명세서 내에서 가교결합되지 않은 또는 약간 가교결합된 히알루론산의 젤을 의미하는 것으로 이해될 수 있으며, 즉, 이는 말하자면 1 Pa 이상의 응력(stress)을 받을 때, 1 Hz에서 동적 유연학 조건으로 측정한 위상 변이 각도(phase-shift angle) δ 가 40° 보다 더 큰 값을 갖는 젤을 말한다.

[0057] 다른 구체적인 실시예에 따르면, 상기 히알루론산은 가교결합된 형태로 존재할 수 있다.

[0058] 다른 구체적인 실시예에 따르면, 상기 히알루론산은 가교결합된 형태 및 비-가교결합된 형태로 존재할 수 있다.

[0059] 이와 관련하여, "가교결합된 히알루론산/비-가교결합된 히알루론산"의 중량비는 바람직하게 1보다 더 크다.

[0060] 구체적인 실시예에 따르면, 히알루론산을 포함하고 투여될 수 있는 용액은,

[0061] - 가교결합된 젤 형태의 히알루론산 50 내지 99 중량%, 더 바람직하게 70 내지 95 중량%,

[0062] - 유리 형태 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염 형태의 히알루론산 1 내지 50 중량%, 바람직하게 5 내지 30 중량%,

[0063] 상기 가교결합된 히알루론산 젤 및 유리 히알루론산의 중량비는 1:1 내지 1:0.02의 중량비로 포함할 수 있다.

[0064] 상기 히알루론산이 가교결합된 형태일 때, 상기 가교결합된 히알루론산은 바람직하게 0.1 내지 20%, 바람직하게 0.4 내지 10% 범위의 변형도를 갖는다.

[0065] "변형도(degree of modification)"가 본 발명에서 의미하는 것은, 히알루론산에 부착된 가교제의 몰수와 상기 가교결합된 히알루론산 젤을 형성하는 히알루론산의 몰수 사이의 비율이다. 이 값은 가교결합된 젤의 1D 1H NMR 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0066] "히알루론산의 몰수"가 의미하는 것은 히알루론산의 반복되는 이당류 단위(disaccharide unit)의 몰수를 의미하며, 이당류 단위는 교대로 베타-1,4 및 베타-1,3 글리코시드 결합(glycosidic bonds)에 의해 연결된 D-글루코스 및 D-N-아세틸글루코사민으로 구성된 것을 의미한다.

[0067] 상기 변형도는 특히 이후에 개시된 바와 같이 평가될 수 있다.

[0068] 상기 히알루론산의 변형도의 특성화(characterizing)는 NMR 분광법에 의해 수행된다(400 MHz (^1H)에서 작동되는 spectrometer Bruker Avance 1).

[0069] BDDE에서, 변형도는 히알루론산에서 ^1H NMR N-아세틸 그룹 ($\delta \approx 2 \text{ ppm}$)의 신호 존재 및 가교제에서 신호 존

재(두개의 -CH₂- 그룹, δ ≈ 1.6 ppm)의 적분으로 얻어진다. 이들 두 신호(가교제/NaHA)의 적분비는 각각의 신호에 연결된 양성자의 수를 수정한 후에 변형도와 관계된다.:

$$\text{변형도(Degree of modification)} = \frac{\left[\frac{\text{Integral } \delta_{\text{H}1.6}}{4} \right]}{\left[\frac{\text{Integral } \delta_{\text{H}2.0}}{3} \right]}$$

[0070]

[0071] 가교제(Crosslinking agent)

[0072]

용어 "가교제(crosslinking agent)"는 히알루론산의 많은 사슬들 사이에 가교결합을 유도할 수 있는 어떤 화합물들이든 가교제를 의미하는 것으로 이해될 수 있다.

[0073]

이러한 가교제의 선택은 분명히 업계의 통상의 기술자들의 통상의 범위에 속하는 것은 분명하다.

[0074]

본 발명에 다른 가교제는 이관능성(difunctional) 또는 다관능성(multifunctional) 에폭시(epoxy) 가교제뿐만 아니라 예를 들어 헥사메틸렌디아민(hexamethylenediamine (HMDA)) 또는 내생 폴리아민과 같은 폴리아민들로부터 선택될 수 있다.

[0075]

본 발명의 범위에서 "내생 폴리아민(endogenous polyamine)"의 의미는 살아있는 유기체 및 구체적으로 인간 신체에 자연적으로 존재하는 폴리아민을 의미한다. 내생 폴리아민의 대표적인 예들은 특히 푸트레신(putrescine (또는 1,4-디아미노부탄), 스페미딘(spermidine (또는 1,8-디아미노-5-아자옥탄)) 및 스페르민(spermine (1,12-디아미노-5,9-디아자도데칸))과 같은 진핵생물 동물에서 언급된 것일 수 있으며, 바람직하게 스페르민일 수 있다.

[0076]

더 구체적으로, 본 발명에 따른 가교제는 바람직하게 1,4-부탄다이올 디아글리시딜 에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE)), 1,4-비스(2,3-에폭시프로포록시)부탄(1,4-bis(2,3-epoxypropoxy)butane), 1,4-비스글리시딜옥시부탄(1,4-bisglycidyloxybutane), 1,2-비스(2,3-에폭시프로포록시)에틸렌(1,2-bis(2,3-epoxypropoxy)ethylene) 및 1-(2,3-에폭시프로필-2,3-에폭시사이클로헥산(1-(2,3-epoxypropyl)-2,3-epoxycyclohexane), 내생 폴리아민, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0077]

바람직하게, 본 발명에 따른 가교제는 1,4-부탄다이올 디아글리시딜 에테르(1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE))이다.

[0078]

구체적인 실시예에서, 여기서 가교제는 폴리아민이며 더 구체적으로 내생 폴리아민이고, 히알루론산과 커플링 반응은 적어도 하나의 활성제(activator)의 존재하에서 수행될 수 있으며 적어도 하나의 보조 커플링(auxiliary coupling)과 관련되어 발생될 수 있다.

[0079]

이와 관련하여, 상기 활성제는 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)), 1-에틸-3-(3-25트리메틸아미노프로필)카르보다이이미드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-25 trimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (ETC)), 1-사이클로헥실-3-(2-모르필리노에틸)카르보다이이미드(1-cyclohexyl-3-(2-morphilinoethyl)carbodiimide (CMC)) 및 이의 염, 및 이들의 혼합물과 같은 수용성 카르보다이이미드(carbodiimides)로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 EDC로 나타낼 수 있다.

[0080]

상기 보조 커플링과 관련하여, 그것이 존재할 때, 그것은 N-하이드록시 석신이미드(N-hydroxy succinimide (NHS)), N-하이드록시벤조트리아졸(N-hydroxybenzotriazole (HOEt)), 3,4-다이하이드로-3-하이드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아졸(3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazole (HOOEt)), 1-하이드록시-7-7아자벤조트리아졸(1-hydroxy-7-7azabenzotriazole (HAt)) 및 N-하이드록시실포석신이미드(N-hydroxysulfosuccinimide (설포(sulfo) NHS)), 및 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 HOEt로 나타낼 수 있다.

[0081]

상기 가교제는 유효량으로 이행될 수 있다.

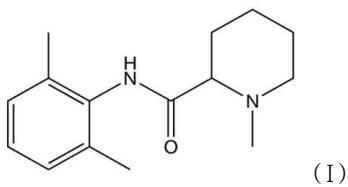
[0082]

가교제의 "유효량"은 히알루론산의 적절한 가교도(degree of crosslinking)를 수득할 수 있을 정도로 적절한 양이다.

[0083]

상기 가교제의 양을 조정하는 정도는 업계의 통상의 기술자들의 통상적인 업무 범위 내에 속한다.

- [0084] 유리하게, 가교제의 유효량은 히알루론산 또는 이의 염의 총 중량 대비 0.05 내지 15 중량%의 범위일 수 있다.
- [0085] 유리하게, 히알루론산이 가교결합될 때, 그리고 상기 가교제가 BDDE 일 때, nBDDE/n 히알루론산의 몰비는 0.01 내지 0.5 사이, 바람직하게 0.04 내지 0.25 사이 범위일 수 있다.
- [0086] 마취제(Anesthetic agent)
- [0087] 본 발명에 따른 마취제는 주사하는 동안 및/또는 이후에 환자가 겪는 통각(pain sensation)을 감소하거나 제거하는 특히 유리하다.
- [0088] 더욱이, 본 발명에 따른 마취제는 본 발명에 따른 조성물에 사용되는 다른 화합물, 특히 히알루론산과 배합금기(incompatibility)의 위험성을 발생시키지 않는 화합물들 중에서 선택된다.
- [0089] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명에 따른 마취제는 메피바카인 또는 이의 염이다.
- [0090] 상기 메피바카인은 화학식 (I)의 아미노-아미드 패밀리 국소 마취제이다



- [0091]
- [0092] 상기 메피바카인은 Cook-Waite 사의 카르보카인(Carbocaine)®으로 판매되는 것으로 알려져 있다.
- [0093] 상기 메피바카인은 우수한 안정성(stability)을 갖는 화합물이다. 주요 분해산물은 2,6-다이메틸아닐린(2,6-dimethylaniline)이다. 메피바카인은 카이랄 중심(비대칭 탄소(asymmetric carbon))을 포함하는 분자이다. 따라서, R 및 S 거울상이성질체가 존재한다. 이후의 실시예들에서 메피바카인의 두 형태의 라세미 혼합물들이 고려되어진다.
- [0094] 바람직하게, 상기 메피바카인은 염 형태로 존재하며 더 구체적으로 상기 메피바카인의 염은 메피바카인 염산염(chlorhydrate)이다.
- [0095] 앞서 언급된 바와 같이, 상기 메피바카인 또는 이의 염은 유효량으로 주사로 투여된다.
- [0096] 메피바카인 또는 이의 염의 "유효량"은 주사하는 동안 및/또는 이후에 환자가 겪는 통각을 효과적으로 줄이거나 제거하는데 적절한 양이다.
- [0097] 메피바카인 또는 이의 염의 양을 조정하는 것은 통상의 기술자들의 통상적인 범위에 포함된다.
- [0098] 유리하게, 본 발명에 따른 방법에서 상기 메피바카인 또는 이의 염은 용액으로 존재한다.
- [0099] 이와 관련하여, 메피바카인 또는 이의 염의 유효량은 메피바카인 또는 이의 염을 포함하는 용액의 중량 대비 0.05 내지 3 중량% 범위일 수 있다.
- [0100] 상기 방법은 메피바카인에 메피바카인과는 다른 적어도 하나의 추가적인 마취제 또는 이의 염을 메피바카인과 결합되어 투여되는 경우를 더 포함할 수 있다.

[0101] 이러한 추가적인 마취제는 구체적으로 암부카인(ambucaine), 아몰라논(amolanone), 아밀로카인(amylocaine), 베녹시네이트(benoxinate), 벤조카인(benzocaine), 베톡시카인(betoxycaine), 비펜아민(biphenamine), 부피바카인(bupivacaine), 부타카인(butacaine), 부탐벤(butamben), 부타닐리카인(butanilicaine), 부테타민(butethamine), 부톡시카인(butoxycaine), 카르티카인(carticaine), 클로로프로카인(chloroprocaine), 코카에틸렌(cocaethylene), 코카인(cocaine), 사이클로메틸카인(cyclomethycaine), 다이부카인(dibucaine), 다이메틸소퀸(dimethysoquine), 다이메토카인(dimethocaine), 다이페로돈(diperodon), 다이사이클로닌(dycyclonine), 에크고니딘(ecgonidine), 에크고닌(ecgonine), 에틸 클로라이드(ethyl chloride), 에티도카인(etidocaine), 베타-유카인(beta-eucaine), 유프로신(euprocine) 페날코민(fenalcomine), 포르모카인(formocaine), 헥실카인(hexylcaine), 하이드록시테트라카인(hydroxytetracaine), 아이소부틸 p-아미노벤조에이트(isobutyl p-aminobenzoate), 류시노카인 메실레이트(leucinocaine mesylate), 레복사드롤(levoxadrol), 리도카인(lidocaine), 메프릴카인(meprylcaine), 메타부톡시카인(metabutoxycaine), 메틸 클로라이드(methyl chloride), 미르테카인(myrtecaine), 나에파인(naepaine), 옥타카인(octacaine), 오르쏘카인(orthocaine), 옥

세타자인(oxethazaine), 파레톡시카인(parethoxycaine), 페나카인(phenacaine), 페놀(pheno1), 피페로카인(piperocaine), 피리도카인(piridocaine), 폴리도카놀(polidocanol), 프라목신(pramoxine), 프릴로카인(prilocaine), 프로카인(procaine), 프로파노카인(propanocaine), 프로파라카인(proparacaine), 프로피노카인(propiprocaine), 프로폭시카인(propoxycaine), 슈도코카인(pseudococaine), 피로카인(pyrrocaine), 로피바카인(ropivacaine), 살리실 알코올(salicyl alcohol), 테트라카인(tetracaine), 톨리카인(tolycaine), 트리메카인(trimecaine), 졸아민(zolamine), 또는 이의 염 및 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있다.

[0102] 바람직하게, 이러한 추가적인 마취제는 리도카인 또는 이의 염이다.

[0103] 첫 번째 실시예에 따르면, 상기 추가적인 마취제는 히알루론산과 메피바카인 또는 이들의 염 이전에, 단독으로 투여된다.

[0104] 두 번째 실시예에 따르면, 상기 추가적인 마취제는 히알루론산 또는 이의 염 이전에, 메피바카인 또는 이의 염과 함께 투여된다.

[0105] 세 번째 실시예에 따르면, 상기 추가적인 마취제는 메피바카인 또는 이의 염과 히알루론산 또는 이의 염과 함께 투여된다.

[0106] 양자의 마취제들이 같은 조성물 내에 포함되는 구체적인 실시예에서, 이들은 "메피바카인/리도카인" 비율이 1:1, 바람직하게 1:0.1의 비율로 존재할 수 있다.

평형 염류 용액(Balanced salt solution)

[0108] 특정 실시예에 따르면, 본 발명의 방법은 환자에게 (c) 적어도 평형 염류 용액을 상기 히알루론산 및/또는 메피바카인, 바람직하게 메피바카인과 동시에 주사로 투여하는 단계를 적어도 더 포함할 수 있다.

[0109] 이러한 평형 염류 용액의 투여는 주사 통증을 감소시키고자 할 때 크게 관심이 있다 (see Farley J.S. et al., Regional Anesthesia A., 1994, Vol. 19: 48).

[0110] 바람직하게, 상기 평형 염류 용액은 인산 완충 용액(phosphate buffered saline), 그리고 더 구체적으로는 인산 완충 용액, 그리고 특히 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 완충 용액이다.

[0111] 구체적인 실시예에 따르면, 상기 평형 염류 용액은 알파-리포산(alpha-lipoic acid); N-아세틸-L-시스테인(N-Acetyl-L-cysteine); 환원된 글루타치온(reduced glutathion); L-아르기닌, L-이소류신, L-류신, 일수소화 L-리신(monohydrated L-Lysine), 글리신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린과 같은 아미노산; 피리독신 염산염; 무수화된 아연 아세테이트(dehydrated zinc acetate); 황산구리 5수화물(pentahydrates copper sulphate), 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나의 화합물을 더 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 조성물(Composition according to the invention)

[0113] 앞서 언급된 바와 같이, 본 발명은 또한 멸균된 주사가능한 조성물에 관한 것이며, 특히 적어도 유효량의 히알루론산 또는 이의 염을 포함하고 마취제로 적어도 유효량의 메피바카인 또는 이의 염을 포함하는 연조직 필러 조성물에 관한 것이다.

[0114] 본 발명에 내포된 "멸균된(sterile)"의 의미는 상기 언급된 투여 경로, 특히 피부 안으로 또는 피부를 통한 투여를 위한, 본 발명에 따른 조성물 내 중요한 화합물들의 안전성 요구를 보장할 수 있을 정도의 환경을 의미한다. 게다가, 분명한 이유에서, 호스트 유기체에 의도하지 않은 부작용을 개시할 수 있는 어떤 오염물질이든 없어야 하는 것은 필수적이다.

[0115] 상기 히알루론산, 가교제 및 마취제(들)은 앞서 언급된 바와 같다.

[0116] 히알루론산과 관련하여, 본 발명에 따른 조성물은 상기 조성물의 총 중량 대비 0.1 내지 5 중량%, 바람직하게 1 내지 3 중량% 포함할 수 있다.

[0117] 구체적인 실시예에 따르면, 앞서 언급된 바와 같이, 상기 히알루론산은 가교결합된 형태와 비-가교결합된 형태로 존재할 수 있다.

[0118] 이와 관련하여, "가교결합된 히알루론사/비-가교결합된 히알루론산" 비율은 바람직하게 1보다 크다.

[0119] 더 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물은

- [0120] - 50 중량% 내지 99 중량%, 더 바람직하게 70 중량% 내지 95 중량%의 가교결합된 겔의 형태의 히알루론산,
- [0121] - 1 중량% 내지 50 중량%, 바람직하게 5 중량% 내지 30 중량%의 비-가교결합된 형태의 히알루론산을 포함할 수 있으며,
- [0122] 가교결합된 히알루론산 겔과 비-가교결합된 히알루론산의 중량비는 1:1 내지 1:0.02 사이로 포함할 수 있다.
- [0123] 마취제(들)과 관련하여, 본 발명에 따른 조성물은 상기 조성물 총 중량에 근거하여, 0.01 중량% 내지 5 중량%, 바람직하게 0.05 중량% 내지 3 중량%의 마취제(들)을 포함할 수 있다.
- [0124] 주사제로서의 특성에 의할 때, 본 발명에 따른 조성물은 필연적으로(necessarily) 생리학적으로 허용가능한 매질을 포함한다.
- [0125] "생리학적으로 허용 가능한 매질(physiologically acceptable medium)"은 본 발명에서 다루어지는 상기 조성물의 주사(injection) 및/또는 이용(application)에 이용될 수 있으며 독성이 없는 매질을 의미한다.
- [0126] 상기 조성물은 용매 또는 생리학적으로 허용 가능한 용매, 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0127] 본 발명의 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 수성 매질(aqueous medium)을 포함할 수 있다.
- [0128] 본 발명에 적합한 수성 매질로는 실시예에 언급된 물을 들 수 있다.
- [0129] 본 발명에 따른 조성물의 제조에 적합한 등장성 성분(isotonic agent)으로서, 당류(sugars) 및 염화나트륨(sodium chloride)을 들 수 있다.
- [0130] 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물은 적어도 상기 언급된 평형 염류 용액을 더 포함할 수 있다.
- [0131] 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물은 알파-리포산(alpha-lipoic acid); N-아세틸-L-시스테인(N-Acetyl-L-cysteine); 환원된 글루타치온(reduced glutathione); L-아르기닌, L-이소류신, L-류신, 일수소화 L-리신(monohydrated L-Lysine), 글리신, L-발린, L-트레오닌, L-프롤린과 같은 아미노산; 피리독신 염산염; 무수화된 아연 아세테이트(dehydrated zinc acetate); 황산구리 5수화물(pentahydrates copper sulphate), 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나의 화합물을 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 상기 언급된 화합물들에 추가로, 연조직 필러 조성물의 분야에서 상호 양립되어 사용될 수 있는 적어도 하나의 추가적인 화합물을 포함할 수 있다.
- [0132] 이와 관련하여, 본 발명에 따른 조성물에 이용될 수 있는 추가적인 화합물들은 구리염, 알파-리포산, 아세틸화된 시스테인 유도체 또는 이의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- [0133] 이러한 추가적인 화합물들의 양은 논의되는 화합물의 특성, 목적으로 하는 효과, 및 본 발명에 따른 조성물의 목적에 달려있다.
- [0134] 이들 파라미터는 업계의 통상적인 기술에 속한다.
- [0135] 적어도 하나의 구리염(copper sal)을 더 포함하는 조성물은 바람직하게 상기 조성물의 총 중량 대비 0.1 내지 50 ppm의 양의 상기 구리염을 포함할 수 있다.
- [0136] 적어도 하나의 알파-리포산을 더 포함하는 조성물은 바람직하게 상기 조성물의 총 중량 대비 0.5 내지 10 000 ppm, 바람직하게 5 내지 100 ppm의 양의 상기 알파-리포산을 포함한다.
- [0137] 적어도 하나의 아세틸화된 시스테인 유도체를 더 포함하는 조성물은 상기 조성물의 총 중량 대비 0.5 내지 10 000 ppm 범위의 양의 상기 아세틸화된 시스테인 유도체를 포함한다.
- [0138] 본 발명에 사용될 수 있는 다른 추가적인 화합물들 중에서, 상기 추가적인 화합물은 상기 언급된 것들과 구별되는 추가적인 것으로, 항산화제, 아미노산, 비타민, 미네랄, 핵산, 코-엔자임, 아드레날린 유도체, 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0139] 항산화제로, 글루타치온, 엘라그산, 스페르민, 레스베라트롤, 레티놀, L-카르니틴, 폴리올, 폴리페놀, 플라보놀, 테아플라빈, 카테킨, 카페인, 유비퀴놀, 유비퀴논, 및 이들의 혼합물을 언급할 수 있다.
- [0140] 아미노산으로, 아르기닌, 이소류신, 류신, 리신, 글리신, 발린, 트레오닌, 프롤린, 프롤린, 메티오닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 트립토판, 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0141] 비타민 및 그 유도체로, 비타민 E, A, C, B, 특히 비타민 B6, B8, B4, B5, B9, B7, B12, 및 피리독신 등을 들

수 있다.

[0142] 미네랄로, 특히 아연 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 칼륨 염, 망간 염, 나트륨 염, 및 이들의 혼합물로 구성된 것들을 들 수 있다.

[0143] 핵산으로, 특히 아데노신, 시티딘, 구아노신, 티미딘, 사이토딘 및 이들의 혼합물의 유도체를 들 수 있다.

[0144] 코-엔자임으로, 코엔자임 Q10, CoA, NAD, NADP, 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.

[0145] 아드레날린 유도체로, 아드레날린, 노르아드레날린을 들 수 있다.

[0146] 게다가, 본 발명에 따른 조성물은 기술분야에서 흔히 사용되는 어떤 부형제(excipient)든 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 모노- 및/또는 다이 하이드레이트 다이하이드로젠포스페이트(dihydrogenophosphate) 소듐 및 염화나트륨과 같은 것을 생리학적 농도로 포함할 수 있다.

[0147] 일련의 처치에서 추가적인 활성 성분 및/또는 부형제들의 양은 본 발명에 따른 조성물의 논의되는 화합물의 특성, 목적으로 하는 효과, 및 목적에 달려있다.

[0148] 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물은 약 1Hz에서 측정할 때 약 5 Pa*s와 약 450 Pa*s 사이의 복합전단점도(Complex viscosity, η^*)를 가질 수 있다.

[0149] 구체적인 실시예에 따르면, 교차결합된 히알루론산으로 만들어진 본 발명에 따른 조성물은 200과 2000 Pa.s 사이의 점도, 바람직하게 1000과 1800 Pa.s 사이의 점도를 가질 수 있다.

[0150] 본 발명에 따른 조성물의 점탄성 특성(viscoelastic properties)은 콘/플레이트 구조(cone/plate geometry)를 갖는 레오미터(특히 Haake RS6000)를 이용하여 측정할 수 있다(1° cone angle/35 mm diameter plate). 변형율(strain) 스캔을 실시하고, 탄성을 G' (Pa로) 및 위상 변이 각도 δ ($^\circ$ 로)를 5 Pa의 응력(stress)에 대해 측정한다.

본 발명에 따른 멸균되고 주사가능한 조성물을 제조하는 방법

[0152] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명은 또한 멸균되고 주사가능한 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이며, 더 구체적으로 연조직 필러 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 적어도 다음의 단계를 포함한다:

[0153] a) 적어도 하나의 히알루론산 또는 이의 염의 젤을 준비하는 단계, 상기 히알루론산은 가교결합된 히알루론산 형태, 비-가교결합된 히알루론산 형태 또는 이의 혼합물 중에서 선택되며;

[0154] b) 상기 히알루론산의 젤에 마취제로 적어도 메피바카인 또는 이의 염을 추가하는 단계; 및

[0155] c) b) 단계에서 얻어진 혼합물을 멸균하는 단계.

[0156] 바람직한 실시예에 따르면, 상기 메피바카인 또는 이의 염은 히알루론산의 주사가능한 형태에 추가된다.

[0157] 달리 말하면, 단계 a)에서 고려되는 히알루론산의 젤은 이미 주사가능한 용도와 상용되는, 특히 상기 고려된 응용 분야와 상용되는 히알루론산의 농도, 만약 존재한다면 가교제 잔여물들의 농도를 나타내며, 주사가능한 용도와 상용되는 생리적 및/또는 pH 조건들을 나타낸다.

[0158] 앞서 정의된 바와 같이, 추가적인 정제(purification) 공정에 의하여 히알루론산 및 메피바카인의 혼합물에서 히알루론산의 안정성에 영향을 미칠 위험성은 놀랍게도 분명하게 감소된다.

[0159] 유리하게 상기 혼합물은 오로지 한번의 멸균 과정을 겪는다. 이 단계는 바람직하게, 그것의 운송 장치에 이미 포장된 상태인 혼합물에 대해 수행되며, 일반적으로 이후에 설명하겠지만, 일반적으로 시린지(syringe)이다.

[0160] 유리하게, 멸균 단계는 열적 수단에 의해 수행될 수 있다.

[0161] 유리하게, 멸균은 온도 범위 120 내지 140°C에서 수행된다.

[0162] 특히, 멸균 단계는 $F_0 > 15$ (멸균값)을 얻기 위하여, 오토클레이브(습열) $T^\circ \geq 121$ °C에서 수행될 수 있다.

[0163] 이와 관련하여, 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 이러한 멸균 단계에서 높은 저항성을 드러내는 것들에서 흥미롭게도 특히 유리하다.

[0164] 게다가, 실시예 1 및 2에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 따른 조성물에 멸균에 의해 생성된 G' 손실은 메피바카인 대신에 리도카인을 포함하는 조성물에서 덜하다.

- [0165] 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명에 따라 히알루론산 젤을 제조하는 방법은 상기 언급되어진 바와 같이, 추가적인 마취제 또는 이의 염, 메피바카인 또는 이의 염과는 다른, 바람직하게 리도카인 또는 이의 염을 추가하여 이루어지는 단계 d)를 더 포함할 수 있고, 상기 단계 d)는 상기 b) 단계 전에, 동시에 및/또는 이후에 수행된다.
- [0166] 단계 a)에서 다루어지는 젤이 가교결합된 히알루론산 형태를 포함할 때, 이 마지막에 남은 것은 히알루론산의 비가교결합된 형태로부터 미리 획득되어질 수 있다.
- [0167] 망상 조직은 상기 언급되어진 적어도 하나의 가교제를 이용하여 통상적인 방법으로 얻어질 수 있다.
- [0168] 가교결합을 위한 가교제 및 히알루론산을 포함하는 수상 혼합물을 유리하게, 가교결합을 실시하기 전에 균질화(homogenization)된다.
- [0169] 이러한 조작의 목적은 더 구체적으로 수상 매질에 있는 히알루론산 또는 이의 염이 더 완벽하게 수화되고 균질화되게 하기 위해서이고 따라서 기대되는 히알루론산의 젤의 특성을 최적화하는데 도움이 될 수 있다. 이러한 단계의 균질화는 히알루론산이 큰 분자량을 가질 때 더 중요한데, 왜냐하면 응집 현상이 흔하게 발견되어 그러한 화합물의 수화는 매우 높은 점도를 갖는 용액을 형성하는 경향이 있기 때문이다.
- [0170] 이러한 조작의 목적은 또한 이후에 균질화된 가교결합 반응을 확실히 하기 위하여 혼합물 내에 가교결합제를 완벽하게 균질화하기 위한 목적도 포함하고 있다.
- [0171] 균질화는 얻어진 용액이 뎅어리지지 않고 균일한 색을 가질 때 그리고, 균일한 점도를 가질 때, 충분하다고 생각된다. 상기 균질화는 히알루론산 사설의 분해를 예방하기 위하여 온화화 작동 조건하에서 유리하게 수행될 수 있다.
- [0172] 이러한 균질화 단계의 지속시간은 히알루론산 또는 이의 염의 특성에 따라 달라질 수 있으며, 더 구체적으로 분자량 및 이의 농도에 따라 달라질 수 있고, 수성 매질 내에서 작동 조건 및 사용되는 균질화 장비, 일반적으로 부드러운 기계 교반이 가능하도록 하는 장비이며, 이들에 따라 달라질 수 있다.
- [0173] 바람직하게, 균질화 단계는 200분 미만, 바람직하게 150분 미만, 또는 더 바람직하게 15분과 100분 사이의 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0174] 가교결합 반응의 목적은 점성이 있는 용액에서 빽빽한 고체 삼차원 구조의 네트워크를 얻을 수 있도록 하는 히알루론산 체인들 사이의 브릿지를 형성하기 위한 것이다.
- [0175] 가교결합 반응을 촉진하기 위해 적용될 수 있는 구체적인 조건은 히알루론산의 분자량, 수성 매질 및 가교제의 특성에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 이러한 망상구조는 예를 들어 가열하거나 UV에 노출과 같은 촉발 인자(triggering element) 또는 자극제와 접촉하여 상기 언급되어진 적어도 하나의 가교제 및 비 가교결합된 히알루론산을 포함하는 혼합물을 가져오거나, 또는 더 바람직하게 촉매 타입의 재료들과 접촉하여 상기 혼합물을 가져옴으로써 달성할 수 있다.
- [0176] 상기 촉발 인자의 선택은 업계의 통상적인 기술자의 지식 범위 내에 포함된다.
- [0177] 본 발명의 맥락에서, 이러한 촉발 인자는 유리하게 혼합물 "비-가교결합된 히알루론산/수성 매질/가교제"에 부과된 온도의 증가에 의해 나타난다.
- [0178] 상기 가교결합 반응을 위한 구체적인 적절한 온도는 35°C와 60°C 사이, 바람직하게 45 와 55°C 사이, 그리고 더 바람직하게 48 와 52°C 사이이다.
- [0179] 가교결합의 정도는 또한 "비-가교결합된 히알루론산/수성 매질/가교결합제" 혼합물에 부과된 가교결합 온도 및 가교결합 시간에 달려있다. 더 길어지는 시간은 가교결합의 정도가 더 올라가게 될 것이나, 단 히알루론산 분해 위험이 없을 정도를 초과하지 않는 최적의 조건에서 그려하다.
- [0180] 따라서, 온도 범위 35°C 내지 60°C에서, 가교결합 반응의 시간은 30 내지 300분에 걸쳐 수행될 수 있으며, 바람직하게 100 내지 200분에 걸쳐, 그리고 더 바람직하게 150 내지 190 분에 걸쳐 수행될 수 있다.
- [0181] 바람직하게, 가교결합 조건은, 형성된 가교결합된 히알루론산의 젤이 점성, 점탄성 젤(viscoelastic gel), 또는 심지어 솔리드 젤(solid gel)이 되는 가교도를 얻을 수 있도록 조정하는 것이다.
- [0182] 가교결합 반응을 멈추기 위해서는 가교결합된 젤, 또는 가교결합 동안 또는 그것을 포함하는 용기를 가교결합을

멈추기 적합한 환경 또는 심지어 다양한 히알루론산 사슬들 사이의 결합 형성을 멈출 수 있는 조건에 노출시키는 단계가 필요하다.

- [0183] 예를 들어, 가교결합 과정을 자극하기 위해 적용될 수 있는 온열조건(thermal conditions)과 관련하여, 가교결합은 다음에 의해 중단될 수 있다:
- 간단하게 항온조로부터 용기를 제거하고 그것을 실온으로 되돌아올때까지 식힘으로써;
 - 차가운 물이 담긴 수조에 용기를 위치시킴으로써, 바람직하게 실온 이하의 온도에서 상기 용기 내의 온도가 실온에 다다를때까지; 또는
 - 상기 용기로부터 젤을 추출함으로써.
- [0187] 구체적인 실시예에 따르면, 균질화 및 가교결합은 WO 2010/131175에 기술된 바와 같이, 촉진(palpation)에 의해 적어도 손으로 변형될 수 있는, 적어도 부분적으로 변형될 수 있는 벽에 의해 범위가 지어지는, 바람직하게 변형가능한 파우치 안에 만들어진, 밀폐된 공간안에서 수행될 수 있다.
- [0188] 가교결합 단계의 마지막에 얻어진 젤은 일반적으로 직접적으로 주사될 수 없는데, 구체적으로 그것의 높은 히알루론산 농도 및/또는 가교제 잔여물의 존재 가능성 또는 앞서 고려된 적용 분야들에서의 용도와 상용될 수 있는 생리학적 및/또는 pH 조건들 때문이다.
- [0189] 게다가, 몇몇의 젤들은 장성도(stiffness)가 너무 높아서 환자들에게 주사할 수 없을 수 있다. 그러므로, 몇 가지 업계의 통상의 기술자들에게 잘 알려져 있는 추가적인 단계들이 주사가능한 하이드로겔(hydrogel)을 획득하기 위해 수행될 수 있다. 더 구체적으로, 이러한 젤을 중성화(neutralizing)하고 확장시키는(expanding) 단계는 주입할 수 있는 특성을 주기 위하여 필요하다. 상기 히알루론산 네트워크의 사슬은 그 다음 확장되고 수화되며, 진피의 pH에 해당하게 된다.
- [0190] 상기 젤을 보호하고 재고밀도화(redensifying)하는 단계는, 업계의 통상의 기술자들의 노하우에 따라, 주입의 질을 더욱 향상시키기 위해 또한 수행될 수 있다. 상기 젤은 반드시 주사되는 매질에 상당하는 양에 염의 존재 덕분에 생리적으로 제제화되어질 수 있다.
- [0191] 고순도를 위하여, 추가적인 정제 단계는 또한 수행될 수 있다.
- [0192] 유리하게, 추가적인 마취제(들)을 이용하는 경우에서, 상기 메피바카인 또는 이의 염은, 상기 정의되어진 멸균 단계 바로 전에, 히알루론산의 주사가능한 형태의 제조 프로토콜의 마지막에 추가된다.
- [0193] 구체적인 실시예에 따르면, 메피바카인 및 선택적으로 추가적인 마취제(들)이 추가된 하이드로겔은 조절된 대기 조건하에서 시린지를 채우기 위하여 사용될 수 있으며, 상기 시린지는 그 다음 가능한 멸균 단계를, 바람직하게는 상기 정의된 열적 멸균 단계를 겪을 수 있다.
- [0194] 조성물의 투여**
- [0195] 본 발명에 따른 조성물은 업계에서 통상적으로 알려진 어떠한 방법에 의해서든 주사될 수 있다.
- [0196] 특히, 본 발명의 조성물은 표피 및/또는 진피 및/또는 피하에 적합한 주사 장비를 이용하여 투여될 수 있다.
- [0197] 본 발명의 조성물은 또한 잇몸, 관절 및/또는 안내 영역에 적합한 주사 장비를 이용하여 투여될 수 있다.
- [0198] 상기 주사 장비는, 특히 본 발명의 조성물이 표피 및/또는 진피 및/또는 피하에 적합한 주사 장비를 이용하여 투여될 때, 시린지, 마이크로시린지 세트, 레이저 장치, 유압 장치(hydraulic device), 주사총, 바늘없는 주입 장치, 마이크로니들을 구비한 롤링로부터 선택될 수 있다.
- [0199] 바람직하게, 상기 주입 장치는 시린지 또는 마이크로시린지 세트로부터 선택될 수 있다.
- [0200] 다른 실시예에서, 상기 주사 장치는 메조테라피(mesotherapy) 기술에 적용될 수 있다.
- [0201] 메조테라피는 표피 및/또는 진피 및/또는 피하 활성 산물(들)에 의한 치료 기술이다.
- [0202] 본 발명에 따른 표피 및/또는 진피 및/또는 피하 투입은 표피 영역, 진피-표피 및/또는 진피에 본 발명의 조성물을 주사하는 것이다.
- [0203] 상기 주사 장비는 피하 주사바늘(hypodermic needle) 또는 캐뉼라(cannula)와 같은 통상적으로 주사로 사용되는 어떠한 것이든 포함할 수 있다.

- [0204] 본 발명에 따른 바늘 또는 캐뉼라는 지름범위 18과 34 G 사이, 바람직하게 25와 32 G 사이, 그리고 길이 범위는 4 내지 70 mm에서, 바람직하게 4 내지 25 mm 범위에서 다양하게 가질 수 있다.
- [0205] 상기 바늘 또는 캐뉼라는 바람직하게 일회용이다.
- [0206] 유리하게, 상기 바늘 또는 캐뉼라는 상기 바늘 또는 캐뉼라를 통하여 상기 주사가능한 조성물을 전달할 수 있는 다른 장비 또는 시린지에 연결되어 있다. 일 실시예에 따르면, 카테터(catheter)는 바늘/캐뉼라와 시린지 사이에 삽입될 수 있다.
- [0207] 알려진 방법으로, 상기 시린지는 의사에 의해 또는 총과 같은 시린이 홀더에 의해 손으로 다루어질 수 있다.
- [0208] 특히 청구범위를 포함하여, 본 명세서 전체에서, "포함하는(comprising)"이라는 표현은, 비록 구체적으로 기술하고 있지 않더라도 "적어도 하나를 포함하는"과 동의어로 이해된다.
- [0209] "...과 ... 사이" 및 "... 내지 ...의 범위"라는 표현은 구체적으로 기술하지 않았지만, 상기 범위들은 포함된 (inclusive)다는 것을 의미하는 것으로 이해된다.
- [0210] 다음의 실시예들과 도면은 본 발명의 설명을 제한하지 않는 방법으로 이해된다.
- [0211] 실시예들:
- [0212] 재료 및 방법:
- [0213] 조성물의 점탄성 특성의 측정에 관해 이후에 정의되는 프로토콜은 다음의 실시예들에 적용된다.
- [0214] 조성물의 점탄성 특성은 콘/플레이트 구조(1° cone angle/35 mm diameter plate)를 갖는 레오미터(Haake RS6000)를 이용하여 측정된다. 변형율(strain) 스캔을 실시하고, 탄성을 G' (Pa로) 및 위상 변이 각도 δ ($^\circ$ 로)를 5 Pa의 응력(stress)에 대해 측정한다.
- [0215] 실시예 1: 비가교결합된 히알루론산을 포함하는 본 발명에 따른 조성물의 제조 프로토콜 및 멸균에 대한 안정성에 관한 분석.
- [0216] 3 g의 히알루론산(1.5MDa,) 및 197 g의 인산 완충액(FR 2 979 539)을 혼합한다.
- [0217] 제조를 위한 프로토콜은 다음과 같다:
1. 실온에서 최소 20시간 동안, 기밀용기(Nalgene jar)안에 "히알루론산+인산 완충액" 혼합물의 삼차원 균질화;
 2. 얻어진 비-가교결합된 젤을 동일한 2개의 부분으로 분리하는 단계(이하 부분 A1 및 A2라 함);
 3. 부분 A1과 관련하여, 메피바카인 용액 1 중량%(인산 완충 매질 30 중량%) 및 1% NaOH 용액 0.4 중량%를 젤에 추가하는 단계; 또는
 4. 부분 A2와 관련하여, 리도카인 용액 1 중량%(인산 완충 매질 30 중량%) 및 1%NaOH 용액 0.4 중량%를 젤에 추가하는 단계; 및
 5. 균질화, 주사를 위해 1mL 시린지에 포장하는 단계 및 오토클레이브하는 단계 ($F_0 > 15$).
- [0223] 결과:
- [0224] 아래의 표는 수득한 하이드로겔의 탄성을 G' (Pa로) 및 압출력 F(N)의 값을 나타낸다.

표 1

부분 A1	유동 진동 레올로지 (Dynamic oscillatory rheology)		12.5 mm/min에서 F(N)
	F= 5 Hz	F= 1 Hz	
	G' (Pa)	G' (Pa)	
메피바카인 0.3 %	비멸균	103.3	36.3
	멸균	45.0	9.6
	멸균에 의한 감소 (in %)	56.4	73.5

[0226] G' 에 대해 $F = 5 \text{ Hz}$ 에서 멸균에 의한 감소를 측정한 결과는 다음과 같다:

$$(103.3 - 45.0) / 103.3 = \underline{\underline{56.4 (\text{en \%})}}$$

표 2

부분 A2		유동 진동 레올로지 (Dynamic oscillatory rheology)		12.5 mm/min에서 F(N) Ser Schott 1 mL 바늘 TSK HPC 30 G : 120347
		F= 5 Hz	F= 1 Hz	
리도카인 0.3 %	비멸균	105.9	37.4	9
	멸균	36.7	7.0	9
	멸균에 의한 감소 (in %)	<u>65.4</u>	<u>81.2</u>	

[0229] 위에서 볼 수 있듯이, 비가교결합된 히알루론산을 포함하는 조성물의 멸균 단계에 대한 안정성은 적어도 리도카인보다는 메피바카인에서 동일하게 나타났다.

[0230] 상기 결과는 심지어 메피바카인에서 더욱 우수하다는 것을 분명히 보여준다.

[0231] 실시예 2. 가교결합된 히알루론산 및 비가교결합된 히알루론산을 포함하는 본 발명에 따른 조성물을 제조하는 프로토콜 및 멸균에 대한 안정성에 관한 분석.

[0232] 8 g의 히알루론산 (4MDa), 58.7 g의 1%염화나트륨 (NaOH) 및 0.6 g의 부탄다이올 디아클리시딜 에테르 (BDD E)을 이용한다. 가교결합 반응은 52°C에서 3시간 동안 인큐베이션 (incubation)으로 유도한다.

[0233] 프로토콜은 다음과 같다:

[0234] 1. 완벽한 균질화되고 점성이 있는 용액을 획득하기 위하여 실온에서, 약 1시간 30분(1H30) 동안, 기밀되고 변형가능한 용기(특히 출원 WO 2010/131175에서 다루어진 것과 같은 파우치)에서 "히알루론산 + 1 % NaOH" 혼합물의 균질화;

[0235] 2. 용기에 가교제(BDDE)를 추가하고 실온에서 약 20분 동안 새로운 균질화;

[0236] 3. 가교결합 단계를 개시하기 위하여 "히알루론산/ 염화 나트륨 1%/BDDE"의 점성이 있는 용액을 포함하는 용기를 52°C에서 3시간 동안 인큐베이션;

[0237] 4. 중성을 띠는 pH 범위에서, 11 mg/g 히알루론산을 갖는 하이드로겔을 수득하기 위하여, 인산 완충액(FR 2 979 539에 정의된)에 수득한 고체(가교결합된 히알루론산의 용액)을 중성화, 스웰링(swelling) 및 균질화하고, 보충되어진 668g의 인산 완충액, 4 g의 HA 4MDa을 포함하는 비가교결합된 겔을 추가하는 단계;

[0238] 5. 48시간 동안 투석으로 정제하고 그 다음 균질화 탱크에서 정제된 겔을 수집하는 단계;

[0239] 6. 전체 겔을 체로 거르는 단계($230\mu\text{m}$);

[0240] 7. 수집된 겔을 2개로 분리(B1 및 B2 부분);

[0241] 8. 메피바카인 용액 1 중량%(인산 완충 매질 30 중량%) 및 1%NaOH 용액 0.4 중량%를 겔에 추가하는 단계(=부분 B1);

[0242] 4. 리도카인 용액 1 중량%(인산 완충 매질 30 중량%) 및 1% NaOH 용액 0.4 중량%를 겔에 추가하는 단계(=부분 B2);

[0243] 5. 균질화, 주사를 위해 1mL 시린지에 포장하는 단계 및 멸균.

[0244] 결과:

[0245] 아래의 표는 수득한 하이드로겔의 탄성을 $G'(\text{Pa})$ 및 압출력 F(N)의 값을 나타낸다.

표 3

부분 B1		유동 진동 레올로지 (Dynamic oscillatory rheology)	12.5 mm/min에서 F(N)
		F= 1 Hz	Ser Schott 1 mL
		G' (Pa)	바늘 TSK HPC 30 G : 120347
메피바카인 0.3 %	비멸균	20.4	10
	멸균	8.1	10
	멸균에 의한 감소 (in %)	60.3	

표 4

부분 B2		유동 진동 레올로지 (Dynamic oscillatory rheology)	12.5 mm/min에서 F(N)
		F= 1 Hz	Ser Schott 1 mL
		G' (Pa)	바늘 TSK HPC 30 G : 120347
리도카인 0.3 %	비멸균	19.2	10
	멸균	6.2	10
	멸균에 의한 감소 (in %)	67.6	

[0247]

[0248] 멸균에 의한 감소는 실시예 1에 나타난 것과 같이 측정하였다.

[0249]

[0249] 위에서 볼 수 있듯이, 가교결합된 히알루론산 및 비가교결합된 히알루론산을 포함하는 조성물의 멸균 단계에 대한 안정성은 적어도 리도카인보다는 메피바카인에서 동일하게 나타났다.

[0250]

[0250] 상기 결과는 심지어 메피바카인에서 더욱 우수하다는 것을 분명히 보여준다.

[0251]

실시예 3. 가교결합된 히알루론산 및 비가교결합된 히알루론산을 포함하는 본 발명에 따른 조성물을 제조하는 프로토콜 및 시간에 따른 안정성에 관한 분석

[0252]

[0252] 10 g의 히알루론산 (1.5MDa,), 73 g의 1% 염화나트륨 (NaOH) 및 0.9 g의 부탄다이올 디아글리시딜 에테르 (BDDE)을 혼합한다. 그 다음 가교결합 반응은 52 °C에서 3시간 동안 인큐베이션으로 유도한다.

[0253]

[0253] 제조과정은 다음과 같다:

[0254]

1. 실온에서 "히알루론산 + 1 % NaOH" 혼합물을 기밀되고 변형가능한 용기(포켓)에서 1시간 30분 동안 완벽하게 균질화되고 점성이 있는 용액을 수득하기 위하여 균질화하는 단계;

[0255]

2. 용기에 가교제(BDDE)를 추가하고 실온에서 약 20분 동안 더 균질화;

[0256]

3. 가교결합 단계를 개시하기 위하여 히알루론산/ 1% 염화 나트륨/BDDE 의 점성이 있는 용액을 포함하는 용기를 52°C에서 3시간 동안 인큐베이션;

[0257]

4. 중성에 가까운 pH 범위에서 히알루론산 25 mg/g에서 하이드로겔을 수득하기 위하여, 2 g의 비가교결합된 히알루론산 (1.5 MDa)을 포함하는 인산 완충액에 수득한 고체(가교결합된 히알루론산의 용액)를 중성화, 스웰링 (swelling) 및 균질화하는 단계;

[0258]

5. (48시간 동안) 투석으로 정제하고, 그 다음 탈가스/균질화 용기에서 정제된 겔을 수집하는 단계;

[0259]

6. 메피바카인 용액 1 중량%(인산 완충 매질에서 30 중량%) 및 1% NaOH 용액 0.4 중량%를 겔에 추가;

[0260]

7. 균질화, 탈가스화, 주사를 위해 1mL 시린지에 포장하는 단계 및 멸균($F_0 > 15$).

[0261]

결과:

[0262]

아래의 표는 수득한 하이드로겔의 위상변이 각도 $\delta(^{\circ})$ 및 압출력 F(N)의 값을 나타낸다.

표 5

분석	래올로지 진폭 스캔 (Rheology amplitude scan (Cone/plate))	바늘 TSK 30G1/2로 측정한, 압출력	pH
	5 Pa 및 1Hz에서 측정한 $\delta(^{\circ})$	12.5 mm/min에서 F (N)	
T0	17.8 ± 2.0	24.2 ± 2.5	7.1
T0 + 19 개월	19.1 ± 2.0	23.1 ± 2.5	7.1

[0263]

[0264]

상기 결과는 겔의 제조일로부터 19개월이 경과한 시점에 얻은 결과이며, 상기 결과는 초기에 얻어진 것과 동일성이 있으며, 따라서 겔의 안정성을 증명한다.