(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
A61K 31/715

(45) 공고일자 2001년12월28일
(11) 등록번호 10-0310277
(24) 등록일자 2001년09월14일

(21) 출원번호 10-1994-0703659
(22) 출원일자 1994년10월14일
번역문 제출일자 1994년10월14일
(86) 국제출원번호 PCT/EP1993/00932
(86) 국제출원출원일자 1993년04월16일

(65) 공개번호 특1995-0700751
(43) 공개일자 1995년02월20일

(87) 국제공개번호 1993/20827
(87) 국제공개일자 1993년10월28일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 마다가스카르, 노르웨이, 루마니아, 미국,
AP ARIPO특허: 말라위, 수단,
EP 유럽특허: 핀랜드,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 PD92A000071 1992년04월17일 이탈리아(IT)

(73) 특허권자 피디아 파마슈티치 에스.피.에이.
프란세스코 델라 발레
이탈리아 35031 아바노 테르메 비아 폰테 델라 파브리카 3/에이

(72) 발명자 란프란코칼레가로
이탈리아공화국아이-35020폰테디브렌타비아브라비35
아우렐리오로메오
이탈리아공화국아이-00161로마비알레이포크라테93

(74) 대리인 김석중
최규팔

심사관 : 이태영

(54) 뼈 형성 촉진용 저분자량 하이알루론산의 제조

요약

본 발명은 골유도 활성을 갖는 분자량 약 20,000 내지 약 60,000 의 하이알루론산 분획을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 하이알루론산 분획 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약제학적 조성물, 및 이러한 조성물을 사용하여 각종 형태의 골 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

뼈 형성 촉진용 저분자량 하이알루론산의 제조

[발명의 배경]

[발명의 분야]

본 발명은 골유도제(osteoinductive agent), 즉 뼈 형성 세포의 성장 및 분화를 촉진하여 새로운 골물질을 형성할 수 있는 제제로서 각종 하이알루론산의 용도에 관한 것이다. 활성 형태는 포유류 기원 세포에 관련된 것이다.

[관련 선행기술]

조직 용적의 상당 부분을 구성하는 것으로 고분자의 복잡한 네트워크로 이루어진 세포의 매트릭스가 세포외 공간을 주로 차지한다. 이것은 일반적으로 결합조직과 같은 여러 조직에 매우 풍부히 존재하며, 세포의 모든 주위를 완전히 둘러쌈으로써 조직의 물리적 성질을 결정한다. 세포외 매트릭스는 조직 행동의 많은 과정을 조절하는데 있어 상당히 중요하다. 세포외 매트릭스의 조성 및 상태 변화는 생합성 과정 및 조직 발달에 깊이 관여하는 것으로 입증되었다.

글리코스아미노글리칸(GAGs) 은 가장 풍부한 비섬유질 세포외 고분자이며, 모든 결합 세포에 편재해 있다. 이러한 음이온성 고분자량 글리코복합체 그룹은 연결합 조직 및 광화된(mineralized) 결합 조직중에 존재한다. 이들은 실제적으로 " 프로테오글리칸 " 또는 세포외 매트릭스의 " 비콜라겐성 단백질(NCP) " 이라 일컬어지는 거대분자로 이루어져 있다. 상기에서 비콜라겐성 단백질(NCP) 이라는 용어는 이들 분자를 콜라겐, 엘라스틴, 피브로넥틴 및 라미닌과 같은 섬유질 단백질의 그룹과 구별시키기 위한 것이며, 프로테오글리칸은 이들이 일반적으로 단백질에 공유적으로 결합된 상태로 발견됨을 시사하는 것이다.

프로테오글리칸의 생물학적 성질은 주로 연조직에 관해 연구할 목적으로 제시되었다. 한편, 골 및 시멘트(cement) 에 있어서 그의 프로테오글리칸의 함량에 관해서는 실제로 거의 연구되지 않았다. 실제로, 치조골의 프로테오글리칸에 대한 연구는 한가지만이 보고되었다(참조 : R. J. Waddington et al., Connective Tissue Res., 1988: 17, 171).

GAGs 는 디사카라이드 단위가 반복되어 있는 분지되지 않은 폴리사카라이드 장쇄이다. 당 잔기 및 그의 결합의 형태, 및 설페이트 그룹 수 및 위치에 따라 GAGs 는 크게 1) 하이알루론산, 2) 콘드로이틴 설페이트 및 데르마탄 설페이트, 3) 헤파란 설페이트 및 헤파린 및 4) 케라탄 설페이트로 대별된다. GAGs 가 조직내에서 유리된 상태로는 거의 존재하지 않는다(하이알루론산은 예외)는 것을 유의해야 하는 것은 중요하다. 이들은 일반적으로 단백질에 공유적으로 결합한다.

하이알루론산을 제외하고, GAGs 는 카복시 그룹과 함께 생리학적 조건하에서 고도의 음전하를 띠는 분자를 형성하는 설페이트 그룹을 함유한다.

하이알루론산(HA)(또한 하이알루로난 또는 하이알루로네이트라고도 불려진다) 은 수천개 이하의 당 잔기를 함유한다. 이것은 황산화 되지않은 디사카라이드 단위가 규칙적으로 반복된 비교적 간단한 분자이다.

HA 는 형태발생 및 조직 재생 동안에 세포 이동을 용이하게 할 수 있는 것으로 판단된다. HA 는 성숙 동물의 모든 조

직 및 체액에서 다양한 양으로 발견되며, 특히 초기 배자(embroys)에 풍부하다. 간단하기 때문에, HA 는 글리코스아미노글리칸의 가장 최근에 개발된 형태를 대표하는 것일 수 있다. HA 생산과 간엽 세포이동 및, HA 분포와 세포 분화 간에는 서로 관련이 있다(참조 : B. Toole et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA 1972: 69, 1384). 상처 치유 과정은 태아의 많은 기관이 발생하는 동안에 일어나는 초기의 경우와 마찬가지로 몇가지 특징을 가지며, HA 는 두 과정 모두에 대해 중요한 역할을 한다(참조 : B. Toole(1976) in S.H. Barondes, ed., Neuronal Recognition, Plen-um Press, New York, pp. 275-329). HA 수용체에 의하여 HA 와 세포 유착간에 서로 관계가 있는 것으로 밝혀졌다(참조 : Goldstein et al., Cell, 1989: 56, 1063; I. Sta-menkovic et al, Cell, 1989: 56, 1057).

결합 조직에 대해 상기 언급한 HA 의 특성 대부분은 또한 뼈에서도 발견될 수 있다. 비콜라겐성 단백질이 국소적 석회화 메카니즘에 영향을 미칠 수 있는 가능성에 대하여는 몇년전에 논의되었다(참조 : H. Iwata et al., Clin, Orthop., Rel. Res. 1973: 90, 236; M. R. Urist. in Bourne, G. H. ed.: The Biochemistry and Physiology of bone, New York, Academic Press, 1976: 1-59). HA 와 뼈 형성 간에는 다음과 같은 다수의 상관 관계가 있다:

1. HA 는 뼈의 형태발생 과정에 있어서 세포외 매트릭스의 주요 성분이다(참조 : B. Toole et al., Develop. Biol., 1971: 26, 28: H. Iwata et al., Clin. Orthop., Rel. Res., 1973: 90, 236);

2. 간엽 세포가 연골로 전이되는 동안에 상당량의 HA 가 존재한다(참조 : O. Wiebkin et al., FEBS Lett., 1973: 37, 42; C.H. Handley et al., Biochem. Biophys. Acta, 1976: 444, 69);

3. 상처 치유 과정 및 골조직 발달에 관한 것과 관련하여(참조 : B.P. Toole(1976) in S.H. Barondes, Ed., Neuronal Recognition, Plenum Press, New York, p. p. 275-329), HA 는 프라이머(primer) 의 한 종류로 여겨질 수 있다.

HA 는 치근막 질환을 치료하는데 유용한 것으로 오래전 부터 알려져 왔다(참조 : Minerva Stomatol. 20: 1540, 1965). 이 경우에 다음과 같은 잘 정해진 발생 순서가 있는 것으로 여겨진다:

- 첫째로, HA 가 풍부한 매트릭스는 세포가 빈약한 공간에 침착되고;

- 둘째로, 세포 이동이 촉진되어 HA 매트릭스는 인접 조직으로 부터 이동한 세포에 의해 침윤되며;

- 마지막으로, 세포내에 있는 세포의 매트릭스는 하이알루로니다제(HA 를 분해시킨다), 황산화된 글리코스아미니글리칸 및 콜라겐을 분비하며, 이들은 매트릭스가 재구성화되는 동안에 HA 의 일부를 대체한다.

상기 언급한 세가지 발생 시스템의 각각에서, HA 매트릭스는 합성된 후 분해된다. 따라서, 세포에 소량 함유된 상기 일시적인 HA 매트릭스는 이를 분해시키는 세포-매개된 복잡한 일련의 과정이 진행되기 전에 필요한 것으로 판단된다.

내피 세포 및 섬유아세포에서와 같이 상이한 형태의 세포 표면상에 HA 를 결합시키는 부위가 다수 존재하는 것으로 보고되었다 (참조 : S. Eriksson et al., Exp. Cell Res. 1983: 144, 223; R.H. Raja et al., J. Cell. Biol. ; 1985: 101, 426a; C.B. Underhill et al., Cell. Biol. 1979: 82, 475). 따라서, HA 는 세포 표면과 세포외 매트릭스의 분자 모두와 특이적으로 상호 작용할 수 있다.

HA 의 골유도 활성에 관한 화학적 및 물리-화학적 특성은 아직가지 정립되지 않았다. 하이알루론산의 생물학적 활성은 분자량 및 점도의 상이한 정도와 관련이 있을 수 있는 것으로 알려져 있다.

[발명의 요약]

따라서, 본 발명의 목적은 세포에서 골유도 활성을 나타내며, 그 세포 이외의 공급원으로 부터 추출 및 정제된 상이한 하이알루론산 분획을 제공하는데 있다. 원료로 부터 출발하여, 분자량이 약 20 내지 약 60 킬로달톤(kdaltons) 이고, 점도가 약 1.2 dl/g 내지 약 2.8 dl/g 이며, 단백질 함량이 약 0.5 %(중량/중량) 미만인 실제적으로 순수한 하이알루론산 분획을 수득할 수 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 골유도 활성을 갖는 하이알루론산 분획 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다. 약제학적 조성물은 미소구체, 막, 필름, 부직 티슈, 튜브, 너브 채널(nerve channel), 스폰지, 분말 또는 과립상 형태일 수 있으며, 상기 하이알루론산 분획을 0.1 내지 99 중량 %, 더욱 바람직하게는 10 내지 90 중량 % 및 가장 바람직하게는 20 내지 80 중량 % 를 함유할 수 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 인체 및 수의과용 약제에 유용하며, 뼈 기능을 유지하고, 뼈의 기능 상실을 방지하고, 외상 상태의 뼈 기능을 회복시키고, 말기 단계의 급성 병리학적 증상 및 만성의 퇴행성 병리학적 증상을 포함한 급성 또는 만성의 병리학적 증상의 뼈 기능을 회복시키고, 골 노화에 의한 병리학적 증상을 치료하는 방법을 제공하는 것이다. 이 방법은 인간 또는 동물에게 골유도 활성을 갖는 하이알루론산 분획 및 약제학적으로 허용되는 단체를 함유하는 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

상기 약제학적 조성물은 비경구 투여, 경피내 투여, 국소 투여 및 국부 투여 중에서 선택된 경로에 의해 투여될 수 있다. 국소 투여에는 골 결손 부위에서 잇몸내 적용하는 것이 포함될 수 있다.

본 발명의 또 다른 적용 범위는 이후 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조로 하여 명백해질 것이다. 그러나, 당해 기술의 숙련자들은 상세한 설명을 본 발명의 영역 및 범위내에서 다양하게 변화 및 변경시킬 수 있음이 명확하기 때문에 본 발명의 구체예를 나타내는 상세한 설명 및 특정 실시예는 설명할 목적으로만 제시된 것이다.

[도면의 간단한 설명]

본 발명의 상기 언급한 목적 및 그밖의 다른 목적, 특징 및 장점은 첨부된 도면에 대한 하기 상세한 설명에 따라 더욱 쉽게 이해될 것이며, 이때 이와 관련된 모든 것은 단지 설명할 목적으로만 주어진 것이고 본 발명을 한정하기 위한 것은 아니다:

제 1 도는 본 원에 기재된 저분자량의 하이알루론산 분획을 제조하는데 사용한 각종 방법을 나타낸다.

제 2 도는 골 콜로니(colony) 면적에 의해 측정한 것으로 0.5, 1.0 및 2.0 mg/ml 의 농도에서 30 내지 40 킬로달톤의 분자량을 갖는 하이알루론산 분획의 시험관내 골유도 활성을 나타낸다.

제 3 도는 골 콜로니 수에 의해 측정한 것으로 0.5, 1.0 및 2.0 mg/ml 의 농도에서 30 내지 40 킬로달톤의 분자량을 갖는 하이알루론산 분획의 시험관내 골유도 활성을 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

이후 상세한 설명은 본 발명을 수행하는데 당해 기술의 숙련자들을 도울 목적으로 제공된다. 그렇다 하더라도, 당해 기술의 숙련자들은 본 원에 기개된 구체예를 본 발명의 내용 또는 영역을 벗어남이 없이 변형 또는 수정할 수 있기 때문에 이후 상세한 설명은 본 발명을 어떤 방법으로도 한정하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

본 원에 인용된 각 참조문헌의 내용은 전적으로 참조하기 위하여 반영된다.

[물질 및 방법]

하이알라스틴으로 부터 저분자량 하이알루론산 분획을 제조하는 방법

[실시예 1]

염증 활성없이 하이알라스틴과 하이알렉틴 분획의 혼합물을 수득하는 방법

선닭볏 또는 냉동 닭볏(3000 g) 을 미트 민서(meat mincer)에서 다진후, 기계 균질화기에서 조심스럽게 균질화시킨다. 생성된 페이스트를 무수 아세톤 10 부피를 포함하는 유리 용기 또는 AISI 316 스테인레스강 용기에 도입한다. 그 후 내용물 전부를 50 g/분의 속도로 6 시간동안 교반하고, 12 시간동안 방치시켜 분리시킨 후, 아세톤을 사이펀으로 뽑아내 버린다.

이 추출 과정을 아세톤의 제거에 의해 습도가 적당한 수준으로 될 때까지 반복한다(Karl-Fisher 방법).

그후, 생성된 물질을 원심분리하고, 적합한 온도에서 5 내지 8 시간동안 진공 건조시킨다. 이러한 공정에 의해 닭볏으로 부터 약 500 내지 600 g 의 무수 분말이 수득된다.

300 g 의 무수 분말을 적당량의 시스테인 하이드로클로라이드의 존재하에 포스페이트 완충액을 사용하여 완충시킨 수성 매질을 통하여 파파인(0.2 g) 을 사용함으로써 효소 분해시킨다. 그후, 이 혼합물을 60 내지 65 ℃ 의 항온에서 60 g/분으로 24 시간동안 교반한다. 60 g 의 셀라이트(R) 를 가한후 전체 매스(mass) 를 25 ℃ 로 냉각시키고, 교반을 추가로 1 시간동안 계속한다.

생성 혼합물을 등명한 용액이 얻어질 때까지 여과한다. 그후 이 등명 용액을 30,000 이하의 분자만을 통과시키는 멤브레인에 의해 분자 한외 여과하여 멤브레인상에 30,000 을 초과하는 분자량의 분자만이 남도록 한다. 최초 부피의 5 내지 6 배를 한외 여과하고, 동시에 증류수를 계속해서 생성물에 가한다. 증류수의 첨가를 중지하고, 생성물을 최초 부피의 1/3 로 감소될 때까지 한외 여과한다.

잔류 액체에 염화 나트륨을 가하여 0.1M 로 만들고, 온도가 50 ℃ 가 되도록 한다. 생성물을 60 g/분으로 교반하면서 45 g 의 세틸피리디늄 클로라이드를 가한다. 혼합물을 60 분동안 교반한 후, 50 g 의 셀라이트(R) 를 가한다. 교반하에 생성물의 온도를 25 ℃ 까지 감소시키고, 형성된 침전을 원심분리에 의해 수집한다. 수득한 침전물을 0.05 % 의 세틸피리디늄 클로라이드를 함유하는 염화 나트륨의 0.01 M 용액(51) 중에 현탁시킨다. 50 ℃ 에서 60 분동안 추가로 교반한다. 온도를 25 ℃ 로 낮추고, 침전물을 원심분리한다.

그후 3 회 반복하여 세척하고, 마지막으로 0.05 % 의 세틸피리디늄 클로라이드를 함유하는 염화 나트륨의 0.05 M 용액 3 l 가 들어있는 용기에서 수집한다. 60분동안 60g/분으로 교반하고, 25 ℃ 의 항온에서 2 시간동안 유지한다. 원심분리하여 지질 상등액을 제거한다.

0.05 % 의 세틸피리디늄 클로라이드를 함유하는 0.1 M 염화 나트륨 용액을 사용하여 상기 과정을 수회 반복한다. 혼합물을 원심분리하고 상등액은 버린다. 침전물을 0.05 % 의 세틸피리디늄 클로라이드(3 l)를 함유하는 0.30 M 염화 나트륨 용액 (5 l) 에 분산시킨다. 혼합물을 교반하고 침전물 및 등명한 액체 모두를 모은다. 추출물 침전물 상에서 매회 0.5 l 의 동일 수용액을 사용하여 3 회 반복한다.

마지막으로, 잔류 침전을 제거하고, 등명 액체를 단일 용기에 모은다. 액체의 온도를 교반하면서 50 ℃ 로 상승시킨다. 그후 액체를 염화 나트륨을 사용하여 0.23 M 로 만든다. 1 g 의 세틸피리디늄 클로라이드를 가하고, 12 시간동안 교반을 계속한다. 혼합물을 25 ℃ 로 냉각시키고, 우선 셀라이트(R) 팩을 통해, 그후에 여과기(1 μ) 를 통해 여과한다.

생성된 혼합물을 30,000 이하의 분자만을 통과시키는 멤브레인에 의해 분자 한외 여과하는데, 이때 0.33 M 의 염화 나트륨 용액을 가하여 최초 부피의 3 배를 한외 여과한다. 염화 나트륨 용액의 첨가를 중지하고, 생성물의 부피를 최초 부피의 1/4로 감소시킨다.

농축시킨 용액을 25 ℃ 의 온도에서 교반(60 g/분) 하에 3 부피의 에탄올(95%) 을 사용하여 침전시킨다. 원심분리하여 침전을 모으고, 상등액은 버린다. 침전을 1 l 의 0.1 M 염화 나트륨 용액에 용해시키고, 3 부피의 95 % 에탄올을 사용하여 침전 과정을 반복한다.

침전을 모아 첫번째로 75 % 에탄올(3 회), 그 후에 무수 에탄올(3 회) 및 세번째로 무수 아세톤(3 회) 을 사용하여 세척한다.

수득된 생성물(하이알라스틴 + 하이알렉틴 분획)은 평균 분자량이 250,000 내지 350,000 이다.

하이알루론산 수율은 최초 선조직의 0.6 % 이다.

[실시예 2]

실시예 1에 기술된 방법으로 수득한 혼합물로 부터 하이알라스틴 분획을 수득하는 방법

실시예 1에 기술된 방법으로 수득한 혼합물을 물 1ml 당 생성물 10 mg 의 비율로 발열물질을 함유하지 않는 증류수 중에 용해시킨다. 수득한 용액을 멤브레인에 물을 첨가함이 없이 농도 기술을 이용하여 20,000 이하의 분자만을 통과시키는 멤브레인에 의해 분자 한외여과시킨다. 20,000 이하의 분자만을 통과시키는 멤브레인에 의해 한외여과시키는 동안에 멤브레인을 통해 분자량이 200,000 을 초과하는 분자는 통과하지 못하며, 이에 반해 이보다 더 작은 분자는 물과 함께 멤브레인을 통과한다. 여과하는 동안에 멤브레인 상의 격실로 물은 첨가되지 않으며, 따라서 200,000 을 초과하는 M.W. 의 분자 농도가 증가함에 따라 격실 부피는 감소한다. 그후 멤브레인 상의 부피가 초기 부피의 10 % 까지 감소될 때까지 한외 여과시킨다. 발열물질을 함유하지 않는 2 부피의 이차 증류수를 가하고, 용액을 다시 부피가 1/3 로 줄어들 때까지 한외 여과한다. 이 방법을 다시 2 회 반복한다.

멤브레인을 통과한 용액을 염화 나트륨을 사용하여 1.0 M 로 만들고, 4 부피의 95 % 에탄올로 침전시킨다. 침전을 75 % 에탄올로 3 회 세척하고, 진공 건조시킨다.

수득한 생성물(하이알라스틴 분획) 은 평균 분자량이 50,000 내지 100,000 이다.

하이알루론산 수율은 최초 선조직의 0.4 % 이다.

본 발명의 저분자량 하이알루론산 분획은 제 1 도에 도시된 하이알라스틴 분획으로 부터 제조한다.

분리된 간엽 세포의 배양 방법

수태한 후 12 내지 13 일 경과한 스위스산 웹스터(Webster) 마우스에 0.4 ml 의 나트륨 넴부탈을 복강내 투여하여 마취시킨다. 태자를 무균 상태하에 꺼낸다. 상피를 머리로 부터 벗겨내고, 정관을 열어 뇌를 드러낸다. 측두, 전두, 두정부 및 후두 간엽을 꺼내 즉시 BGJb 배지에 도입한다. 각 마우스로 부터 취한 조직을 칼슘 또는 마그네슘을 함유하지 않는 멸균시킨 행크(Hank) 균형 식염수(HBSS) 12 ml, 천연콜라게나제 10 mg 및 덱스트로즈 50 μg 을 함유하는 멸균 페트리 접시에 분리하여 놓는다. 페트리 접시를 회전 플랫폼(platform) 위에 놓고, 조직을 37 ℃ 에서 90 분동안 압궤하여 분리시킨다. 분리된 조직을 원심분리하기 위하여 50 ml 의 무균 원추형 시험관으로 옮긴다. 원심분리한 후, 상등액을 제거하고, 생성 펠렛을 50 μg/ml 겐타마이신 및 10 % 의 열에 대해 불활성인 태자 송아지 혈청(바이러스의 부재가 조사된 것)이 다량 함유된 BGJb 배지에 재현탁시킨다. 이 과정을 3 회 반복하여 콜라게나제를 완전히 제거한다. 최종 재현탁후, 분취량을 혈구계로 옮겨 세포수를 측정한다. 혈구계의 두 챔버로부터 얻은 값이 두 챔버에 대한 평균과 다르면 계수를 반복한다. 그후 세포 현탁액을 ml 당 4×10^5 세포 농도가 될 때까지 희석 또는 농축시킨다. 각각 2×10^6 세포를 함유하는 5 ml 의 분취량을 60-mm 의 무균 페트리 접시에 넣은후, 95 % 압축공기 및 5 % 이산화탄소의 대기중, 37 ℃, 100 % 습도에서 보관한다. 이 세포를 마르바소(Marvaso) 및 베르나드(Bernard) 에 의해 기술된 바와 같이 다수의 골 콜로니에 전개시킨다[참조 : J.S. Ko et al., Am. J. Anat. 1981: 161, 415].

현미경 검사

골 배양물을 제자리에 고정시키고, 러버 스쿠프(rubber scoop) 를 이용하여 페트리 접시에서 그대로 꺼낸후, 저속 원심분리에 의해 부드럽게 패킹한다. 처리한 세포 배양물을 절편으로 만들어 그의 상호관계를 포함하여 배양물의 여러 구역을 관찰하고, 따라서 각 페트리 접시중의 조직이 나타내는 전체 상태를 조사할 수 있도록 하였다. 고정후, 모든 조직

을 알콜에 통과시켜 탈수시키고, 크실렌으로 청징화한 후, 파라핀중에 포매시킨다. 각 골 콜로니에 의해 덮인 부분을 위상차 현미경(35x)에 연결된 디지탈 분석기로 측정한다. 물질의 전체 길이를 따라 5 내지 6 미크론을 절개하고, 반연속 방법으로 마운팅한다. 각 15 열의 세 연속한 절편을 본 코사(Von Kossa) 시약으로 처리한 톨루이딘 블루, 에이치 앤 드 이(H and E) 또는 중간 빨간색으로 동일하게 염색하고, 결합된 칼슘에 대해 관찰한다. 주어진 조직의 모든 절편을 관찰하고, 가장 대표적인 현미경적 부위에 대해 사진을 찍는다.

대조용 두개, 분리된 간엽 세포 펠렛 및 세포 배양 물질을 모아 세포 배양물은 제자라에 고정시키지만 페트리 접시에서 꺼내지 않는 것만을 달리하여 상기 언급한 바와 같이 고정시킨다. 그후 모든 조직을 pH 7.4 나트륨 카코딜레이트 0.1 M 중의 1 % 의 오스뮴 테트록사이드 중에 1 시간동안 이차 고정시키고, 알콜, 프로필렌 옥사이드 또는 하이드록시프로필메타크릴레이트로 탈수시킨 후, Epon 812 에 포매시킨다. 블럭을 포터-블룸 MT-1 초마이크로톰상에서 유리날로 절단한다. 광학 현미경의 경우에, 플라스틱 물질의 반얇은 1 미크론 절편을 수성 톨루이딘 블루로 염색하고, 다른 절편은 우라닐 아세테이트 및 시트르산납으로 염색한 후, 초미세구조 분석에 사용한다. 80 KV 의 Siemens 1A Elmskop 를 사용하여 전자 현미경으로 관찰한다. 세포 배양물내에서 골 콜로니의 세포가 합쳐진 응집만이 관찰된다. 정해진 시간에 포매된 각 페트리 접시로 부터 적어도 세개의 응집을 무작위로 선택한다.

[실시예 3]

상이한 분자량의 HA 를 상이한 양으로 상기 언급한 바와 같이 제조한 배양된 골 콜로니에 가한다.

분말 형태의 HA 샘플은 2×10^4, 4×10^4, 6×10^4, 16×10^4, 55×10^4, 88×10^4 및 13×10^5 과 같이 상이한 분자량의 하이알루론산 분획이다.

A 내지 G 로 표시된 HA 샘플의 특성을 하기 표 1 에 나타내었다.

샘플 코드	평균분자량 ($dx10^{-3}$)	고유점도 (dl/g)	알부민단백질 (%)
A	20	1.20	< 0.5
B	40	1.3	< 0.5
C	60	2.8	0.3
D	160	4.8	0.4
E	550	12.1	0.2
F	800	10.0	0.2
G	1300	21.0	0.1

각종 HA 샘플을 사용하여 0.5, 1.0 및 2.0 mg/ml 의 상이한 농도의 간엽세포를 처리하였다. 모든 샘플을 시험 당 총 8 개의 페트리 접시에 투입하여 통계적으로 의미있는 데이타를 얻는다. 생성 조직이 고정되면, HA 를 함유하는 배지(BGJb) 를 우선 48 시간후에 HA 를 함유하지 않는 배지로 대체시키고, 그후 매 24 시간마다 10 일까지 HA 를 함유하지 않는 배지로 대체시킨다.

현미경 사진 결과에 따라 샘플 A, B 및 C 에서 골유도 활성이 가장 큰 것을 알 수 있다.

제 2 도 및 3 도는 각각 배양 골 콜로니중에서 콜로니 면적 및 콜로니 수에 대한 분자량 30 내지 40 킬로달톤인 HA 분획의 효과를 나타낸다.

제 2 도에 도시된 바와 같이, 분자량 30 킬로달톤의 HA 분획(왼쪽 패널) 은 1 mg/ml 의 농도에서 골 콜로니 부위의 전개를 촉진시키는데 가장 효과적이다. 분자량 40 킬로달톤의 HA 분획은 2 mg/ml 의 농도에서 가장 효과적인다(오른쪽 패널). 두 경우 모두에서, 콜로니 크기와 HA 사용량의 상호 관계는 대략 선형이다.

제 3 도에 도시된 바와 같이, 30 및 40 킬로달톤의 HA 분획은 2 mg/ml 에서 콜로니 형성을 촉진하는데 가장 효과적이다. 상기 두 HA 분획으로 처리하는 경우에, 비처리된 대조용과 비교하여 배양물 중에서 골 콜로니의 수는 현저히 증가한다. 이러한 증가는 사용량이 증가함에 따라 대략적으로 증가하며, 30 킬로달톤의 HA 분획을 사용하는 경우에 더욱 분명하다.

상술된 본 발명은 동일한 범위내에서 여러 방법으로 변형시킬 수 있다. 이러한 변형은 본 발명의 범위 및 내용을 벗어나지 않는 것이며, 당업계의 숙련자들이 어떠한 변형을 하더라도 이것은 하기 특허청구 범위내에서 나온 것으로 간주된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

골유도 활성을 갖는 하이알루론산 분획(fraction) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약제학적 조성물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 하이알루론산 분획의 분자량이 30 내지 40 킬로달톤인 약제학적 조성물.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 하이알루론산 분획의 점도가 1.2 dl/g 내지 2.8dl/g 인 약제학적 조성물.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 점도가 1.3dl/g 인 약제학적 조성물.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 하이알루론산 분획의 단백질 함량이 0.5% 미만인 약제학적 조성물.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 미소구체, 막, 필름, 부직 티슈, 튜브, 스폰지, 분말 및 과립으로 구성된 그룹 중에서 선택된 형태의 약제학적 조성물.

청구항 7.

인간을 제외한 동물에게 뼈 기능을 유지하기에 유효한 양의 제 1 항의 약제학적 조성물을 투여함을 특징으로 하여, 인간을 제외한 동물에게서 뼈 기능을 유지시키는 방법.

청구항 8.

인간을 제외한 동물에게 뼈의 기능 상실을 방지하거나, 뼈의 기능을 회복시키거나, 뼈의 노화에 의한 병리학적 증상을 치료하기에 유효한 양의 제 1 항의 약제학적 조성물을 투여함을 특징으로 하여, 인간을 제외한 동물에게서 뼈의 기능 상실을 방지하거나, 뼈의 기능을 회복시키거나, 뼈의 노화에 의한 병리학적 증상을 치료하는 방법.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 인간을 제외한 동물에게서 외상을 입은 뼈의 기능을 회복시키는 방법.

청구항 10.

제 8 항에 있어서, 인간을 제외한 동물에게서 급성 또는 만성 병리학적 증상의 뼈 기능을 회복시키는 방법.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 급성 병리학적 증상이 말기 단계인 방법.

청구항 12.

제 10 항에 있어서, 만성 병리학적 증상이 만성의 퇴행성 병리학적 증상인 방법.

청구항 13.

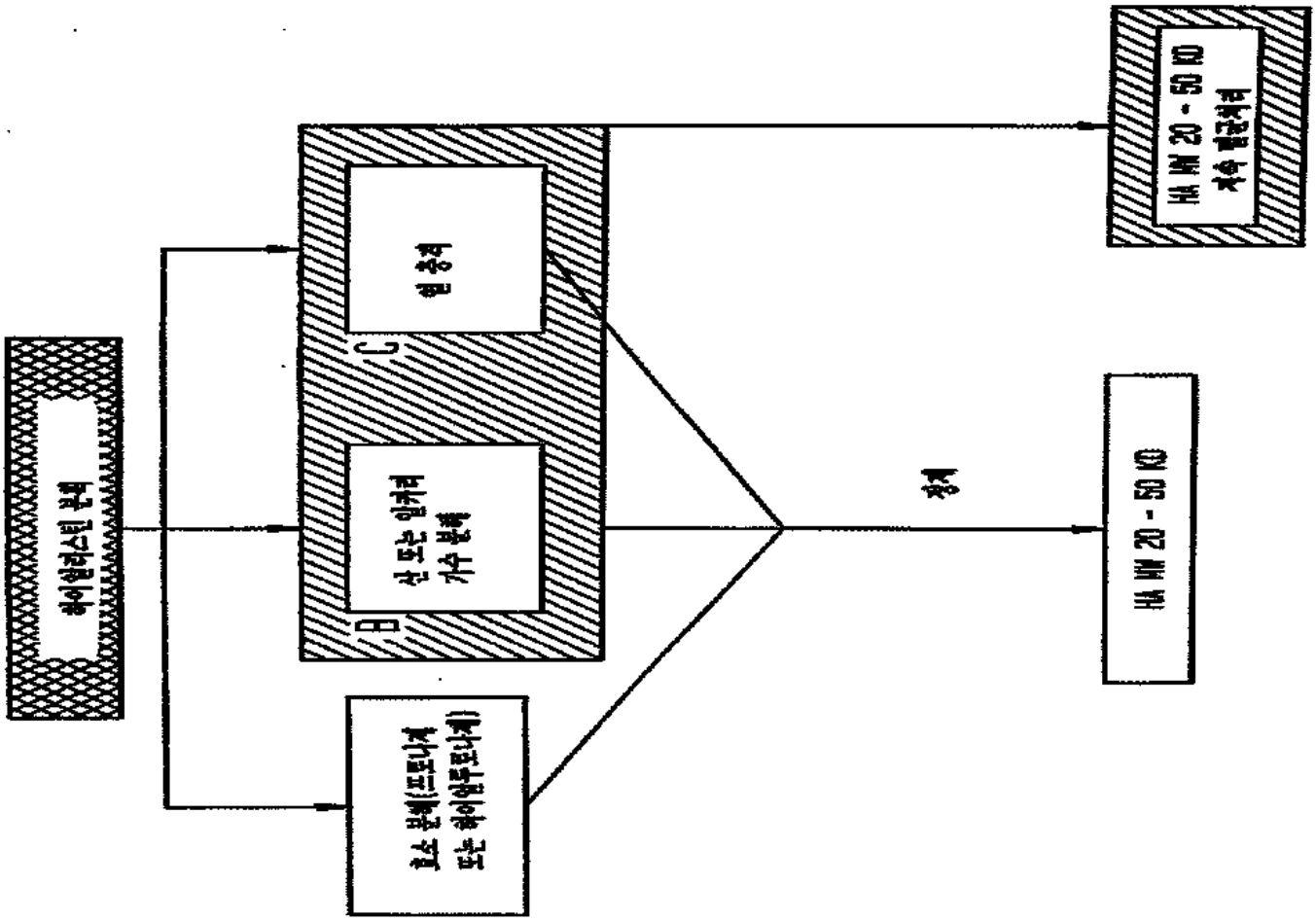
제 8 항 내지 제 12 항 중의 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물을 비경구 투여, 경피내 투여, 국소 투여 및 국부 투여 중에서 선택된 경로에 의해 투여시키는 방법.

청구항 14.

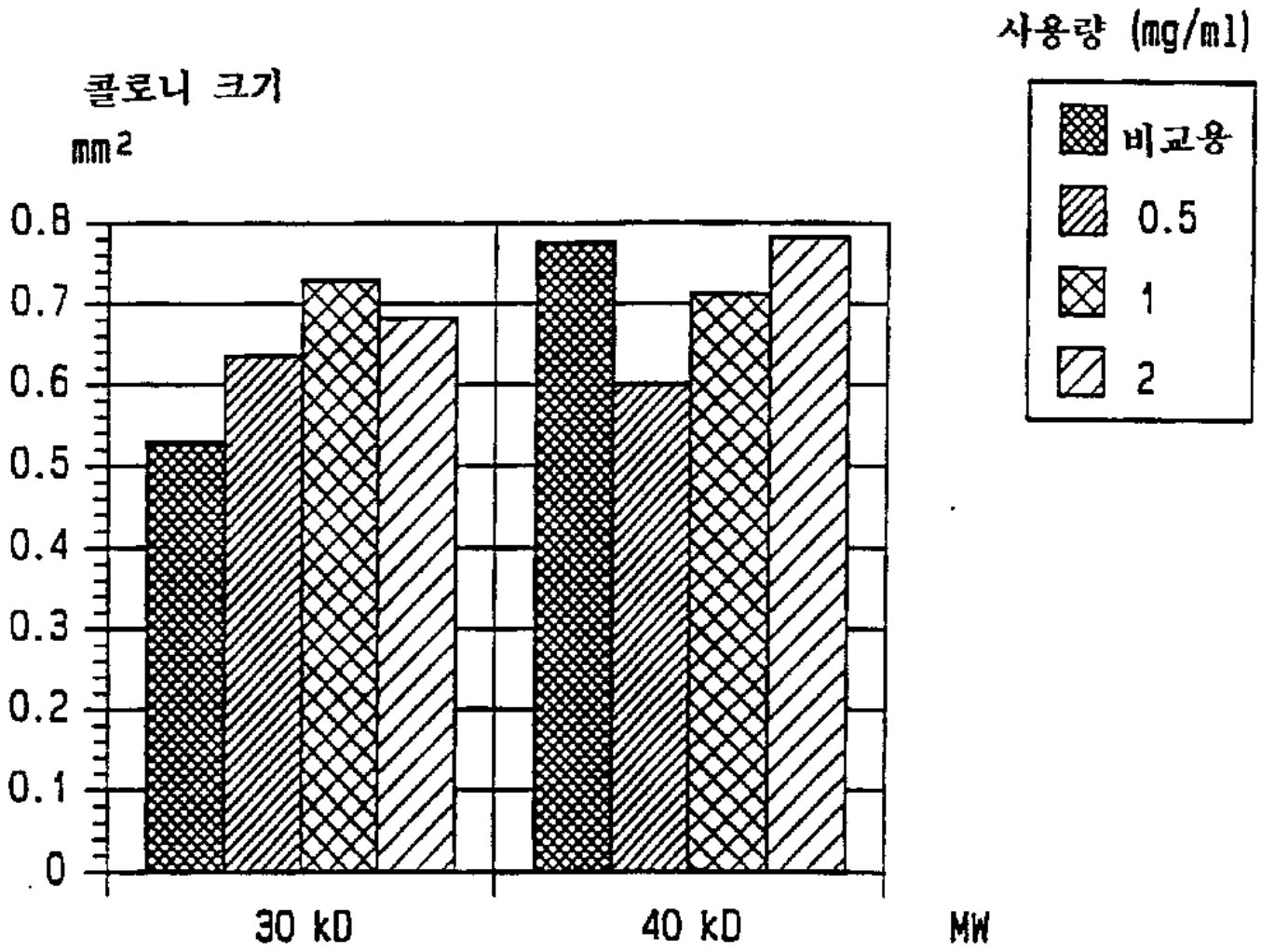
제 13 항에 있어서, 국소 투여가 잇몸내 적용에 의해 수행되는 방법.

도면

도면 1


해어엘리스틴 분획
B
산 또는 알카리 가수 분해
C
열 충격
효소 분해(프로나제 또는 해어엘루로나제)
정제
HA MW 20 - 50 KD
HA MW 20 - 50 KD 저속 멸균처리

도면 2



도면 3

