



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월14일
(11) 등록번호 10-2010728
(24) 등록일자 2019년08월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 - A61L 27/22 (2006.01) A61F 2/00 (2006.01)
 - A61K 8/64 (2006.01) A61K 8/73 (2006.01)
 - A61L 27/20 (2006.01) A61L 27/26 (2006.01)
 - A61L 27/58 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)
 - C08L 5/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 - A61L 27/22 (2013.01)
 - A61F 2/0059 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7004168(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2011년11월22일
 - 심사청구일자 2019년02월19일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월12일
- (65) 공개번호 10-2019-0020345
- (43) 공개일자 2019년02월28일
- (62) 원출원 특허 10-2013-7016121
 - 원출원일자(국제) 2011년11월22일
 - 심사청구일자 2016년11월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2011/001503
- (87) 국제공개번호 WO 2012/068619
 - 국제공개일자 2012년05월31일
- (30) 우선권주장
 - 61/344,940 2010년11월23일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 - US20070053987 A1
 - WO2009048930 A1
 - WO2001079342 A1
 - WO2010053918 A1
- (73) 특허권자
 - 엘라스타젠 피티와이 리미티드
 - 오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2015, 이블레이, 콘왈리스 스트리트 4, 내셔널 이노베이션 센터
- (72) 발명자
 - 소머-누젠 젠스
 - 오스트레일리아 뉴 사우스 웨일즈 2072 고든 세인트 존스애비뉴 137
- (74) 대리인
 - 제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 23 항

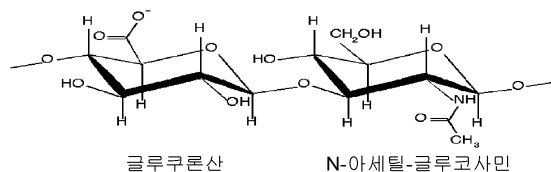
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 **폴리사카라이드와 가교결합된 단백질의 제조 및/또는 제형화**

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 단백질 잔기 및 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 치료 조성물 및/또는 제형, 및 그의 제조 방법에 관한 것이다. 가교결합 단백질 매트릭스는 전장 또는 실질적인 전장 단백질, 예를 들면, 트로포엘라스틴, 엘라스틴, 알부민, 콜라겐, 콜라겐 단량체, 면역글로블린, 인슐린 및/또는 이들의 유도체 또는 조합을, 사카라이드 함유 가교결합제, 예를 들면, 히알루론산 또는 셀룰로스 유도체로부터 유도된 폴리사카라이드 가교결합제와 가교결합시키는 것으로부터 유도될 수 있다. 상기 치료 조성물은 국소적으로 또는 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 조성물의 제조 및/또는 제형화를 위한 방법, 시스템 및/또는 키트를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/227 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01)
C07K 14/765 (2013.01)
C07K 14/78 (2013.01)
C08B 37/0072 (2013.01)
C08H 1/00 (2013.01)
C08L 5/08 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

조직 재생(tissue regeneration) 또는 조직 증대(tissue augmentation)를 위한 약학적 조성물로서,

상기 조성물이 하나 이상의 가교결합된(cross-linked) 단백질 매트릭스를 포함하고,

상기 하나 이상의 가교결합된 단백질 매트릭스가

(i) 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드, 전장 단백질 및 단백질 절편으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아민-함유 단백질 분자로부터 유도되는, 하나 이상의 단백질 잔기 1 내지 250 mg/mL;

(ii) 하나 이상의 카복실기를 포함하는 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합(cross-linking) 분자로부터 유도되는, 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기; 및

(iii) 상기 하나 이상의 아민-함유 단백질 분자의 아민과 상기 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합 분자의 카복실기 간의 아마이드 결합을 포함하는, 하나 이상의 분자간 가교결합

을 포함하고,

상기 사카라이드-함유 가교결합 분자가 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드이고,

상기 하나 이상의 단백질 잔기에 분자내 가교결합이 없는,

약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

조성물이 주사가능한 조성물인, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

조성물이 수술 중에 국소 주사 또는 주사를 위한 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

조성물이 피내 주사를 위한 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

18G 내지 31G의 바늘을 통해 5 내지 30 cm의 길이까지 압출가능하고, 압출된 조성물이 표면 지지체 없이 응집되거나,

조성물이 미세 게이지 바늘을 통해 압출될 때 추가의 표면 지지체 없이 5 내지 30 cm의 길이까지 압출가능하고, 압출된 조성물이 응집성이고 응집되는,

약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

조성물이 10 cm 이상의 미세 게이지 바늘을 통해 압출된 후에도 응집성을 유지하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 단백질 잔기가 전장 단백질 또는 50 내지 99.99%의 전장 단백질로부터 유도되는, 약학적 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 단백질 잔기가 전장 단백질이고,

조성물이 상기 하나 이상의 단백질 잔기가 그의 전장을 유지할 수 있게 하고, 상기 조성물이 바늘 주사가능하고 응집성 구조를 유지하고 생체내에서 조성물의 재흡수를 지연시키도록 가교결합되는,

약학적 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 사카라이드-함유 잔기가 생체이용성, 생체분해성, 생체흡수성 및 생체재흡수성 중 하나 이상의 성질을 갖는, 약학적 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 폴리사카라이드 잔기가 히알루론산, 셀룰로스, 카복시 셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 카복시메틸 아밀로스, 잔탄검, 구아검, α -글루칸, β -글루칸, β -1,4-글루칸, β -1,3-글루칸, 알기네이트, 카복시메틸 텍스트란, 글리코사미노글리칸, 콘드로이틴-6-설페이트, 더마틴 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트-코-글리콜)산, 트라이칼슘 포스페이트, 1-하이드록시아파타이트 및 이들의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 유도되는, 약학적 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 사카라이드-함유 잔기의 양이 1 내지 30 mg/mL이고, 하나 이상의 단백질 잔기의 양이 25 내지 50 mg/mL인, 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 단백질 잔기가 트로포엘라스틴, 엘라스틴, 알부민, 콜라겐, 콜라겐 단량체, 면역글로불린 및 인슐린으로 이루어진 군으로부터 유도되고,

하나 이상의 단백질 잔기의 양이 1 내지 250 mg/mL인,

약학적 조성물.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 가교결합된 단백질 매트릭스가 합성 단백질의 잔기를 포함하거나,

하나 이상의 가교결합된 단백질 매트릭스가 사카라이드-함유 가교결합 분자의 총 카복실 기의 수를 기준으로 5% 이상의 활성화 카복실 기를 포함하는 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합 분자로부터 제조되는,

약학적 조성물.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 가교결합된 단백질 매트릭스에 혼입되지 않고 비결합된 채 남아 있는 단백질 단위의 수가 단백질 잔기에 함유된 총 단백질 단위의 수의 10% 미만일 수 있는, 약학적 조성물.

청구항 15

제 12 항에 있어서,

하나 이상의 단백질 잔기가 트로포엘라스틴으로부터 유도되는, 약학적 조성물.

청구항 16

제 10 항에 있어서,

하나 이상의 사카라이드-함유 잔기가 히알루론산으로부터 유도되는, 약학적 조성물.

청구항 17

제 1 항에 있어서,

하나 이상의 사카라이드-함유 잔기가 히알루론산으로부터 유도되고,

하나 이상의 단백질 잔기가 트로포엘라스틴으로부터 유도되는,

약학적 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

조성물 중의 히알루론산의 농도가 약 1 내지 약 30 mg/mL이고,

트로포엘라스틴의 농도가 25 내지 50 mg/mL인,

약학적 조성물.

청구항 19

제 1 항에 있어서,

조성물이

복원 수술; 미용 수술; 피부과 수술; 눈 수술; 재건 수술; 신경 수술; 성형 수술; 정형외과 수술; 또는 혈관 수술을 포함하는 의학, 수의학 또는 미용 의료에서,

조직을 벌크화시키거나 증대시키거나 이들의 조합에 사용되는,

약학적 조성물.

청구항 20

제 2 항에 있어서,

조성물이 미세 케이지 바늘을 통해 압출될 때 추가의 표면 지지체 없이 10 내지 20 cm의 길이까지 압출가능하고, 압출된 조성물이 응집성이고 응집되는, 약학적 조성물.

청구항 21

제 2 항에 있어서,

조성물이 미세 케이지 바늘을 통해 압출될 때 추가의 표면 지지체 없이 15 내지 30 cm의 길이까지

압출가능하고, 압출된 조성물이 응집성이고 응집되는, 약학적 조성물.

청구항 22

제 1 항에 있어서,

조성물이 조직 내부성장(in-growth), 조직 재성장, 또는 이들의 조합을 증대시키는, 약학적 조성물.

청구항 23

제 1 항에 있어서,

조성물이 상처 또는 수술에 의한 체강, 용적 손실 또는 결함부; 안면 주름; 노화된 피부; 흉터가 있는 조직; 피부 함몰; 증대가 필요한 조직; 또는 정형외과 적응증(indication)의 보충을 위해 사용되는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 본원에 전체로 참고로 인용된, 2010년 11월 23일자로 출원된 미국 가출원 US 61/344,940 호와 관련된다.

[0002] 본 개시내용은 폴리사카라이드와 가교결합된 단백질의 제조 및/또는 제형화에 관한 것이며 그에 적용될 수 있다.

배경 기술

[0003] 성대 재건, 변실금 및 요실금으로부터 주름을 위한 심미 치료에 이르는 의학적 용도에서 조직을 벌크화 또는 증대시키기 위해 현재 주사가 가능한 이식물이 사용된다. 현행 이식물은 히알루론산, 콜라겐과 같은 단백질, 폴리락트산과 같은 중합체, 및 하이드록시아파타이트와 같은 생체물질을 포함한 광범위한 물질로부터 제조된다.

[0004] 예를 들면, 때때로 히알루로난 또는 히알루로네이트로 지칭되는 히알루론산("HA")은, 예를 들면, 윤활액, 유리액, 혈관벽 및 텃줄, 및 기타 결합 조직에서 발견되는 천연 뮤코폴리사카라이드이다. 상기 폴리사카라이드는 교번하는 β -1,3-글루쿠로나이드 및 β -1,4-글루쿠사미나이드 결합에 의해 연결된 교번하는 N-아세틸-D-글루코사민 및 D-글루쿠론산 잔기로 이루어진다. 히알루론산계 생성물은, 예를 들면, BDDE 및 다이비닐설판과 같은 화학물질을 포함하여 다양한 접근방법을 이용하여 가교결합된다. 가교결합된 히알루론산은 이어서 주사를 가능하게 하기 위해 미세화된다(예를 들면, 레스틸란(Restylane, 등록상표) 및 주베덤(Juvederm, 등록상표)). 히알루론산 이식물은 조직을 벌크화시키고 이식물내에 수분을 유지시킴으로써 그 효과를 나타내며 신체에 의해 서서히 재흡수된다.

[0005] 또 다른 예는 동물 또는 인간 조직으로부터 추출되고, 또한 가교결합되고[예를 들면, 글루타르알데하이드(지플라스트(Zyplast, 등록상표)) 또는 리보스계 가교결합(에볼런스(Evolence, 등록상표))], 균질화된 후 이식을 위해 식염수에 현탁된 콜라겐을 기재로 하는 콜라겐 기재 이식물이다. 콜라겐 이식물은 히알루론산 생성물과 유사한 방식으로 조직을 벌크화시킴으로써 그 효과를 나타내지만; 이들은 또한 이식물내로의 더 큰 세포 침윤 및 발생기 콜라겐 물질의 생성을 가능케 한다.

[0006] 폴리락트산(예를 들면, 스킵트트라(Sculptra, 등록상표))과 같은 중합체 및 하이드록시아파타이트(예를 들면, 라디쎬(Radiesse, 등록상표))와 같은 생체물질을 사용하는 접근방법은 주사가 가능한 겔, 전형적으로 히알루론산 또는 카복시메틸 셀룰로스과 같은 폴리사카라이드 중의 입자상 물질의 현탁액을 생성하는 것을 기초로 하였다. 입자상 이식물은 입자에 대해 이물체 반응을 유도하여 입자의 섬유아세포 캡슐화 및 콜라겐 생성을 유도함으로써(추가적 조직 축적을 통해 조직을 벌크화시킴으로써) 그 효과를 나타낸다.

[0007] 조직 벌크화제에 대한 현행 접근방법에 따른 한가지 문제는 이들이 전장 단백질 또는 실질적인 전장 단백질을 기본으로 하거나 이를 포함하는 생체물질을 전달할 수 없다는 것이다. 체내에서 천연으로 발견되는 것과 유사한 전장 또는 실질적인 전장 단백질 물질을 기본으로 하거나 이를 포함하는 제형은 많은 의도한 용도에 바람직한 생체적합성 및 자가 인식의 수준을 유지하기가 더 쉽다. 화학적 가교결합의 과정은 전형적으로 분자의 천연 구조를 파괴할 수 있는 실질적인 분자내 가교결합을 유도하며; 생성물 주사를 가능하게 하기 위해 사용되는 미세화 또는 균질화 기술은 전장 또는 실질적인 전장 단백질 분자 구조를 유지하는데 도움이 되지 않는다. 또한,

히알루론산과 단백질을 가교결합시키기 위해 사용되는 화학적 가교결합제는 공지되어 있는 독성을 가지며, 자극, 염증을 유발하거나 발암 위험성을 가질 수 있다.

[0008] 본 개시내용은 부분적으로, 단백질을 기재로 하거나 그로부터 유도되고, 혼입된 단백질 잔기가 그의 전장 또는 실질적인 전장 구조를 유지하게 할 수 있으며, 또한 단백질 잔기가 신속한 재흡수 및/또는 예를 들어 단백질분해로 인한 파괴로부터 보호되게 할 수 있는 응집성 생체물질의 주사가능한 제형을 제공하는 것에 관한 것이다. 또한, 본 개시내용은 부분적으로, 바늘 주사가 가능하고 응집성 구조를 유지하고 생체내에서 재흡수를 지연시키기 위해 충분히 가교결합되거나 이들의 조합인, 전장 또는 실질적인 전장 단백질을 기재로 하거나 그로부터 유도된 생체물질에 관한 것이다. 또한, 본 개시내용은 부분적으로, 독성 화학 가교결합제가 실질적으로 없는 생체물질에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 부분적으로, 하나 이상의 단백질 잔기 및 하나 이상의 생체분자 가교결합제 잔기를 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스의 제조 및/또는 제형화를 위한 방법, 시스템 및/또는 키트를 제공하며, 이때 하나 이상의 단백질 분자는 하나 이상의 생체분자 가교결합제와 가교결합되어 가교결합 단백질 매트릭스를 생성한다. 또한, 본 개시내용은 또한 부분적으로, 하나 이상의 단백질 잔기 및 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기를 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스의 제조 및/또는 제형화를 위한 시스템 및/또는 키트를 제공하며, 이때 단백질 분자, 예를 들면, 실질적인 전장 단백질 분자 또는 전장 단백질 분자는 폴리사카라이드 가교결합제와 가교결합되어 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 생성한다. 본원에 개시된 조성물, 방법, 시스템 및/또는 키트에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0009] 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 i) 하나 이상의 단백질 잔기; 및 ii) 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합 잔기를 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스일 수 있다.

[0010] 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 수성 및/또는 생리학적 매질중에 실질적으로 가용성인 조성물일 수 있다. 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 수성 및/또는 생리학적 매질중에 실질적으로 가용성, 부분적으로 가용성, 또는 실질적으로 불용성일 수 있다.

[0011] 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 실질적으로 생체이용성, 실질적으로 생체분해성, 실질적으로 생체흡수성 및/또는 실질적으로 생체재흡수성일 수 있는 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합 분자로부터 유도된 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기는 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기, 하나 이상의 올리고사카라이드 잔기 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 하나 이상의 폴리사카라이드를 포함할 수 있는데, 이때 상기 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기는 저분자량, 중간분자량 및/또는 고분자량 폴리사카라이드 잔기를 포함한다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 약 500 내지 약 500,000 달톤의 분자량을 갖는 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 하나 이상의 음으로 하전된 작용기 및/또는 하나 이상의 양으로 하전된 작용기를 포함하는 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기 또는 하나 이상의 올리고사카라이드 잔기를 포함하는 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 하나 이상의 다중 음이온성 폴리사카라이드 잔기 또는 하나 이상의 다중음이온성 올리고사카라이드 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 히알루론산, 셀룰로스 유도체, 카복시 셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시-프로필셀룰로스, 카복시메틸 아밀로스, 잔탄 검, 구아 검, α-글루칸, β-글루칸, β-1,4-글루칸, β-1,3-글루칸, 알기네이트, 카복시메틸 텍스트란, 글리코사미노글리칸 유도체, 콘드로이틴-6-설페이트, 더마틴 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 또는 생체물질, 예를 들면, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트-코-글리콜)산, 트라이칼슘 포스페이트, 1-하이드록시아파타이트 잔기, 및/또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 유도체 및/또는 조합들의 잔기로부터 유도되거나 이를 포함하는 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 약 0.01 내지 약 30%의 농도로 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다.

[0012] 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 전장 단백질의 잔기로부터 유도되거나 이를 포함하는 하나 이상의 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 하나 이상의 라이신 잔기 및/또는 하나 이상의 아르기닌 잔기를 포함하는 아민-함유 측쇄 잔기를 포함하는 하나 이상의 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 주사가능한 조성물은 트로포엘라스틴, 엘라스틴, 알부민, 콜라겐, 콜라겐 단량체, 면역글로불린, 인슐린 잔기, 및/또는 그의 유도체 또는 조합으로부터 유도되거나 이를 포함하는 하나 이상의 단백질 잔기를 포함할 수 있다.

- [0013] 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 약 10 cm 이상까지 압출가능한 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 압출가능하다. 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 약 5 내지 약 30 cm의 길이로 압출가능하다. 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 대략 또는 적어도 약 25 mg/ml의 단백질 잔기를 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 약 1 내지 약 250 mg/ml의 단백질 잔기를 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다.
- [0014] 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 하나 이상의 결합 및/또는 가교결합을 형성하기 위해 i) 활성화제 및/또는 커플링제; 및 ii) 변형제 및/또는 보조 커플링제를 사용하여 제조된 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다.
- [0015] 특정 태양에서, 주사가능한 조성물은 수술, 미용, 조직 벌크화, 실금 치료, 피부 대체 제품, 피부과, 피부과적 수술, 눈수술, 류마티스내과, 약리학 및/또는 화장품 분야를 포함하여 치료적으로 사용될 수 있다.
- [0016] 특정 태양에서, 하나 이상의 단백질 분자를 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합 분자와 가교결합시키는 것을 포함하는, 상기 조성물의 제조 방법이 개시된다. 특정 양태에서, 조성물의 제조 방법은 i) 하나 이상의 단백질 분자 상의 반응성 화학 기에 상보성인 하나 이상의 반응성 화학 기를 포함하도록 하나 이상의 사카라이드-함유 분자를 변형시키고; ii) 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자를 하나 이상의 단백질 분자와 결합시키고; iii) 하나 이상의 단백질 분자와 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자 사이에 하나 이상의 결합을 형성시키는 것을 포함한다.
- [0017] 특정 태양에서, 조성물의 제조 방법은 i) 하나 이상의 반응성 화학 기를 포함하도록 하나 이상의 사카라이드-함유 분자를 변형시키고; ii) 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자를, 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자상의 반응기에 상보성인 하나 이상의 반응성 화학 기를 포함하는 하나 이상의 단백질 분자와 결합시키고; iii) 하나 이상의 단백질 분자와 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자 사이에 하나 이상의 공유 결합을 형성시키는 것을 포함한다.
- [0018] 특정 양태에서, 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자는, 고체상 폴리사카라이드 합성동안 단백질 분자 또는 변형된 단백질 분자에 접합될 수 있는 반응성 링커를 포함하는 하나 이상의 잔기를 결합시킴으로써 제조된 변형된 폴리사카라이드 분자를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 상기 하나 이상의 잔기는 공유 결합에 의해 결합될 수 있다. 또한, 하나 이상의 잔기는 스페이서 기를 포함할 수 있다. 또한, 스페이서 기는 중합 에틸렌 옥사이드를 포함할 수 있다. 스페이서 기는 또한 PEG 또는 PEO일 수 있다.
- [0019] 특정 태양에서, 접합체는 공유 결합에 의해 형성될 수 있다. 또한, 특정 태양에서, 공유 결합은 아마이드, 옥심, 하이드라존, 에터, 아민, 예를 들면, 2급 또는 3급 아민, 엔올 에터, 티올에터, 에스터, 트리아아졸 및 다이실 퍼이드를 포함하는 기로부터 선택될 수 있다. 특정 양태에서, 공유 결합은 아마이드 또는 하이드라존을 포함할 수 있다.
- [0020] 특정 태양에서, 개시된 방법은 확실하고, 보다 효율적이고, 비용 효과적이고, 단순하고/하거나 이들의 조합일 수 있다.
- [0021] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 단백질 잔기 또는 변형된 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 2개의 상이한 단백질 잔기 또는 변형된 단백질 잔기를 포함할 수 있다.
- [0022] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기 또는 변형된 폴리사카라이드 잔기를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 2개의 상이한 폴리사카라이드 잔기 또는 변형된 폴리사카라이드 잔기를 포함할 수 있다.
- [0023] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 주사가능한 조성물일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 첨부한 도면은 본 개시내용의 다양한 태양들의 이해를 돕는다. 공정, 시스템, 키트, 제조법, 방법, 정제 또는 이들의 조합의 예시적인 태양들을 이제 첨부한 도면과 관련하여 오직 예로써 더 상세히 기술한다.

도 1은 특정 태양에 따라서, 히알루론산의 이상적인 반복 구조를 예시한 것이다. 히알루론산은 다이사카라이드 단위 당 하나의 카복실 기를 포함하는 β -D-글루쿠론산-[1,3]- β -D-N-아세틸-글루코사민 다이사카라이드 단위로

이루어진, 활성화되고 가교결합될 수 있는 폴리사카라이드이다.

도 2는 특정 태양에 따라서, EDC 및 NHS에 의해 매개된 카복실레이트-함유 분자(1) 및 아민(2)과의 반응을 예시한 것으로, 예시된 가능한 중간체 구조는 1급 아미노 기(1)와 반응하여 아미드 결합을 생성할 수 있는 NHS 활성화된 카복실레이트 중간체를 생성하기 위해 O-아실이소우레아 에스터, 및 N-하이드록시숙신이미드(NHS)와 같은 변형체로부터 생성된 NHS 에스터 중간체를 포함한다.

도 3은 특정 태양에 따라서, 하기의 레인을 함유하는, PBS에 침지된 실시예 5의 제형으로부터 추출된 단백질의 SDS PAGE 겔을 예시한 것이다: 마커(레인 M); 상등액(레인 A 및 B); 및 순수 TE(레인 TE).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 하기의 설명은 공통적인 특성 및 특징들을 공유할 수 있는 여러 태양들에 관하여 제공된다. 한 태양의 하나 이상의 특징들은 다른 태양들의 하나 이상의 특징들과 조합될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 특정 태양에서 단일 특징 또는 특징들의 조합은 추가의 태양을 구성할 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서, 단어 "포함하는"은 그의 "개방적" 의미에서, 즉, "함유하는"의 의미에서 이해되므로, 그의 "폐쇄적" 의미, 즉, "으로만 이루어지는"으로 제한되지 않는다. 상응하는 의미는 이들이 나오는 경우 상응하는 단어 "포함하다" 및 "포함된"에 따른다.
- [0027] 상세한 설명에 사용된 주제목은 독자의 참고의 용이성을 위해서만 포함되며, 개시내용 또는 특허청구범위 전체에 걸쳐 나오는 주제를 제한하기 위해 사용되어서는 안된다. 주제목은 특허청구범위의 범주 또는 특허청구범위 한계를 이해하는데 사용되어서는 안된다.
- [0028] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술 용어들은 당해 분야의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0029] 용어 "활성화된"은 친핵성 화합물에 의한 친핵성 공격 및/또는 친핵성 치환에 민감하고/하거나 취약할 수 있는 분자의 중간 형태를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 카복실 기를 포함하는 사카라이드-함유 분자와 같은 카복실 기 함유 분자, 예를 들면, 카복실 기를 포함하는 폴리사카라이드는, 예를 들면, 활성화된 중간체, 예를 들어, 활성화 에스터를 생성하기 위해 활성화제로 처리될 때 활성화될 수 있으며, 이때 활성화된 중간체는, 카복실 기 함유 분자 및 친핵성 화합물 사이에 결합, 예를 들어, 아미드 결합을 형성하기 위한, 아민과 같은 친핵성 화합물에 의한 친핵성 공격 및/또는 친핵성 치환에 민감하고/하거나 취약할 수 있다. 특정 태양에서, 하이드록실 기를 포함하는 사카라이드-함유 분자와 같은 하이드록실 함유 분자, 예를 들면, 하이드록실 기를 포함하는 폴리사카라이드는, 예를 들면, 에폭시 또는 할로히드린 반응기와 같은 활성화된 중간체를 생성하기 위한 활성화제로 처리될 때 활성화될 수 있으며, 이때 활성화된 중간체는 아민과 같은 화합물과 반응하여 하이드록실 기 함유 분자와 상기 화합물 사이에 결합, 예를 들어, 2급 또는 3급 아민 결합을 형성할 수 있다.
- [0030] 용어 "아미노산"은 라세믹이거나, D- 또는 L-구조를 갖는 α-아미노산을 말할 수 있다. 특정 태양에서, 아미노산은 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산, 예를 들면, 합성 유도된 비천연 아미노산일 수 있다. 아미노산 명칭 앞에 나오는 칭호 "d"(예를 들면, dAla, dSer, dVal 등)는 아미노산의 D-이성체를 말한다. 아미노산 명칭 앞에 나오는 칭호 "l"(예를 들면, lSer)은 아미노산의 L- 및 D-이성체의 혼합물을 말한다.
- [0031] 용어 "생체적합성" 물질은 특정 상황에서 적절한 숙주 반응, 예를 들면, 생물학적 기능에 의료적으로 허용될 수 없는 독성 또는 해로운 효과를 갖지 않는 반응하에 수행되는 물질의 능력을 포함할 수 있다.
- [0032] 용어 "생체접합체(bioconjugate)"는 2개 이상의 생체분자로부터, 2개 이상의 생체중합체로부터, 또는 1개 이상의 생체분자 및 1개 이상의 다른 생체중합체로부터 유도된 접합체를 말할 수 있다. 생체접합체는 또한 3개 이상의 생체분자, 생체중합체 및/또는 그의 조합으로부터 유도된 접합체를 포함할 수 있으므로, 하나 이상의 생체분자 및/또는 생체중합체가 하나보다 많은 생체분자 및/또는 생체중합체에 접합되어 분자간 가교결합을 갖는다. 생체접합체는 또한 접합된 개개 성분들 사이에 하나 이상의 결합, 예를 들면, 분자내 가교결합을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 생체접합체는 하나 이상의 분자간 가교결합을 가질 수 있다. 예를 들면, 생체접합체는 오직 분자간에만 가교결합될 수 있거나, 실질적으로 또는 주로 분자간에 가교결합될 수 있다. 특정 태양에서, 생체접합체는 하나 이상의 분자내 가교결합을 가질 수 있다. 예를 들면, 생체적합체는 오직 분자내에서만 가교결합될 수 있거나, 실질적으로 또는 주로 분자내에서 가교결합될 수 있다. 특정 태양에서, 생체적합체는 분자간 가교결합 및 분자내 가교결합 둘 다를 가질 수 있다. 생체적합체는 또한 하나 이상의 개개 성분들을 연결하는 하나 이상의 결합 사이에 하나 이상의 스페이서 기를 포함할 수 있거나, 스페이서 기는 개개 성분과 결합 사이

에 존재할 수 있다. 예를 들면, 스페이서 기는 에틸렌옥사이드 잔기, 반복 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-$ 잔기로부터 형성된 중합체, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리에틸렌 옥사이드(PEO) 및/또는 그의 유도체를 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다.

[0033] 용어 "생체분자"는 천연에서 발견된 화합물, 천연에서 발견된 화합물의 유도체(즉, 천연 분자), 천연에서 발견된 화합물의 합성 변형된 유사체, 천연에서 발견된 화합물의 유전자 조작된 유사체, 또는 천연에서 발견된 화합물의 유전자 조작 변형 유사체를 말할 수 있다. 예를 들면, 생체분자는 아미노산, 펩티드, 생체-활성 펩티드, 유전자 조작 펩티드, 단백질, 당단백질, 생체-활성 단백질, 부분 분해된 단백질, 전-활성(pro-active) 형태의 단백질, 유전자 조작 단백질, 효소, 항체, 유전자 조작 항체, 사카라이드, 디사카라이드, 트리아사카라이드, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고뉴클레오티드, RNA, DNA, 펩티드 핵산(PNA), 항원, 올리고사카라이드, 효소에 대한 기질, 핵산 수용체에 대한 기질, 및/또는 그의 유도체 또는 조합을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다.

[0034] 용어 "생체중합체"는 천연에서 발견된 화합물, 천연에서 발견된 화합물의 유도체, 천연에서 발견된 화합물의 합성 변형된 유사체, 천연에서 발견된 화합물의 유전자 조작된 유사체, 천연에서 발견된 화합물의 유전자 조작 변형 유사체를 말할 수 있으며, 이때 생체중합체는 단량체 단위로 구성될 수 있다. 예를 들면, 생체중합체는 펩티드, 펩티드 핵산(PNA), 올리고뉴클레오티드, RNA, DNA, 단백질, 효소, 항체, 당단백질, 트리아사카라이드, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드 및/또는 그의 유도체를 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 특정 태양에서, 생체중합체는 선형이거나 분지될 수 있거나, 특정한 3차원 디자인, 예를 들면, 스타버스트(starburst) 구조 또는 매트릭스-유사 구조를 가질 수 있다. 단량체 단위의 예로는 아미노산, 아미노산-유도체, 모노사카라이드, 디사카라이드, 트리아사카라이드, 당-유도체, PNA 분자, 뉴클레오티드, 뉴클레오시드 및/또는 그의 유도체 또는 조합이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다.

[0035] 특정 태양에서, 본원에 제공된 화합물들은 키랄 중심을 함유할 수 있다. 상기 키랄 중심은 (R) 또는 (S) 구조 중 어느 하나일 수 있거나, 그의 혼합물일 수 있다. 예를 들면, 본원에 제공된 화합물은 거울상이성체적으로 순수할 수 있거나, 부분입체이성체적으로 순수할 수 있거나, 입체이성체적으로 순수할 수 있다. 특정 태양에서, 본원에 제공된 화합물은 입체이성체 혼합물 또는 부분입체이성체 혼합물일 수 있다. 예를 들면, 아미노산 잔기의 경우, 각각의 잔기는 L 또는 D 형태일 수 있다. 예를 들면, 천연 아미노산 잔기에 바람직한 구조는 L이다.

[0036] 용어 "상보성 반응기"는 함께 반응할 때 공유 결합을 형성하는 기들을 나타낸다. 예를 들면, 아미노 반응기는 아민-반응성 함유 잔기와 직접 반응하여 아미드 결합 또는 아민 결합을 형성할 수 있는 잔기를 말할 수 있다. 예를 들면, 티올 반응기는 설포하이드릴-함유 반응기와 직접 반응하여 안정적인 설파이드 결합을 형성할 수 있는 잔기를 말할 수 있다. 예를 들면, 아미노 기는 카복실 유도체에 상보성일 수 있다. 예를 들면, 아미노 기는 하이드록실 유도체에 상보성일 수 있다. 예를 들면, 하이드라지노 기는 카보닐 유도체에 상보성일 수 있다. 예를 들면, 옥시아미노 기는 또한 카보닐 유도체에 상보성일 수 있다.

[0037] 용어 "접합체"는 서로 결합되는, 적어도 2개 이상의 성분들, 예를 들면, 서로 결합되는, 적어도 2개 이상의 생체분자 및/또는 생체중합체를 함유하는 화합물을 나타낼 수 있다. 개개 성분들은 하나 이상의 공유 결합, 하나 이상의 이온 결합을 통해, 킬레이트화에 의해서, 및/또는 그의 결합들의 혼합 또는 조합에 의해 직접 서로 결합될 수 있다. 특정 태양에서, 접합체는 개개 성분들 사이에, 적어도 2개 이상의 생체분자 및/또는 생체중합체를 함께 직접 결합시키는 직접 결합, 예를 들면, 이온 결합 또는 공유 결합, 예를 들어, 아미드 결합을 포함할 수 있다. 예를 들면, 접합체는 하나 이상의 공유 결합을 통해 제 2 성분, 예를 들면, 폴리사카라이드에 직접 결합되어 접합체, 예를 들면, 단백질-폴리사카라이드 접합체를 형성할 수 있는 제 1 성분, 예를 들면, 단백질을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 접합체는 개개 성분들 사이에 스페이서 기를 포함할 수 있으며, 이때 접합체는 2개의 개개 성분을 함께 결합시키기 위해 스페이서 기를 통한 2개 이상의 결합을 포함한다. 예를 들면, 제 1 생체분자는 스페이서 기와 제 1 결합을 형성할 수 있고, 제 2 생체분자는 스페이서 기와 제 2 결합을 형성할 수 있다. 접합체는 2개 이상의 개개 성분들을 함께 결합시키는 하나 이상의 결합 사이에 하나 이상의 스페이서 기를 포함할 수 있거나, 개개 성분과 결합 사이에 존재할 수 있다. 예를 들면, 스페이서 기는 글리콜 잔기, 에틸렌옥사이드 잔기, 반복 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-$ 잔기로부터 생성된 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리에틸렌 옥사이드(PEO), 폴리아민, 폴리올, 및/또는 그의 유도체 또는 조합을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다.

[0038] 용어 "가교결합 단백질 매트릭스"는 적어도 하나 이상의 분자 잔기, 예를 들면, 하나 이상의 생체분자 잔기 및/

또는 하나 이상의 생체중합체 잔기 또는 그의 유도체 또는 조합에 대한 적어도 하나 이상의 가교결합을 포함하는 하나 이상의 단백질 잔기를 말할 수 있다.

[0039] 용어 "잔기"는 반응 생성물에 잔류하는 분자 물질 또는 잔류 분자 물질의 부분을 말할 수 있다. 예를 들면, 반응 생성물, 예를 들어, 단백질 분자와 가교결합체를 반응시켜 유도된 가교결합 생성물에 잔류하는 단백질 분자 물질의 부분은 단백질 잔기로 불린다. 예를 들면, 반응 생성물, 예를 들어, 사카라이드-함유 분자와 단백질 분자를 반응시켜 유도된 가교결합 생성물에 잔류하는 사카라이드-함유 분자 물질의 부분은 사카라이드-함유 잔기로 불린다.

[0040] 용어 "미세 바늘" 또는 "미세 게이지 바늘" 또는 "미세 바늘 주사"는 약 25G 이하 크기의 바늘의 사용을 말할 수 있지만, 이로 한정되지는 않는다. 더 넓은 게이지의 바늘도 또한 본원에서 더 논의하는 바와 같은 특정 용도에 사용될 수 있다.

[0041] 용어 "히알루론산" 또는 "HA"는 히알루론산, 및 예를 들면, 나트륨 히알루로네이트(나트륨염), 칼륨 히알루로네이트, 마그네슘 히알루로네이트 및 칼슘 히알루로네이트를 포함하여 그의 임의의 히알루로네이트 염을 포함할 수 있다. 다양한 공급원으로부터의 히알루론산이 본 발명에 사용될 수 있다. 예를 들면, 히알루론산은 동물 조직으로부터 추출되거나, 세균 발효 산물로서 수거되거나, 생물공정 기술에 의해 상업적 양으로 생산될 수 있다.

[0042] 용어 "결합"은 서로 결합되는 2개의 개개 분자 성분 사이의 연결 또는 결합을 말할 수 있다. 특정 태양에서, 서로 결합될 수 있는 개개 분자 성분들은 생체중합체, 변형된 생체중합체, 예를 들면, 생물학적으로 및/또는 합성적으로 변형된 생체중합체, 생체분자, 변형된 생체분자, 예를 들면, 생물학적으로 및/또는 합성적으로 변형된 생체분자를 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 예를 들면, 2개의 생체분자 사이, 생체분자와 스페이서 기 사이, 2개의 생체중합체 사이, 생체중합체와 스페이서 기 사이, 2개의 변형된 분자 사이, 및/또는 그의 유도체 또는 조합 사이의 연결 또는 결합. 특정 태양에서, 결합은 열분해 또는 가수분해 또는 둘 다에 안정할 수 있다. 특정 태양에서, 결합은 생체적합성일 수 있다. 특정 태양에서, 결합은 공유 결합, 이온 결합, 및/또는 그의 조합의 형성에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 결합은 하나 이상의 공유 결합 및/또는 하나 이상의 이온 결합의 조합의 형성에 의해 생성될 수 있다. 특정 태양에서, 공유 결합은 아미드 결합, 옥심 결합, 하이드라존 결합, 트리아아졸 결합, 설파이드 결합, 에터 결합, 아민 결합, 예를 들어, 2급 또는 3급 아민 결합, 엔올 에터 결합, 에스터 결합, 다이설파이드 결합, 또는 그의 혼합물의 형성을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 특정 태양에서, 아미드 결합은, 예를 들면, 사카라이드-함유 생체분자의 카복실산 기 또는 활성화된 카복실산 잔기와, 아미노산-함유 생체분자, 예를 들면, 단백질, 예를 들어, 라이신 잔기를 포함하는 단백질의 아민 기 사이에 형성될 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 아미드 결합은, 예를 들면, 변형-사카라이드 잔기, 예를 들어, 스페이서 기로 변형된 폴리사카라이드 잔기를 포함하는 생체분자와, 아미노산 잔기를 포함하는 생체분자, 예를 들어, 단백질 사이에 존재할 수 있다. 특정 태양에서, 아미드 결합은, 예를 들면, 사카라이드 잔기를 포함하는 생체분자와, 변형-아미노산 잔기를 포함하는 생체분자, 예를 들어, 스페이서 기로 변형된 단백질 사이에 존재할 수 있다.

[0043] 용어 "변형된"은 천연 과정, 합성 화학적 변형, 생체공학 등, 및/또는 그의 조합 또는 변형에 의한, 생체분자 또는 생체중합체와 같은 분자 및/또는 분자상 잔기의 변형을 말할 수 있다. 특정 태양에서, 분자 및/또는 분자상 잔기는 분자상에 이미 존재하는 잔기의 전환에 의해, 예를 들면, 합성 화학적 전환 과정 및/또는 천연 과정, 추가 잔기의 결합, 및/또는 그의 조합 또는 변형에 의해 변형될 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 분자상에 잔기의 결합은 공유 결합의 형성에 의할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 전환된 잔기를 포함하는 변형 분자는 상보성 반응기와 반응하여 결합, 가교결합 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 형성할 수 있거나 더 잘 형성할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 결합 잔기를 포함하는 변형 분자는 상보성 반응기와 반응하여 결합, 가교결합, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 형성할 수 있거나 더 잘 형성할 수 있다. 특정 태양에서, 전환 및/또는 결합된 잔기를 포함하는 변형 분자는, 예를 들면, 반응기, 결합가능한 기, 스페이서 기, 상보성 반응기, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 전환 및/또는 결합된 잔기를 포함하는 변형 분자는, 합성 화학적 변형에 의해 또는 천연 과정에 의해 생성 및/또는 탈보호되어, 예를 들면, 상보성 반응기와 반응하여 결합 또는 가교결합을 형성하도록 반응하는데 이용가능할 수 있는 잔기, 예를 들어, 반응기를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 변형 분자는 카복실 기와 같은 화학 기를 활성화시킴으로써, 스페이서 기를 결합시킴으로써, 반응 잔기를 탈보호시킴으로써, 및/또는 이들의 조합 또는 변형에 의해 유도될 수 있다.

[0044] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어, 폴리사카라이드의 "몰" 또는 "몰 농도(M)"는 중합체내에 함유된 반복 단량체

단위의 물을 말한다.

- [0045] 용어 "폴리사카라이드"는, 예를 들면, 3개 이상의 사카라이드 잔기, 예를 들면, 3개 이상의 사카라이드 단량체 반복 단위, 예를 들어, 3개 이상의 모노사카라이드 반복 단위, 3개 이상의 다이사카라이드 반복 단위, 3개 이상의 트라이사카라이드 반복 단위, 3개 이상의 올리고사카라이드 반복 단위, 및/또는 이들의 조합 또는 유도체를 포함하는 사카라이드-함유 분자를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 폴리사카라이드는 동일하고/하거나 상이한 사카라이드 잔기, 예를 들면, 하나 이상의 동일하고/하거나 상이한 사카라이드 잔기, 2개 이상의 동일하고/하거나 상이한 사카라이드 잔기, 3개 이상의 동일하고/하거나 상이한 사카라이드 잔기, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함할 수 있다.
- [0046] 용어 "사카라이드-함유 분자"는, 예를 들면, 모노사카라이드, 다이사카라이드, 트라이사카라이드, 올리고사카라이드 및/또는 폴리사카라이드를 포함하는 분자를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 사카라이드-함유 분자는 모노사카라이드, 다이사카라이드, 트라이사카라이드, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드를 포함하는 단량체 반복 단위를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 사카라이드-함유 분자는 하나 이상의 같거나 다른 사카라이드 단량체 반복 단위를 포함할 수 있다. 예를 들면, 사카라이드-함유 분자는 하나 이상의 같거나 다른 다이사카라이드, 트라이사카라이드, 올리고사카라이드 및/또는 폴리사카라이드 단량체 반복 단위를 포함할 수 있다.
- [0047] 특정 태양에서, 사카라이드-함유 잔기는 올리고사카라이드, 변형-올리고사카라이드, 폴리사카라이드, 변형-폴리사카라이드 및/또는 그의 유도체로부터 유도될 수 있거나, 사카라이드-함유 가교결합 분자, 예를 들면, 올리고사카라이드 가교결합체, 변형-올리고사카라이드 가교결합체, 폴리사카라이드 가교결합체, 변형-폴리사카라이드 가교결합체, 및/또는 그의 유도체로부터 유도될 수 있다.
- [0048] 용어 "단백질" 또는 "단백질 단위" 또는 "단백질 단량체"는, 예를 들면, 전장 단백질, 실질적인 전장 단백질, 단백질 단편, 생체활성 단백질, 생체활성 단백질 단편, 전환성 형태의 단백질, 불활성 단백질, 활성 부위를 포함하는 단백질, 결합 부위를 포함하는 단백질, 단백질분해 절단 부위를 포함하는 단백질, 부분 분해된 단백질, 부분 가수분해된 단백질, 하나 이상의 단일-점 돌연변이를 포함하는 단백질, 약 50 내지 약 99.99%의 전장 단백질을 포함하는 단백질, 전장 단백질 중 약 50 내지 약 99.99%의 아미노산의 보존을 포함하는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 단백질은, 예를 들면, 하나 이상의 생체활성 펩티드 서열을 포함하는 펩티드, 하나 이상의 수용체 결합 부위를 포함하는 펩티드, 하나 이상의 단백질분해 절단 부위를 포함하는 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함할 수 있다.
- [0049] 특정 태양에서, 단백질은, 예를 들면, 하나 이상의 라이신 잔기, 하나 이상의 아르기닌 잔기, 하나 이상의 시스테인 잔기, 하나 이상의 세린 잔기, 하나 이상의 트레오닌 잔기, 하나 이상의 티로신 잔기, 하나 이상의 글루탐메이트 잔기, 하나 이상의 아스파테이트 잔기, 하나 이상의 프롤린 잔기, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함하는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 단백질은, 예를 들면, 하나 이상의 이량체 잔기, 예를 들어, 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 단백질을 포함할 수 있다.
- [0050] 특정 태양에서, 단백질은, 예를 들면, 하나 이상의 아민기를 포함하는 단백질, 하나 이상의 아민-함유 측쇄를 포함하는 단백질, 하나 이상의 아민-함유 아미노산 잔기를 포함하는 단백질, 예를 들면, 하나 이상의 라이신 잔기를 포함하는 단백질, 하나 이상의 아르기닌 잔기를 포함하는 단백질, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 단백질은 아민-풍부 영역, 예를 들어, 라이신-풍부 영역 또는 아르기닌-풍부 영역, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함하는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 단백질은, 예를 들면, 폴리(아민-잔기) 단백질, 예를 들어, 폴리라이신, 폴리아르기닌, 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함할 수 있다.
- [0051] 특정 태양에서, 단백질은 단독중합체 또는 공중합체, 예를 들면, 아미노산 잔기의 단독중합체 또는 공중합체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 단백질은 라이신 잔기, 아르기닌 잔기 및/또는 히스티딘 잔기의 단독중합체 또는 공중합체, 예를 들면, 라이신-풍부 영역을 포함하는 단백질을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 라이신-풍부 영역을 포함하는 단백질은, 폴리라이신 영역을 포함하는 단백질, 예를 들어, 5개 이상의 라이신 단위를 포함하는 단백질과 같이, 2개 이상의 라이신 단위를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 아르기닌-풍부 영역을 포함하는 단백질은, 폴리아르기닌 영역을 포함하는 단백질, 예를 들어, 5개 이상의 아르기닌 단위를 포함하는 단백질과 같이, 2개 이상의 아르기닌 단위를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 단백질은, 예를 들면, 하나 이상의 라이신-풍부 영역 및 하나 이상의 아르기닌-풍부 영역, 및/또는 이들의 조합 또는 유도체를 포함하는 단백질과 같이, 2개 이상의 상이한 잔기-풍부 영역을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 단백질은 트로포엘라스틴, 엘라스틴, 알부민, 콜라겐, 콜라겐 단량체, 면역글로불린, 인슐린 및

/또는 그의 유도체 또는 조합을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다.

- [0052] 특정 태양에서, 단백질은 변형된 단백질 또는 단백질 유도체를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 변형된 단백질 또는 단백질 유도체는 천연 과정, 합성 화학적 변형 및/또는 그의 조합으로부터 제조되고/되거나 이로부터 또는 이들에 의해 유도된 단백질일 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 변형 단백질 또는 단백질 유도체는 진핵 세포, 원핵 세포 및/또는 그의 조합에서 일어나는 바와 같은 천연 과정으로부터 제조되고/되거나 이로부터 또는 이에 의해 유도된 단백질일 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 천연 과정은 단백질 합성, 단백질 분해, 가수분해, 효소 처리 및/또는 접합, 산화, 환원, 글리코실화, 아민화, 카복실화, 아미노산 잔기 또는 스페이스 기(때때로 링커 기로 불림)의 혼입, 아미노산 잔기 또는 스페이스 기의 변형 및/또는 유도체화, 및/또는 이들의 조합 또는 변형을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 변형 단백질 또는 단백질 유도체는 합성 화학적 변형으로부터 제조되고/되거나 이로부터 또는 이에 의해 유도된 단백질일 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 합성 화학적 변형은 산화, 환원, 접합, 가수분해, 아민화, 에스터화, 아미드화, 환원성 아민화, 카복실 기 활성화, 카복실 기 변형, 아미노산 잔기 또는 스페이스 기(때때로 링커 기로 불림)의 혼입, 아미노산 잔기 또는 스페이스 기의 변형 및/또는 유도체화, 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 변형 단백질 또는 단백질 유도체는 고체상 합성, 액상 합성 및/또는 그의 조합에 의해 제조될 수 있다. 특정 태양에서, 변형 단백질 또는 단백질 유도체는 아민-함유 아미노산 잔기 풍부 영역, 예를 들면, 라이신 풍부 영역을 포함하는 단백질로부터 제조될 수 있다.
- [0053] 특정 태양에서, 단백질 잔기는 본원에 개시된 바와 같은 단백질 및/또는 그의 유도체로부터 유도될 수 있다.
- [0054] 용어 "스페이스 기"는, 예를 들면, 하나 이상의 개개 성분을 결합시키는 잔기, 예를 들면, 단백질 및 폴리사카라이드를 결합시키는 잔기를 포함할 수 있다.
- [0055] 용어 "합성 분자"는 천연적으로 유도되지 않은 소(小) 분자 또는 중합체를 말할 수 있다. 예를 들면, 합성 분자는 고체상 합성, 액상 합성 또는 그의 조합에 의해 화학적 변형에 의해 제조될 수 있다.
- [0056] 특정 태양은 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 폴리사카라이드를, 단백질과 결합시 공유 결합을 형성할 수 있는 화학 기로 변형 또는 유도체화시키는 방법을 제공한다. 폴리사카라이드는 물 및/또는 식염수 용액 중에서 가용성 또는 충분히 가용성으로 유지되게 할 수 있는 방식으로 변형될 수 있다. 폴리사카라이드의 변형 후 잔류하는 반응물의 대부분은, 예를 들면, 침전 또는 여과를 통해 제거된다. 변형된 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 폴리사카라이드는 이어서 가교결합제로 사용될 수 있다. 이어서, 변형된 폴리사카라이드의 용액을 필요한 단백질 또는 단백질들과 혼합하고 반응시킬 수 있다. 변형 폴리사카라이드 상의 변형된 화학 기는 단백질과 반응하여 생체물질을 생성한다. 이렇게 생성된 생체물질은 통상적인 접근방법을 사용하여 생성된 생체물질과 비교할 때 일부 독특한 성질을 갖는다. 예를 들면, 분자내 가교결합을 야기하는 화학물질을 사용하여 가교결합된 단백질로부터 생성된 제형은 전형적으로 불투명하며 종종 황색 또는 갈색의 색조를 띠는 백색의 색을 갖는다. 특정한 개시된 방법에 의해 수득된 제형은 투명한 무색 제형이다. 또한, 화학물질, 예를 들면, 글루타르알데하이드와 가교결합된 단백질은 제형중에 잔류하는 잔류 화학물질을 가질 수 있어 생체내에서 염증을 유발하고/하거나 생성물의 생체적합성을 저하시킬 수 있다. 특정한 개시된 방법에 의해 수득된 제형은 실질적으로 임의의 상기 잔류 화학물질들이 없다.
- [0057] 화학적 가교결합제 또는 짧은 가교결합 분자를 사용하여 생성된 제형은 종종, 주사기 또는 바늘을 사용한 전달을 가능하게 하기 위해 미세화 또는 균질화되어야 하거나; 바늘 압출을 가능하게 하기 위해 가교결합 수준을 최소 수준으로 유지시켜야 하는 생체물질을 제공한다. 너무 과도하게 가교결합된, 화학물질, 예를 들어, 글루타르알데하이드와 가교결합된 단백질은 미세 게이지 바늘을 통해 압출될 수 없다.
- [0058] 특정한 개시된 방법에 의해 제조된 제형은 추가의 처리 또는 실질적인 추가의 처리없이 미세 게이지 바늘을 통해 압출될 수 있다. 특정한 개시된 제형은, 물질의 파괴없이 물질의 충분히 긴 스트링이 바늘로부터 압출될 수 있도록(예를 들면, >10 cm, >12 cm, >15 cm, >18 cm, >20 cm, 등) 바늘 압출후에도 충분한 응집성을 유지한다. 또한, 본원에 개시된 특정 태양을 이용하여, 전장 단백질을 기재로 하고 가교결합제로서 변형 폴리사카라이드를 사용하는 제형은, 미세 게이지 바늘을 통한 분출을 가능하게 하기 위해 충분한 유연성을 여전히 유지하는 매우 안정된 생체물질을 생성할 수 있는 유연한 매트릭스 구조를 제공한다.
- [0059] **가교결합 단백질 매트릭스**
- [0060] 가교결합 단백질 매트릭스는 개시된 태양들에서 달라질 수 있다.
- [0061] 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 단백질 분자, 예를 들면, 하나 이상의 전장 단백질과 하나

이상의 사카라이드-함유 분자, 예를 들어, 하나 이상의 변형된 사카라이드-함유 분자의 가교결합으로부터 유도될 수 있다.

[0062] 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는, 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기와 가교결합된 하나 이상의 단백질 잔기, 예를 들면, 사카라이드 가교결합된 단백질, 다이사카라이드 가교결합된 단백질, 트라이사카라이드 가교결합된 단백질, 올리고사카라이드 가교결합된 단백질 또는 폴리사카라이드 가교결합된 단백질을 포함할 수 있다.

[0063] 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기에 대한 하나 이상의 결합에 의해 하나 이상의 단백질 잔기 사이에 하나 이상의 결합을 포함할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 단백질 잔기는 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기에 대한 하나 이상의 결합에 의해 서로 연결 또는 결합될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 하나 이상의 공유 결합 및/또는 하나 이상의 이온 결합 또는 그의 조합에 의해, 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기, 예를 들면, 올리고사카라이드 잔기 또는 폴리사카라이드 잔기에 결합된 하나 이상의 단백질 잔기를 포함할 수 있다.

[0064] 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 결합, 즉, 하나 이상의 가교결합, 예를 들면, 하나 이상의 분자간 가교결합 및/또는 하나 이상의 분자내 가교결합 또는 그의 혼합 또는 조합을 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 분자간 가교결합, 실질적으로 분자간 가교결합, 분자내 가교결합, 실질적으로 분자내 가교결합, 및/또는 분자간 및 분자내 가교결합 둘 다 될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 가교결합제, 예를 들어, 사카라이드-함유 가교결합제, 예를 들면, 폴리사카라이드 또는 변형된 폴리사카라이드, 예를 들어, 히알루론산 또는 변형 히알루론산으로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 가교결합제로부터 유도될 수 있고, 상기 하나 이상의 가교결합제는 하나 이상의 단백질 분자에 결합 및/또는 가교결합되고/되거나 동일 단백질 분자에 하나 이상의 결합을 형성할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 매트릭스 구조, 예를 들면, 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합제 잔기에 결합 및/또는 가교결합된 단백질 잔기의 매트릭스를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스의 매트릭스 구조는 유연성을 제공할 수 있으며, 이때 가교결합 단백질 매트릭스 내에서의 가교결합도는 제공된 유연성을 변화시킬 수 있다.

[0065] 특정 태양에서, 본원에 개시된 바와 같은 분자내 가교결합제가 실질적으로 없는 전장 단백질로부터 유도된 가교결합 단백질 매트릭스의 사용은 보다 조직 적합성이고 조직 내부성장(in-growth)을 증대시키고 조직 재생장을 증대시키거나 이들의 조합인 제형을 제공할 수 있다. 상기 제형은 또한 보다 전형적이며 바람직한 구조로 개조되고/되거나 새로운 조직내에 혼입될 수 있다.

[0066] 특정 태양에서, 본원에 개시된 바와 같은 분자내 가교결합제가 실질적으로 없는 실질적인 전장 단백질로부터 유도된 가교결합 단백질 매트릭스의 사용은 보다 조직 적합성이고 조직 내부성장, 재생장을 증대시키거나 이의 조합인 제형을 제공할 수 있다. 상기 제형은 또한 보다 전형적이며 바람직한 구조로 개조되고/되거나 새로운 조직내에 혼입될 수 있다.

[0067] 본원에 개시된 다른 태양은 가교결합 단백질 매트릭스의 단백질 잔기에 어느 정도의 분자내 가교결합을 가질 수 있으며, 여전히 사용에 허용될 수 있기에 충분한 성질을 제공한다.

[0068] 특정 태양에서, 단백질 잔기의 구조가 실질적으로 가교결합 공정에 의해 차폐되지 않는 실질적인 전장 단백질로부터 유도된 가교결합 단백질 매트릭스의 사용은 보다 조직 적합성이고 조직 내부성장, 재생장을 증대시키거나 그의 조합인 제형을 야기할 수 있다. 상기 제형은 또한 보다 전형적이며 바람직한 구조로 개조되고/되거나 새로운 조직내에 혼입될 수 있다.

[0069] **가교결합도**

[0070] 특정 태양에서, 사카라이드-함유 가교결합제, 예를 들어, 폴리사카라이드 가교결합제의 용해도는, 폴리사카라이드의 변형, 유도체화 및/또는 취급시에 사용되는 화학적 시약의 특정 비를 사용함으로써 유지될 수 있다. 특정 태양에서, 유도체화 폴리사카라이드가 스스로 가교결합되지 않도록 하기 위해, 유도체화 이후 공정시에 특별한 사전조치를 이용하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들면, 유도체화된 HA는 잔류 반응물을 세척하기 위해 침전된 후 상당히 신속하게 처리되어야 할 수 있다. 특정 태양에서, 유도체화 HA의 침전, 반응물의 세척, 및 수용액중 재현탁은 약 30 분 내에 수행될 수 있다. 특정 상황에 따라 다른 시간 기간을 이용할 수 있다. 예를 들면, 유도체화 HA의 침전, 반응물의 세척 및 수용액중 재현탁은 적어도 20, 30, 40, 50 분, 1 시간 또는 2 시간 내에 수행될 수 있다.

[0071] 특정 태양에서, 수 시간, 예를 들면, 적어도 1, 2 또는 3 시간이 걸릴 수 있는 용해 속도를 증가시키기 위해 해리에 앞서 유도체화 HA 침전물을 더 작은 조각으로 더 세분하는 것이 또한 유용할 수 있다. 일단 용해되면, 특

정 용도에서, 특정 시간내에, 예를 들면, 적어도 1, 2, 3, 4 또는 24 시간 이내에 유도체화 폴리사카라이드를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 이것은 필수적이진 않을 수 있으며, 특정 제형 및/또는 용도에 따라 달라질 것이다.

- [0072] 특정 태양에서, 제형중 가교결합 단백질 매트릭스를 생성하기 위해 사용되는 단백질 분자는 적절한 반응기가 폴리사카라이드 가교결합체에 의해 가교결합될 수 있어야 하는 필요조건에 의해 제한될 수 있다.
- [0073] 특정 태양에서, 단백질 단량체의 약 50% 이상이 생체분자 및/또는 생체중합체, 예를 들어, 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드 또는 그의 유도체와 가교결합될 수 있다. 다른 태양에서, 단백질 단량체의 약 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이 생체분자 및/또는 생체중합체 또는 그의 유도체와 가교결합될 수 있다. 특정 태양에서, 단백질 단량체는 생체분자 및/또는 생체중합체와 실질적으로 또는 완전히 가교결합될 수 있다.
- [0074] 특정 태양에서, 폴리사카라이드 당 가능한 가교결합 부위 당 가교결합의 수는 적어도 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 50%일 수 있다.
- [0075] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 또는 복합체 내에 혼입되지 않고 결합되지 않은 채 유지되는 단백질 단위 또는 단백질 단량체의 수는 적어도 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 10%, 15% 또는 20%일 수 있다. 특정 용도에서 가교결합 단백질 매트릭스 또는 복합체의 생성 후에 결합되지 않고 유지되는 단백질 단위의 퍼센트를 최소화시키는 것이 바람직하다. 예를 들면, 특정 용도에서, 가교결합후 제형중에 결합되지 않은 단백질 단위를 20%, 15%, 10%, 7%, 5%, 3% 또는 1% 미만으로 갖는 것이 바람직할 수 있다. 미결합 단백질 단위 또는 단백질 단량체의 기여는 본 개시내용의 특정 용도의 이점들 중 하나이다.
- [0076] 퍼센트는 특정 용도에 대해 선택된 단백질 및 선택된 화학물질 유형을 포함하여(이로 한정되지는 않는다) 많은 고려사항에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 트로포엘라스틴과 라이신 결합의 경우, 일부 용도에서 가능한 부위의 수는 전형적으로 약 30 내지 약 35이므로, 비율은 1 내지 35(또는 약 3 내지 100%)일 수 있다. 상기 조합과 관련하여, 가교결합 단백질 매트릭스에 바람직한 퍼센트는, 하나 이상의 생체분자 및/또는 생체중합체, 예를 들어, 사카라이드-함유 분자 또는 그의 유도체와 가교결합되는 하나 이상의 단백질 분자 상의 가능한 부위의 수의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%일 수 있다.
- [0077] 또 다른 고려사항은 사카라이드 함유 분자, 예를 들면 폴리사카라이드의 길이, 및 활성화, 유도체화 또는 변형에 사용되는 화학물질이다. 예를 들면, 특정 용도에서 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드 상의 카복실 기의 하나 이상의 카복실산 기의 1 내지 30%, 1 내지 40%, 3 내지 30% 또는 5 내지 30%가 활성화제, 예를 들어, NHS에 의해 활성화되어 단백질과의 가교결합에 이용가능한 활성화 에스터 부위 1 내지 30%, 1 내지 40%, 3 내지 30% 또는 5 내지 30%를 형성할 수 있다. 예를 들면, 특정 용도에서, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드 상의 하나 이상의 하이드록실 기의 1 내지 30%, 1 내지 50%, 3 내지 30% 또는 5 내지 30%가 활성화제, 예를 들어, 알릴글리시딜 에터에 의해 활성화되고, 할라이드, 예를 들어, 브롬에 의해 더 변형되어 단백질과의 가교결합에 이용가능한 활성화 에폭시 또는 할로히드린 부위 1 내지 30%, 1 내지 40%, 3 내지 30%, 5 내지 30% 또는 1 내지 50% 를 형성할 수 있다. 다소 효과적인 다른 화학물질도 또한 사용될 수 있다. 또 다른 고려사항은 단량체(즉, 미결합)로 유지될 수 있는 단백질 단위의 퍼센트를 낮게, 예를 들면, 5% 이하로 유지하는 것이다.
- [0078] 특정 태양에서, 단백질 단량체는, 약 40 내지 약 99%의 단백질 단량체가 제형중에 혼입될 수 있도록 생체분자 및/또는 생체중합체와 가교결합될 수 있다. 다른 태양에서, 단백질 단량체는, 약 30 내지 약 99%, 약 40 내지 약 99%, 약 50 내지 약 100%, 약 60 내지 약 100%, 약 70 내지 약 99%, 80 내지 약 100%, 또는 약 90 내지 약 100%의 단백질 단량체가 제형중에 혼입될 수 있도록 가교결합될 수 있다.
- [0079] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 일정 기간동안 생분해, 분해, 열분해, 가수분해, 및/또는 그의 조합에 대해 허용되는 내성을 가질 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 제형은 일정 기간동안 생분해, 분해, 열분해, 가수분해, 및/또는 그의 조합에 대해 허용되는 내성을 가질 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스에 따라서 상기 기간은 적어도 1, 2, 3, 6, 9 또는 12 개월일 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 제형에 따라서 상기 기간은 적어도 1, 2, 3, 6, 9 또는 12 개월일 수 있다.
- [0080] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 제형은 생체내에서 1 주일 내지 1 년동안 허용가능하게 손상되지 않고 유지되고/되거나 존속될 수 있다. 특정 제형에 따라서, 상기 기간은 달라질 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 제형은 적어도 1 내지 4 주, 2 내지 8 주, 1 내지 3 개월, 1 내지 6 개월, 3 내지 9 개월 또는 6 내지 12 개월, 1 주 내지 24 개월 또는 12 내지 24 개월 동안 존속될 수 있다. 특

정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 제형은 생체내에서 적어도 1 주, 2 주, 4 주, 2 개월, 3 개월, 6 개월, 9 개월, 12 개월, 15 개월 또는 24 개월 동안 존속될 수 있다.

[0081] 예를 들면, 특정 태양에서, 가교결합 단백질을 포함하는 제형, 예를 들면, 0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml 또는 0.5 ml, 1 ml, 2 ml 또는 3 ml 이식물은 생체내에서 약 1 주 내지 약 2 년 동안 존속될 수 있다.

[0082] 특정 태양에서, 제형내의 가교결합 단백질 매트릭스 성분은 제형의 저장 동안 열분해에 안정하거나, 열분해에 내성이거나, 가수분해에 안정하거나, 가수분해에 내성이거나, 이들의 조합일 수 있다. 예를 들면, 제형은 약 2 내지 8 °C의 온도에서 저장시 적어도 6, 12 또는 24 개월 동안 안정할 수 있다. 제형내 가교결합 매트릭스 성분은 제형 저장 동안 열분해에 안정하거나, 열분해에 내성이거나, 가수분해에 안정하거나, 가수분해에 내성이거나, 이들의 조합일 수 있어서, 동결건조되고 적절한 온도, 예를 들면, 약 -10 °C 이하에서 저장되는 경우, 상기 제형은 수년동안 안정할 수 있다. 제형내 가교결합 단백질 매트릭스 성분은 실온에서 제형 저장 동안 적어도 1, 2, 3, 4 주, 1, 2, 6 또는 12 개월동안 열분해 및/또는 가수분해에 대해 안정하고/하거나 내성일 수 있다. 특정 태양에서, 제형내 가교결합 단백질 매트릭스 성분은 실온에서 제형 저장 동안 적어도 1 주 내지 12 개월, 2 주 내지 8 개월, 1 주 내지 5 개월 또는 1 내지 6 개월동안 열분해 및/또는 가수분해에 안정하고/하거나 내성일 수 있다.

[0083] **동종 및 이종 가교결합 단백질 매트릭스**

[0084] 가교결합 단백질 매트릭스는 구조 및 조성에서 다양할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 하나 이상의 균질 또는 동종 생체분자, 예를 들어, 동종 생체중합체, 예를 들면, 동종 사카라이드-함유 분자와 가교결합된 하나 이상의 균질 또는 동종 단백질 잔기를 포함하는 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는, 하나 이상의 불균질 또는 이종 생체분자 잔기, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 생체분자 잔기, 예컨대, 이종 생체중합체 잔기, 예를 들면, 이종 사카라이드-함유 잔기와 가교결합된 하나 이상의 동종 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 단백질은 하나 이상의 상이한 분자, 또는 2개 이상의 상이한 분자, 예를 들면, 상이한 생체분자 또는 생체중합체 및/또는 그의 유도체 또는 조합과 가교결합된다. 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 상이한 사카라이드-함유 잔기, 예를 들어, 하나 이상의 상이한 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드 잔기 및/또는 그의 조합과 가교결합된 하나 이상의 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 상이한 폴리사카라이드 잔기의 혼합물, 예를 들면, 히알루론산 잔기와 카복시메틸 셀룰로스 잔기의 블렌드 또는 혼합물과 가교결합된 하나 이상의 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는, 하나 이상의 단백질 분자를 하나 이상의 상이한 활성화 폴리사카라이드들의 혼합물, 예를 들면, 활성화 히알루론산과 활성화 카복시메틸 셀룰로스의 블렌드 또는 혼합물과 가교결합시켜 제조될 수 있다.

[0085] 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 동종 생체분자 잔기, 예를 들어, 동종 생체중합체 잔기, 예컨대, 동종 사카라이드-함유 분자 잔기와 가교결합된 이종 단백질 잔기, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 단백질 잔기를 포함하는 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 이종 생체분자 잔기, 예를 들어, 2개 이상의 상이한 생체분자 잔기, 예컨대 이종 생체중합체 잔기, 예를 들면, 이종 사카라이드-함유 잔기와 가교결합된 이종 단백질 잔기, 예를 들어, 2개 이상의 상이한 단백질 잔기를 포함하는 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 분자 잔기, 예를 들면, 생체분자 잔기, 생체중합체 잔기 및/또는 그의 유도체 또는 조합과 가교결합된 하나 이상의 상이한 단백질 잔기, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질은 사카라이드-함유 잔기, 예를 들어, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드 잔기와 가교결합된 하나 이상의 상이한 단백질 잔기, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 단백질 잔기를 포함할 수 있다.

[0086] 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 상이한 분자 잔기, 예를 들면, 하나 이상의 상이한 생체분자 잔기, 하나 이상의 상이한 생체중합체 잔기 및/또는 그의 유도체 또는 조합과 가교결합된 하나 이상의 상이한 단백질 잔기, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 단백질 분자를 포함할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 상이한 사카라이드-함유 잔기, 예를 들면, 하나 이상의 상이한 올리고사카라이드 잔기 및/또는 하나 이상의 상이한 폴리사카라이드 잔기, 예컨대 2개 이상의 상이한 올리고사카라이드 잔기 및/또는 2개 이상의 상이한 폴리사카라이드 잔기 또는 그의 혼합물 또는 조합과 가교결합된 하나 이상의 상이한 단백질 잔기, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 단백질 잔기를 포함할 수 있다.

[0087] 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 상이한 분자 잔기, 예를 들면, 하나 이상의 상이한 생체분자 잔기, 하나 이상의 상이한 생체중합체 잔기 및/또는 그의 유도체 또는 조합과 가교결합된 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 상이한 사카라이드-함유 잔기, 예

를 들면, 2개 이상의 상이한 사카라이드-함유 잔기, 예를 들어, 하나 이상의 상이한 올리고사카라이드 잔기 및/또는 하나 이상의 상이한 폴리사카라이드 잔기, 예컨대 2개 이상의 상이한 올리고사카라이드 잔기 및/또는 2개 이상의 상이한 폴리사카라이드 잔기, 또는 그의 혼합물 또는 조합과 가교결합된 단백질 잔기를 포함할 수 있다.

[0088] 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 폴리사카라이드 잔기 당 하나 이상의 단백질 잔기, 예를 들면, 폴리사카라이드 잔기 당 2개 이상의 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 단백질 잔기 당 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기, 예를 들어, 단백질 잔기 당 2개 이상의 폴리사카라이드 잔기를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 약 0.1 내지 1.5% 폴리사카라이드 잔기 대 약 2.5 내지 10% 단백질 잔기의 비를 포함할 수 있다. 비의 다른 예는 0.75 내지 1.5% 폴리사카라이드 잔기 대 3 내지 6% 단백질 잔기; 0.1 내지 1.5% 폴리사카라이드 잔기 대 0.1 내지 6% 단백질 잔기; 0.25 내지 0.85% 폴리사카라이드 잔기 대 1 내지 4% 단백질 잔기; 0.1 내지 3% 폴리사카라이드 잔기 대 0.5 내지 15% 단백질 잔기; 3% 이하의 폴리사카라이드 잔기 대 0.5% 이상의 단백질 잔기; 0.25% 이상의 폴리사카라이드 잔기 대 15% 이하의 단백질 잔기; 0.01% 이상의 폴리사카라이드 잔기 대 12% 이하의 단백질 잔기; 또는 1% 이상의 폴리사카라이드 잔기 대 8% 이하의 단백질 잔기이다. 다른 비도 사용될 수 있으며, 가교결합 단백질을 유도하기 위해 사용되는 단백질 분자의 목적하는 성질 및 구조에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, 보다 유연한 제형에서, 사용되는 폴리사카라이드 분자의 양은 감소될 수 있다. 예를 들면, 특정 제형에서, 보다 장쇄 사카라이드를 사용하는 것은 보다 소량의 폴리사카라이드 분자의 사용을 가능하게 할 수 있으며 여전히 허용가능한 제형을 생성할 수 있다.

[0089] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 생체적합성 및/또는 생체이용성 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 생체적합성 및/또는 생체이용성 물질일 수 있고/있거나 이로부터 유도될 수 있거나; 가교결합 단백질 매트릭스는 생체적합성 및/또는 생체이용성일 수 있다.

[0090] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 수용성 가교결합체, 예를 들면, 수용성 사카라이드-함유 가교결합체 또는 수용성 변형 사카라이드-함유 가교결합체, 예를 들어, 수용성 올리고사카라이드 가교결합체 또는 수용성 변형-올리고사카라이드 가교결합체를 포함할 수 있고/있거나 이로부터 유도될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 또한 수용성 폴리사카라이드-함유 가교결합체 또는 수용성 변형 폴리사카라이드-함유 가교결합체를 포함할 수 있고/있거나 이로부터 유도될 수 있다.

[0091] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 생체분자-단백질 접합체 또는 생체중합체-단백질 접합체 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 사카라이드-함유 분자-단백질 접합체, 예를 들어, 사카라이드-단백질 접합체, 다이사카라이드-단백질 접합체, 트라이사카라이드-단백질 접합체, 올리고사카라이드-단백질 접합체, 폴리사카라이드-단백질 접합체 및/또는 그의 조합을 포함할 수 있다.

[0092] **사카라이드-함유 분자**

[0093] 특정 태양에서, 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 올리고사카라이드는 하나 이상의 다이사카라이드, 하나 이상의 트라이사카라이드, 2개 이상의 다이사카라이드, 2개 이상의 트라이사카라이드, 3개 이상의 다이사카라이드, 3개 이상의 트라이사카라이드 및/또는 그의 조합 또는 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 올리고사카라이드는 약 3, 4, 5, 6, 8 또는 11개 이상의 사카라이드 잔기 또는 단위를 포함할 수 있다. 특정 제형에서, 가교결합 단백질 매트릭스를 유도하기 위해 사용되는 올리고사카라이드는 또한 약 3 내지 약 15개, 3 내지 약 14개, 약 3 내지 약 12개, 약 3 내지 약 11개, 약 3 내지 약 10개, 약 4 내지 약 15개, 약 5 내지 약 15개, 또는 약 5 내지 약 10개의 사카라이드 잔기 또는 단위를 포함할 수 있다.

[0094] 특정 태양에서, 폴리사카라이드는 하나 이상의 다이사카라이드 단위 또는 잔기, 하나 이상의 트라이사카라이드 단위 또는 잔기, 하나 이상의 올리고사카라이드; 2개 이상의 다이사카라이드 단위 또는 잔기, 2개 이상의 트라이사카라이드 단위 또는 잔기, 2개 이상의 올리고사카라이드; 3개 이상의 다이사카라이드 단위 또는 잔기, 3개 이상의 트라이사카라이드 단위 또는 잔기, 3개 이상의 올리고사카라이드, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리사카라이드는 약 25, 50, 100, 200, 500, 800, 1,000, 1,200, 1,500, 2,000, 5,000, 10,000, 또는 20,000개 이상의 사카라이드 단위 또는 잔기를 포함할 수 있다. 특정 제형에서, 가교결합 단백질을 유도하기 위해 사용되는 폴리사카라이드는 또한 약 25 내지 약 5000개, 500 내지 약 2000개, 약 3000 내지 약 5000개, 약 150 내지 약 250개, 약 175 내지 약 225개, 약 100 내지 약 175개, 약 150 내지 약 200개 또는 약 100 내지 약 200개 사카라이드 잔기 또는 단위를 포함할 수 있다.

[0095] 특정 태양에서, HA는 약 100 내지 300개 사카라이드 단위 또는 잔기, 예를 들면, 약 200개 사카라이드 단위 또는

는 잔기의 범위로 사용될 수 있다. 다른 태양에서, HA는 200 내지 20,000개 사카라이드 단위 또는 잔기의 범위로 사용될 수 있다. 다른 태양에서, HA는 약 500 내지 2000개 사카라이드 단위 또는 잔기의 범위로 사용될 수 있다. 다른 태양에서, HA는 3000 내지 5000개 사카라이드 단위 또는 잔기의 범위로 사용될 수 있다. 다른 제형에서, 사용되는 HA는 약 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 500, 800, 1,000, 1,200, 1,500, 2,000, 5,000, 10,000 또는 20,000개 이상의 사카라이드 단위 또는 잔기를 포함할 수 있다. 특정 제형에서, 가교결합 단백질 매트릭스를 유도하기 위해 사용되는 HA는 또한 약 25 내지 약 5000, 500 내지 약 2000, 약 3000 내지 약 5000, 약 150 내지 약 250, 약 175 내지 약 225, 약 100 내지 약 175, 약 150 내지 약 200, 또는 약 100 내지 약 200개의 사카라이드 잔기 또는 단위를 포함할 수 있다.

[0096] 사카라이드-함유 잔기, 예를 들어, 폴리사카라이드는 저분자량, 중간분자량 또는 고분자량일 수 있다. 예를 들면, 조성물 또는 제형은 저분자량, 중간분자량 또는 고분자량 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드 가교결합체로부터 유도될 수 있다.

[0097] 저분자량 사카라이드-함유 분자는 약 25,000 내지 약 300,000 달톤, 예를 들면, 약 50,000 내지 약 275,000 달톤, 약 100,000 내지 약 250,000 달톤, 또는 약 50,000 내지 약 300,000 달톤의 분자량을 포함할 수 있다. 중간 분자량 사카라이드-함유 분자는 약 300,000 내지 약 900,000 달톤, 약 600,000 내지 약 800,000 달톤, 약 500,000 내지 약 900,000 달톤, 또는 약 500,000 내지 약 750,000 달톤의 분자량을 포함할 수 있다. 고분자량 사카라이드-함유 분자는 약 900,000 내지 약 4,000,000 달톤, 약 1,000,000 내지 약 3,500,000 달톤, 약 900,000 내지 약 3,500,000 달톤, 약 1,500,000 내지 약 3,700,000 달톤, 또는 약 1,250,000 내지 약 3,000,000 달톤의 분자량을 포함할 수 있다. 본원에 나타낸 범위를 조합한 분자량 범위를 갖는 폴리사카라이드가 사용될 수 있음도 또한 고려된다. 예를 들면, 약 25,000 내지 약 750,000 달톤, 약 50,000 내지 약 900,000 달톤, 약 100,000 내지 약 750,000 달톤, 또는 약 250,000 내지 약 500,000 달톤의 분자량 범위를 갖는 폴리사카라이드를 사용할 수 있다. 다른 범위도 또한 선택할 수 있다.

[0098] 특정 태양에서, 저분자량 내지 중간 분자량 폴리사카라이드를 사용하는 능력은 본 접근방법을 제조/가공 관점에서 더 용이하게 만든다. 예를 들면, 보다 저분자량 HA의 사용은 HA가 변형되고, 침전되고 세척되게 하며, HA는 가교결합체로 용이하게 사용될 수 있는 상당히 낮은 점성 용액으로 유지된다. 보다 고분자량 폴리사카라이드를 사용하는 것은 또 다른 취급 문제(예를 들면, 점성 용액, 혼합에 따른 문제, 통기 등)를 제공할 수 있지만, 특정 태양에서, 목적하는 결과를 달성하기 위해 광범위한 분자량을 사용할 수 있다. 보다 고분자량 폴리사카라이드를 취급하기 위한 한가지 접근방법은 보다 묽은 용액을 사용하는 것일 수 있다. 예를 들면, 1,500,000 달톤 HA를 사용하되 점도를 낮게 유지하기 위해 0.1% 용액을 사용한다.

[0099] 가교결합 단백질 매트릭스는 사카라이드-함유 잔기, 예를 들면, 폴리사카라이드 잔기를 약 0.1 내지 약 15%의 농도로 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 사카라이드-함유 잔기를 약 0.1 내지 약 10%, 약 0.2 내지 약 5%, 약 0.25 내지 약 5%, 약 0.1 내지 약 3.5%, 약 0.20 내지 약 3%, 약 0.25 내지 약 3%, 약 0.5 내지 약 4%, 약 0.5 내지 약 3%, 약 0.75 내지 약 3.5%, 약 1 내지 약 3%, 약 1.5 내지 약 3.5% 또는 약 0.2 내지 약 4%의 농도로 포함할 수 있다.

[0100] 사카라이드-함유 분자, 예를 들어, 폴리사카라이드는 약 500 달톤 이상의 분자량, 예를 들면, 약 5,000, 10,000, 25,000, 50,000, 100,000, 150,000, 200,000, 250,000, 300,000, 500,000, 750,000 또는 1,500,000 달톤 이상의 분자량을 포함할 수 있다.

[0101] 특정 태양에서, 생체분자 또는 생체중합체와 같은 분자는 하나 이상의 결합가능한 잔기, 예를 들면, 하나 이상의 가교결합가능한 잔기, 예를 들어, 카복실 기, 하이드록실 기, 아민, 티올, 알콜, 알켄, 알킨, 시아노 기 또는 아지드, 및/또는 그의 변형, 유도체 또는 조합을 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 생체분자 또는 생체중합체, 예를 들어, 단백질 또는 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드는 하나 이상의 가교결합가능한 잔기, 예를 들면, 카복실 기, 하이드록실 기, 아민, 티올, 알콜, 알켄, 알킨, 시아노 기 또는 아지드, 및/또는 그의 변형, 유도체 또는 조합을 포함할 수 있다.

[0102] 특정 태양에서, 결합가능한 잔기, 예를 들어, 가교결합가능한 잔기는 활성화될 수 있는 잔기, 예를 들면, 카복실 기 잔기 또는 하이드록실 기 잔기이므로, 상기 결합가능한 잔기의 활성화는 동일 및/또는 제 2 분자 상의 상보성 반응기와의 반응을 허용하고/하거나 촉진시켜 동일 및/또는 제 2 분자와 결합, 예를 들면, 공유 결합을 형성, 예를 들면, 제 2 생체분자 또는 생체중합체와 같은 제 2 분자에 공유결합을 형성한다.

[0103] 특정 태양에서, 생체분자 또는 생체중합체와 같은 분자, 예를 들면, 사카라이드-함유 분자 또는 단백질은 스페

이서 기를 포함할 수 있으므로, 스페이서 기는 동일 및/또는 제 2 분자, 예를 들면, 제 2 생체분자 또는 생체중합체에 결합될 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 스페이서 기는 적어도 하나 이상의 결합가능한 잔기를 포함할 수 있으므로 스페이서 기가 동일 및/또는 제 2 분자에 결합될 수 있게 한다. 특정 태양에서, 예를 들면, 사카라이드-함유 분자 또는 단백질과 같은 분자는 적어도 하나 이상의 결합가능한 잔기를 포함하는 스페이서 기를 포함할 수 있으므로, 상기 분자가, 스페이서 기 상의 결합가능한 잔기에 의해 형성된 결합에 의해, 제 2 분자, 예를 들면, 제 2 생체분자 또는 생체중합체, 예를 들어, 단백질 또는 사카라이드-함유 분자에 가교결합과 같은 결합을 형성할 수 있게 한다. 예를 들면, 특정 태양에서, 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드 또는 변형-폴리사카라이드는 하나 이상의 결합가능한 잔기, 예를 들면, 카복실 기 또는 활성화되거나 변형된 카복실 기를 포함하는 스페이서 기를 포함할 수 있으므로, 폴리사카라이드가 올리고사카라이드, 폴리사카라이드 또는 변형-폴리사카라이드 상의 스페이서 기 상의 결합가능한 잔기에 의해 형성된 아미드 결합에 의해, 제 2 분자, 예를 들면, 단백질, 예를 들어, 아민을 포함하는 단백질에 가교결합과 같은 결합을 형성할 수 있게 한다.

[0104] 특정 태양에서, 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드는 음으로 하전된 작용기 또는 양으로 하전된 작용기를 포함할 수 있다. 예를 들면, 음으로 하전된 작용기 또는 양으로 하전된 작용기를 포함하는 올리고사카라이드; 또는 음으로 하전된 작용기 또는 양으로 하전된 작용기를 포함하는 폴리사카라이드; 및/또는 그의 유도체 또는 조합을 들 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 사카라이드-함유 분자, 예를 들어, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드는 이두론산, 글루쿠론산 또는 N-아세틸글루코사민 잔기를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들면, 사카라이드-함유 분자는, 예를 들면, 카복실 기를 포함하는 올리고사카라이드 또는 카복실 기를 포함하는 폴리사카라이드, 예를 들어, 폴리-카복실산 함유-폴리사카라이드, 예로, 히알루론산 또는 카복시메틸 셀룰로스; 아민 기를 포함하는 올리고사카라이드 또는 아민 기를 포함하는 폴리사카라이드; 및/또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

[0105] **구조적 특징 - 선형 또는 분지**

[0106] 특정 태양에서, 사카라이드-함유 분자는 선형 올리고사카라이드, 분지된 올리고사카라이드, 선형 폴리사카라이드 및/또는 분지된 폴리사카라이드를 포함할 수 있다. 사카라이드-함유 분자는 올리고사카라이드 및/또는 폴리사카라이드, 예를 들어, 히알루론산("HA"); 셀룰로스 유도체, 예를 들면, 카복시 셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스("HPC"), 하이드록시프로필 메틸셀룰로스("HPMC"), 하이드록시프로필셀룰로스 카복시메틸 아밀로스("CMA"); 잔탄 검; 구아 검; α-글루칸; β-글루칸; β-1,4-글루칸; β-1,3-글루칸; 알기네이트; 카복시메틸 텍스트란; 글리코사미노글리칸 유도체; 콘드로이틴-6-설페이트; 더마틴 설페이트; 헤파린; 헤파린 설페이트; 폴리락트산("PLA"); 또는 생체물질, 예를 들면, 폴리글리콜산("PGA"); 폴리(락트-코-글리콜)산("PLGA"); 트라이칼슘 포스페이트("TCP"); 1-하이드록시아파타이트("PAH"); 및/또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 유도체 또는 조합을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 사카라이드-함유 분자는 선형 및 분지된 올리고사카라이드 및/또는 폴리사카라이드를 포함하여, 펙틴 및/또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

[0107] 사카라이드-함유 분자는, 천연 과정, 합성 화학적 변형 및/또는 그의 조합으로부터 제조되고/되거나 이로부터 또는 이에 의해 유도된 사카라이드-함유 분자일 수 있다.

[0108] 예를 들면, 사카라이드-함유 분자는 진핵 세포 또는 원핵 세포, 예를 들어, 진핵 세포 또는 원핵 세포에 의해 일어나는 천연 과정, 또는 그의 조합으로부터 제조되고/되거나 유도된 사카라이드-함유 분자를 포함할 수 있다.

[0109] 예를 들면, 사카라이드-함유 분자는 합성 화학적 변형, 예를 들면, 고체상 합성에 의해 제조되고/되거나 유도된 사카라이드-함유 분자를 포함할 수 있다. 사카라이드-함유 분자는 고체상 폴리사카라이드 합성동안 링커를 혼입시킨다.

[0110] 사카라이드-함유 분자는 실질적인 가용성 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 완전 가용성, 부분 가용성 분자, 예를 들어, 수용액 및/또는 생리 용액에 실질적으로 가용성인 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드를 포함할 수 있다.

[0111] 사카라이드-함유 분자는, 예를 들면, 다중음이온성 사카라이드, 다중양이온성 사카라이드, 생체적합성 사카라이드 분자, 생체이용성 사카라이드, 생체분해성 사카라이드, 생체흡수성 사카라이드, 생체재흡수성 사카라이드, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다.

[0112] **단백질 및 폴리사카라이드**

[0113] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는, 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스중 단백질 잔기 성분의 전자 하전 특성을 보완하는 전자 하전 특성을 갖는 사카라이드-함유 잔기 성분을 포함할 수 있다. 각 성분의 전하-보완 특성은 성분들을 혼합하는 것을 용이하게 하고/하거나 촉진할 수 있다. 각 성분의 전하-보완 특성은 조성물의 전체적인 일반 성질에 부가될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 또한 전자 하전 특성을 갖는 사카라이드-함유 잔기 성분을 보완할 수 있는 약학적으로 및/또는 생리학적으로 허용되는 상대-이온, 또는 단백질 잔기 성분의 전자 하전 특성을 보완할 수 있는 약학적으로 및/또는 생리학적으로 허용되는 상대-이온, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 다중음이온성 사카라이드-함유 잔기 성분, 예를 들면, 양으로 하전된 단백질 잔기에 가교결합된 다중음이온성 폴리사카라이드 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는 다중양이온성 사카라이드-함유 잔기 성분, 예를 들면, 음으로 하전된 단백질 잔기에 가교결합된 다중양이온성 폴리사카라이드 잔기를 포함할 수 있다.

[0114] **단백질 및 폴리사카라이드의 선택**

[0115] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스에 포함된 단백질 성분, 예를 들어, 트로포엘라스틴의 선택은 생성되는 생체물질 산물의 최종 기능적 필요조건을 기준으로 할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스에 포함된 단백질 잔기 성분은 알부민 또는 콜라겐 잔기와 같은 단백질 잔기를 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스에 포함된 단백질 잔기 성분의 선택은 생성된 생체물질 산물의 최종 생체활성 필요조건을 기준으로 할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스에 포함된 단백질 잔기 성분의 선택은 생성된 생체물질 산물 중 단백질 잔기의 조합을 포함하기 위한 요구사항을 기준으로 할 수 있다.

[0116] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 제형에 포함된 단백질 잔기 성분은 제형중에서 달라질 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 제형은 25 내지 50 mg/ml의 단백질 잔기 및 1 내지 30 mg/ml의 폴리사카라이드 가교결합체 잔기를 가질 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 제형에 포함된 단백질 잔기 성분은 1 내지 200 mg/ml, 5 내지 30 mg/ml, 20 내지 100 mg/ml, 50 내지 200 mg/ml, 20 내지 100 mg/ml, 25 내지 80 mg/ml, 30 내지 60 mg/ml, 40 내지 70 mg/ml 또는 25 내지 65 mg/ml일 수 있다. 특정 태양에서, 단백질 잔기 성분의 양의 적합한 범위 및 가교결합 단백질 매트릭스 제형에 포함된 폴리사카라이드 잔기 성분의 양의 적합한 범위는 특정 용도의 필요조건을 기준으로 상이할 수 있다.

[0117] **커플링/접합/가교결합**

[0118] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는, 아민-함유 단백질과 같은 단백질을, 카복실 기, 하이드록실 기, 활성화 카복실 기, 활성화 하이드록실 기, 변형된 카복실 기 또는 변형된 하이드록실 기를 포함하는 사카라이드-함유 분자, 예를 들어, 카복실 기, 하이드록실 기, 활성화 카복실 기, 활성화 하이드록실 기, 변형된 카복실 기 또는 변형된 하이드록실 기를 포함하는 올리고사카라이드, 폴리사카라이드 및/또는 그의 유도체에 결합, 예를 들면, 커플링 및/또는 가교결합시켜 아미드 또는 아민 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는, 단백질, 예를 들어, 아민 잔기 함유 단백질을, 카복실 기, 하이드록실 기, 활성화 카복실 기, 활성화 하이드록실 기, 변형된 카복실 기 또는 변형된 하이드록실 기를 포함하는 올리고사카라이드 및/또는 변형 올리고사카라이드에 커플링 및/또는 가교결합시켜 단백질과 올리고사카라이드 사이에 아미드 또는 아민 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는, 아민 잔기 함유 단백질과 같은 단백질을, 카복실 기, 하이드록실 기, 활성화 카복실 기, 활성화 하이드록실 기, 변형된 카복실 기 또는 변형된 하이드록실 기를 포함하는 폴리사카라이드 및/또는 변형 폴리사카라이드에 커플링 및/또는 가교결합시켜 단백질과 폴리사카라이드 사이에 아미드 또는 아민 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다.

[0119] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스의 제조는, 가교결합 단백질의 단백질 성분과 가교결합 단백질의 제 2 분자, 예를 들면, 생체분자, 생체중합체 또는 스페이서 기, 또는 그의 조합 또는 유도체 사이에 결합 및/또는 가교결합을 형성하기 위해 활성화제 및/또는 커플링제를 사용함으로써, 또는 활성화제 및/또는 커플링제 및 변형제 및/또는 보조 커플링제를 둘 다 사용함으로써 촉진될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 결합 및/또는 가교결합을 형성하기 위해 활성화제 및/또는 커플링제를 사용함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는, 카복실 기 함유 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 예를 들어, 히알루론산 상의 하나 이상의 카복실산 기를 활성화제 및/또는 커플링제로 활성화시켜 활성화-올리고사카라이드 또는 활성화-폴리사카라이드를 생성하고, 활성화-올리고사카라이드 또는 활성화-폴리사카라이드를 단백질, 예를 들어, 아민 잔기 함유 단백질에 커플링 및/또는 가교결합시켜 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드와 단백질 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는, 하이드록실 기 함유 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 예를 들어, 히알루론산 상의 하나 이상의 하이드록실 기를 활성화제 및/또는 커플링

제로 활성화시켜 활성화-올리고사카라이드 또는 활성화-폴리사카라이드를 생성하고, 활성화-올리고사카라이드 또는 활성화-폴리사카라이드를 단백질, 예를 들어, 아민 잔기 함유 단백질에 커플링 및/또는 가교결합시켜 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드와 단백질 사이에 아민 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다.

[0120] **활성화제/커플링제/변형제**

[0121] 특정 태양에서, 때때로 커플링제로 불리는 활성화제는 다이이미드, 예를 들면, 카보다이이미드 또는 수용성 카보다이이미드, 예를 들어, 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드("EDC"), 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드메트요오다이드("ETC"), 1-사이클로헥실-3-(2-모폴리노에틸)-카보다이이미드("CMC"), 및/또는 그의 상응하는 염 또는 혼합물을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 활성화제는 또한, 예를 들면, 벤조트리아졸-1-일옥시트리스-(다이메틸아미노)-포스포늄헥사플루오로포스페이트("Bop-시약"), 0-벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트, 브롬-트리스-(다이메틸아미노)-포스포늄헥사플루오로포스페이트, 및/또는 그의 상응하는 할라이드염 또는 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 때때로 커플링제로 불리는 활성화제는 에폭사이드, 예를 들어, 알릴글리시딜 에터, 또는 할로알켄, 예를 들어, 알킬클로라이드, 및/또는 그의 상응하는 염 또는 혼합물을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다.

[0122] 가교결합 단백질 매트릭스는, 결합 및/또는 가교결합을 형성하기 위해 활성화제 및/또는 커플링제 및 변형제 및/또는 보조 커플링제를 둘 다 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스는, 카복실 기 함유 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 예를 들면, 히알루론산 상의 하나 이상의 카복실산 기를 활성화제 및/또는 커플링제로 활성화시켜 활성화-올리고사카라이드 또는 활성화-폴리사카라이드를 생성하고, 활성화-올리고사카라이드 또는 활성화-폴리사카라이드 상의 하나 이상의 활성화 카복실 기를 변형제 및/또는 보조 커플링제로 변형시켜 변형-올리고사카라이드 또는 변형-폴리사카라이드를 생성하고, 변형-올리고사카라이드 또는 변형-폴리사카라이드를 단백질, 예를 들어, 아민 잔기 함유 단백질에 커플링 및/또는 가교결합시켜 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드와 단백질 사이에 아미드 결합을 생성시킴으로써 제조될 수 있다.

[0123] 특정 태양에서, 때때로 보조 커플링제로 불리는 변형제는, 활성화 카복실 및/또는 하이드록실 잔기, 예를 들어, 폴리사카라이드 상의 활성화 카복실 및/또는 하이드록실 잔기의 존재하에서 활성화 카복실 및/또는 하이드록실 잔기와 반응하여 더 안정하거나 친핵체와 더 잘 반응할 수 있는 변형 종을 생성하는 시약을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 예를 들면, 변형제 또는 보조 커플링제는 N-하이드록시-숙신이미드("NHS"), N-하이드록시술포숙신이미드("sulF-NHS"), 1-하이드록시-벤조트리아졸 하이드레이트("HOBt"), 1-하이드록시벤조트리아졸 모노하이드레이트, 3,4-다이하이드로-3-하이드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아졸(HOObt), 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸(HAT), 4-니트로페놀, 2-니트로페놀, 4-니트로티오펜올, 2-니트로티오펜올, 펜타클로로페놀, 펜타플루오로페놀, 이미다졸, 테트라졸, 4-다이메틸아미노피리딘, 할라이드 및/또는 다른 관련 화합물들을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다.

[0124] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는, 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 예를 들어, 히알루론산을 활성화제 및/또는 변형제로 활성화 및/또는 변형시키고, 단백질과 결합시켜 사카라이드-함유 분자와 단백질 사이에 하나 이상의 결합 및/또는 가교결합, 예를 들면, 하나 이상의 아미드 또는 아민 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다.

[0125] 가교결합 단백질 매트릭스를 제조하는 방법은 활성화제 및/또는 변형제를 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 히알루론산과 혼합 및/또는 결합시켜 활성화 및/또는 변형된 사카라이드-함유 분자를 생성하고, 상기 활성화 및/또는 변형 사카라이드-함유 분자를 단백질과 혼합 및/또는 결합시켜 사카라이드-함유 분자와 단백질 사이에 하나 이상의 결합 및/또는 가교결합, 예를 들면, 하나 이상의 아미드 또는 아민 결합을 형성하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 히알루론산은, 활성화제, 예를 들면, EDC 또는 알릴글리시딜 에터, 및/또는 변형제, 예를 들면, NHS, HOBt 또는 브롬으로 활성화 및/또는 변형될 수 있다. 예를 들면, 활성화 및/또는 변형 사카라이드-함유 분자는, 활성화 및/또는 변형 에스터, 예를 들면, 활성화 및/또는 변형 트리아졸 에스터, 또는 활성화 및/또는 변형 N-하이드록시숙신이미드 에스터, 활성화 및/또는 변형 에폭사이드, 또는 활성화 및/또는 변형 할로히드린으로서 활성화 및/또는 변형된 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함할 수 있다. 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는 사카라이드-함유 분자, 예를 들면, 히알루론산은, EDC 또는 알릴글리시딜 에터와 같은 활성화제 및/또는 NHS, HOBt 또는 브롬과 같은 변형제로 활성화 및/또는 변형될 수 있으며, 하나 이상의 아민 잔기를 갖는 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 아민-함

유 측쇄를 포함하는 단백질과 결합, 혼합 및/또는 반응하여 사카라이드-함유 분자와 하나 이상의 아민 잔기 함유 화합물 사이에 하나 이상의 결합 및/또는 가교결합, 예를 들면, 아마이드 또는 아민 결합을 형성할 수 있다.

[0126] 특정 태양에서, 하나 이상의 아민 잔기를 포함하는 분자, 예를 들면, 하나 이상의 아민 잔기를 포함하는 단백질, 펩티드 또는 스페이서 기는 사카라이드-함유 분자 상의 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기에 커플링될 수 있다. 예를 들면, 수성 환경에서 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 예를 들어, 활성화제 및/또는 변형제로 활성화 및/또는 변형된 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드에 커플링될 수 있다.

[0127] 특정 태양에서, 폴리사카라이드를 변형시키기 위해 사용되는 방법은 가교결합되는 단백질 및/또는 가교결합체로 사용되는 폴리사카라이드에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 폴리사카라이드를 변형시키기 위해 사용되는 방법은 퍼요오데이트 산화의 사용을 포함할 수 있다. 폴리사카라이드를 변형시키기 위해 사용되는 방법은 카보다이이미드, 예를 들면, EDC와 같은 활성화제의 사용을 포함할 수 있다. 폴리사카라이드를 변형시키기 위해 사용되는 방법은 활성화제, 예를 들면, 에폭사이드, 예를 들어, 알릴글리시딜 에터의 사용을 포함할 수 있다. 폴리사카라이드를 변형시키기 위해 사용되는 방법은 또한 변형제, 예를 들면, N-하이드록시숙신이미드(NHS) 또는 할라이드, 예를 들어, 브롬의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들면, 히알루론산 및/또는 카복시메틸 셀룰로스는 활성화제, 예를 들면, 카보다이이미드에 의해 활성화될 수 있으며, 변형제, 예를 들면, N-하이드록시숙신이미드에 의해 더 변형될 수 있다. 예를 들면, 히알루론산 및/또는 카복시메틸 셀룰로스는 에폭사이드와 같은 활성화제에 의해 활성화될 수 있고, 브롬과 같은 변형제에 의해 더 변형될 수 있다.

[0128] **이작용성 분자 시약**

[0129] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 단백질을 다작용성 시약, 예를 들면, 2개 이상의 반응성 잔기를 포함하는 사카라이드-함유 분자 또는 2개 이상의 반응성 잔기를 포함하는 스페이서 기와 반응시켜 2개 이상의 결합 또는 가교결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 다작용성 시약은 2개 이상의 같거나 다른 반응성 잔기, 예를 들면, 카복실 및/또는 하이드록실 기, 활성화 카복실 및/또는 하이드록실 기, 변형된 카복실 및/또는 하이드록실 기, 및/또는 그의 조합 또는 유도체의 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 다작용성 시약 상의 반응성 잔기 각각은 같거나 또다른 분자 상의 상보성 반응기와 반응할 수 있다. 예를 들면, 다작용성 시약 상의 하나 이상의 반응성 잔기는 탈보호, 예를 들면, 같거나 또다른 분자 상의 상보성 반응기와 반응할 수 있는 보호기의 제거를 필요로 할 수 있다.

[0130] **스페이서 기**

[0131] 스페이서 기는 하나 이상의 개별 성분들을 결합시키는 잔기를 포함할 수 있다. 스페이서 기는, 예를 들면, 공유 결합에 의해 단백질에 연결되거나, 공유 결합에 의해 폴리사카라이드에 연결되거나, 공유 결합에 의해 단백질 및 폴리사카라이드에 연결되고/되거나 그의 조합인 하나 이상의 분자일 수 있다. 스페이서 기는, 예를 들면, 글리콜 잔기, 에틸렌옥사이드 잔기, 반복 $-(CH_2-CH_2-O)-$ 잔기로부터 생성된 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리에틸렌 옥사이드(PEO), 폴리아민, 또는 폴리올을 포함할 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 스페이서 기는 열분해 또는 가수분해 또는 둘 다에 안정할 수 있다. 스페이서는 생체적합성, 생체 이용성, 수성 및/또는 생리학적 매질중에 가용성 및/또는 실질적으로 가용성이거나 이의 조합일 수 있다. 생체 분자 또는 생체중합체는 하나 이상의 스페이서 기 잔기, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리에틸렌 옥사이드 기(PEO)를 포함할 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 하나 이상의 스페이서 기 잔기, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리에틸렌 옥사이드 기(PEO)를 포함할 수 있다. 사카라이드-함유 분자는 하나 이상의 스페이서 기 잔기, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리에틸렌 옥사이드 기(PEO)를 포함할 수 있다. 사카라이드-함유 분자는, 반응기, 예를 들면, 단백질 또는 변형 단백질의 일부일 수 있는 상보성 반응기와 반응할 때 공유 결합을 형성할 수 있는 반응기를 포함하는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 단백질 또는 변형 단백질은, 반응기, 예를 들면, 사카라이드-함유 분자의 일부일 수 있는 상보성 반응기와 반응할 때 공유 결합을 형성할 수 있는 반응기를 포함하는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있다.

[0132] **폴리사카라이드의 변형 정도**

[0133] 특정 태양에서, 하나 이상의 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는 사카라이드-함유 가교결합체, 예를 들면, 히알루론산은 일련의 활성화 및/또는 변형된 카복실 및/또는 하이드록실 기, 및 일련의 활성화되지 않고/않거나 변형되지 않은 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하도록 활성화 및/또는 변형될 수 있다. 예를 들면, 활성화 및/또는 변형 사카라이드-함유 가교결합체는, 약 2% 이상의 활성화 및/또는 변형된 카복실 및/또

는 하이드록실 기, 예를 들면, 약 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30% 또는 35% 이상의 활성화 및/또는 변형된 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하도록 활성화 및/또는 변형될 수 있다. 특정 용도에서, 사카라이드-함유 가교결합제는 실질적으로 또는 완전히 활성화 및/또는 변형된 카복실 및/또는 하이드록실 기를 함유할 수 있다. 특정 태양에서, 활성화 및/또는 변형 사카라이드-함유 가교결합제는 약 0.5 내지 약 40%, 약 1 내지 약 30%, 약 1 내지 약 25%, 약 3 내지 약 30%, 또는 약 5 내지 약 25%의 활성화 및/또는 변형된 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하도록 활성화 및/또는 변형될 수 있다.

[0134] 특정 태양에서, 사카라이드-함유 가교결합제 중의 활성화 및/또는 변형 기의 수준의 변화는 생체분자와 가교결합되는 사카라이드-함유 가교결합제의 능력을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 예를 들면, 사카라이드-함유 가교결합제 중의 활성화 및/또는 변형 기의 수준은 사카라이드-함유 가교결합제 및 생체분자 또는 생체중합체 사이에 하나 이상의 결합의 형성을 야기할 수 있다. 가교결합 단백질을 제조하기 위해 사용된 활성화 및/또는 변형 기를 포함하는 사카라이드-함유 가교결합제의 수준의 변화는, 생체분자 또는 생체중합체와 반응, 예를 들면, 단백질과 결합 및/또는 가교결합할 수 있는 활성화 및/또는 변형 기의 수를 제어 또는 실질적으로 제어할 수 있으며, 단백질을 안정화 또는 실질적으로 안정화시킬 수 있다.

[0135] **압출**

[0136] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 바늘을 통해 압출될 수 있다. 예를 들면, 미세 게이지 바늘을 통해 압출될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 충분한 응집성을 유지할 수 있다. 예를 들면, 물질의 긴 스트링이 물질 파괴없이 바늘로부터 압출될 수 있도록 바늘 압출후에도 충분한 응집성을 유지할 수 있다. 예를 들면, 적어도 약 15 cm의 물질 스트링이 물질 파괴없이 바늘로부터 압출될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스는 유연성 매트릭스 구조를 포함할 수 있다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스의 유연성 매트릭스 구조는 미세 바늘을 통해 분출되기에 충분한 유연성을 유지하는 안정된 생체물질의 생성을 촉진할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 제형은 바늘을 통해 압출, 예를 들면, 추가의 처리가 필요없이 미세 게이지 바늘을 통해 압출될 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 제형은 물질의 긴 스트링, 예를 들면, 약 15 cm 이상의 물질 스트링이 물질 파괴없이 바늘로부터 압출될 수 있도록 바늘 압출후에도 충분한 응집성을 유지할 수 있다. 특정 태양에서, 제형은 유연성 매트릭스 구조를 포함하는 가교결합 단백질 매트릭스를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 태양에서, 제형중 가교결합 단백질 매트릭스의 유연성 매트릭스 구조는 안정된 생체물질, 예를 들면, 유연성, 예를 들어, 실질적이고/이거나 충분한 유연성을 유지하는 안정된 생체물질의 생성을 촉진할 수 있으며, 제형 및/또는 생체물질이 바늘, 예를 들어, 미세 게이지 바늘을 통해 분출되게 할 수 있다.

[0137] **제조 방법**

[0138] 특정 태양에서, 반응중 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1 내지 약 5%, 예를 들면, 약 0.25 내지 약 3%, 약 0.5 내지 약 3% 또는 약 0.25 내지 3.5%일 수 있다.

[0139] 특정 태양에서, 시약 화학량론은 선택된 화학 및 폴리사카라이드에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, HA:EDC:NHS의 경우, 비는 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3, 1:0.5:2, 1:0.5:3일 수 있다. NHS에 있어서, 1:1:1 비가 가용성 폴리사카라이드 가교결합제 중에 NHS 혼입의 관점에서 우수한 결과를 제공하는 것으로 밝혀졌다.

[0140] 특정 태양에서, 폴리사카라이드 대 활성화제의 몰비는 적어도 1:1 내지 적어도 약 1:4일 수 있다. 특정 태양에서, 활성화제 대 폴리사카라이드의 카복실산 단위의 몰비는 약 2 내지 약 200%, 예를 들면, 약 5 내지 약 100%일 수 있다. 특정 태양에서, 변형제 대 활성화제의 몰비는 약 1:1 내지 약 3:1, 예를 들면, 약 1.5:1 내지 약 2.5:1, 예를 들면, 약 2:1일 수 있다.

[0141] 특정 태양에서, 폴리사카라이드 가교결합제 반응을 수행하기 위한 pH는 적어도 4, 5, 6, 7, 8.0 또는 8.5일 수 있다. 특정 태양에서, 폴리사카라이드 가교결합제 반응을 수행하기 위한 pH는 약 5 내지 약 15, 약 6.5 내지 약 9, 약 7 내지 약 8.6일 수 있다. 다른 pH도 또한 사용될 수 있다.

[0142] 특정 태양에서, 활성화, 커플링 및/또는 가교결합 반응의 온도 범위는 약 15 내지 약 30 °C, 20 내지 약 25 °C의 온도, 또는 실온에서 수행될 수 있다.

[0143] 특정 태양에서, 유도체화 폴리사카라이드를 정제 및/또는 단리하는 방법은 확실하고, 단순하고, 고수율이거나, 이들의 조합일 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은 출발 폴리사카라이드에 대해 40% 이상의 단리된 유도체화 폴리사카라이드를 제공할 수 있다. 다른 방법에서, 수율은 출발 폴리사카라이드 또는 변형 폴리사카라이드에 대해 적어도 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 단리된 유도체화 폴리사카라이드일 수 있

다.

[0144] **치료적 용도**

[0145] 본원에 개시된 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질, 제형, 사용 방법, 시스템 및/또는 키트는, 의학 또는 수의학에서, 예를 들면, 수술에서 사용되는 것을 포함하여(이로 한정되지는 않는다), 다양한 치료 환경에서 사용될 수 있다. 예를 들면, 이들은 복원 수술, 미용 수술, 미용, 조직 벌크화, 예를 들면, 실금 또는 피부 대체 제품에서, 피부과, 예를 들면, 피부과 수술, 눈 수술, 류마티스내과, 약리학 또는 화장품 분야에서 치료적으로 사용될 수 있다. 다른 치료적 용도는 일반 외과에서 전색 출혈(stemming hemorrhage), 재건, 신경- 및 성형 외과에서 신경 및 혈관 재건, 및 정형외과에서 피부, 혈관 또는 연골 이식물 또는 이식편 고정, 예를 들면, 무릎 골관절염(염증성 무릎) 치료, 혈관 및 성형 수술을 포함할 수 있다. 특정 태양은 세포 또는 생체활성 분자, 예를 들면, 병소 복원을 자극하기 위한 성장 인자의 전달을 위한 비히클로서 유용할 수 있으며; 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형과 함께 성장 인자의 국소 전달은, 많은 상황에서, 예를 들면, 뼈 생성을 촉진하고, 정형외과 절차에서 연골 복원을 자극하고, 만성 궤양과 같은 병리학적 상처 질환을 치료하는데 있어서 상처 치료 및 조직 재생을 촉진할 수 있고/있거나, 배양증 자가 세포의 증식을 통해 인공 조직을 생성하기 위한 인공뼈대(scaffold)로서 작용할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형의 주사가 가능한 성질은 이들을 성형 수술에서 조직 증대에, 예를 들면, 피부 주름을 충전하거나 입술 재건을 위한 불활성 생체적합성 충전재로서 적합하게 만들 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 체강 또는 결합부의 보충에 유용할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 미용 의료, 정형외과 치료, 수술중, 예를 들어, 눈 수술중 유출된 용적 복원, 및/또는 건강하거나 손상된 조직, 예를 들어, 피부 상에 국소 적용, 예를 들면, 미용술 및/또는 피부과에서의 국소 적용에 유용할 수 있다. 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 안면 주름, 가는 주름을 충전하는데, "노화" 피부, 흉터가 있는 조직 및/또는 피부 함몰, 예를 들면, 지방이상증의 치료에 유용할 수 있다.

[0146] 특정 태양은 하나 이상의 안정화된 단백질, 예를 들면, 하나 이상의 생체활성 단백질을 전달하기 위해 사용되는 단백질, 예를 들면, 생체활성 단백질을 안정화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0147] 특정 태양은 전체에 분산되는 약학적 활성 물질을 포함할 수 있으며, 약물 전달 시스템으로 유용할 수 있다. 특정 태양은, 예를 들면, 단백질, 성장 인자, 효소, 약물, 생체중합체, 생물학적으로 적합한 합성 중합체, 및/또는 그의 조합, 유도체 또는 변형을 포함할 수 있다.

[0148] **특성: 안정성**

[0149] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스는 다음을 포함하나 이로 한정되지는 않는 하기 성질들중 하나 이상을 포함할 수 있다: 주사가 가능하고, 생체적합하고, 실질적으로 생체적합하고, 안정하며, 실질적으로 안정하고, 생체 활성을 유지하고, 실질적으로 생체활성을 유지하고, 생체활성 구조를 유지하고, 탄성 또는 실질적인 탄성, 탄성 모듈러스, 점성 모듈러스를 제공하고, 구조적 견고성 또는 실질적인 견고성, 열에 대한 내성 또는 실질적 내성, 열분해에 대한 내성 또는 실질적 내성, 생분해에 대한 내성 또는 실질적 내성을 제공하고, 생분해될 수 있고, 이물체 반응 또는 현저한 이물체 반응(즉, 자가 인식)을 유도하지 않고, 약 25% 이상의 순도 수준을 가지며, 압출가능하고, 바늘을 통해 압출가능하고, 미세 게이지 니들을 통해 압출가능하다.

[0150] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 다음을 포함하나 이로 한정되지는 않는 하기 성질들중 하나 이상을 갖는 사카라이드-함유 분자를 포함할 수 있다: 실질적인 용해도, 수 용해도, 수용액 및/또는 수성 완충액 중에서의 실질적인 가용성, 생리학적 용해도, 실질적인 생리학적 용해도, 주사가 가능하고, 생체적합하고, 실질적으로 생체적합하고, 안정하고, 실질적으로 안정하고, 생체활성을 유지하고, 실질적으로 생체활성을 유지하고, 생체활성 구조를 유지하고, 생분해에 대해 내성 또는 실질적 내성이고, 생분해될 수 있고, 이물체 반응 또는 현저한 이물체 반응(즉, 자가 인식)을 유도하지 않거나, 약 25% 이상의 순도 수준을 갖는다.

[0151] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 다음을 포함하나 이로 한정되지는 않는 하기 성질들중 하나 이상을 가질 수 있고/있거나 포함할 수 있다: 주사가 가능하고, 생체적합하고, 실질적으로 생체적합하고, 안정하며, 실질적으로 안정하고, 생체활성을 유지하고, 실질적으로 생체활성을 유지하고, 생체활성 구조를 유지하고, 탄성 또는 실질적인 탄성, 탄성 모듈러스, 점성 모듈러스를 제공하고, 구조적 견고성 또는 실질적인 견고성, 열에 대한 내성 또는 실질적 내성, 열분해에 대한 내성 또는 실질적 내성, 생분해에 대한 내성 또는 실질적 내성을 제공하고, 생분해될 수 있고, 이물체 반응 또는 현저한 이물체 반응(즉, 자가 인식)을 유도

하지 않고, 약 25% 이상의 순도 수준을 가지며, 압출가능하고, 바늘을 통해 압출가능하거나, 미세 케이지 바늘을 통해 압출가능하다.

- [0152] 특정 태양은 약 500 내지 약 50 Pa, 약 450 내지 약 100 Pa, 약 400 내지 약 125 Pa, 약 400 내지 약 150 Pa 또는 약 385 내지 약 150 Pa의 탄성 모듈러스를 가질 수 있다. 탄성 모듈러스는 사용되는 농도 및 성분들에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, 1% HA 가교결합된 4% 트로포엘라스틴 매트릭스 생성물의 경우, 탄성/저장 모듈러스는 약 80 내지 100 Pa에서의 진동수 범위에 걸쳐 안정하고, 약 5 내지 10 Pa에서 출발하고 증가하는 각 진동수와 함께 점차 증가하는 손실 모듈러스에 의해 물질을 조절한다.
- [0153] 특정 태양은 25G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 실질적으로 응집성이고 실질적으로 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은 25G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 응집성이고 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다.
- [0154] 특정 태양은 27G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 실질적으로 응집성이고 실질적으로 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은 27G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 응집성이고 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다.
- [0155] 특정 태양은 30G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 실질적으로 응집성이고 실질적으로 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은 30G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 응집성이고 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다.
- [0156] 특정 태양은 31G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 실질적으로 응집성이고 실질적으로 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은 31G 바늘을 통해 압출될 때 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 응집성이고 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다.
- [0157] 특정 태양은 미세 케이지 바늘을 통과하는 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은 약 5 내지 약 30 cm, 약 10 내지 약 20 cm, 약 10 내지 약 15 cm, 또는 약 15 내지 약 30 cm의 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은 미세 케이지 바늘을 통과하는 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 실질적으로 응집성이고 실질적으로 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은 미세 케이지 바늘을 통과하는 약 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의, 응집성이고 지지체 없이 응집되는 압출가능한 길이를 가질 수 있다. 특정 태양은, 압출될 때 실질적으로 응집성이고 실질적으로 지지체 없이 응집되는, 약 5 내지 약 30 cm, 약 10 내지 약 20 cm, 약 10 내지 약 15 cm, 또는 약 15 내지 약 30 cm의 압출가능한 길이를 가질 수 있다.
- [0158] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 생성물의 단백질 성분에 의해 안정화될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형의 안정성은 전장 단백질 잔기 성분과 가교결합 잔기 성분, 예를 들면, 폴리사카라이드 잔기 성분의 조합으로부터 비롯될 수 있다. 특정 태양에서, 최종 물질의 성질은 폴리사카라이드 잔기 성분, 예를 들면, 출발 폴리사카라이드 분자 성분의 점도에 의존하지 않을 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 생성물의 가교결합 잔기 성분, 예를 들면, 사카라이드-함유 가교결합 잔기, 예를 들어, 폴리사카라이드 가교결합제 잔기에 의해 안정화될 수 있다.
- [0159] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 생체적합성 가교결합 단백질을 포함한다.
- [0160] 특정 태양에서, 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 주사기내 혼입에 적합할 수 있다.
- [0161] 특정 태양에서, 미세 케이지 바늘을 사용할 수 있다. 예를 들면, 25G, 27G, 29G, 30G 또는 31G 바늘을 사용할 수 있다. 그러나, 특정 태양은 더 큰 케이지의 바늘, 예를 들면, 20 내지 25G, 15 내지 25G, 15 내지 20G, 10 내지 20G, 10 내지 15G 등과 함께 사용될 수 있다. 특정 태양에서, 바늘의 크기는 주사되는 물질, 예를 들면, 주사되는 물질의 유형 및/또는 점도, 물질의 용적의 특정량을 전달하고자 하는 필요, 및/또는 그의 조합 또는 변형에 따라 달라질 수 있다. 특정 태양은, >15 cm 길이의 물질 스트링이 물질 파괴없이 바늘로부터 압출될 수 있도록, 개시된 제형이 바늘 압출후 충분한 응집성을 유지하는 경우 미세 케이지 바늘의 사용을 가능하게 한다. 예를 들면, 특정 태양하에, >15 cm 길이의 물질 스트링이 물질 파괴없이 25G, 27G, 29G 또는 30G 바늘로부터 압

출될 수 있다.

- [0162] 특정 용도의 경우, 예를 들면, 방광 경부와 같은 벌크화 용도의 경우, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23G의 바늘이 사용될 수 있다. 바늘 길이가 더 길고(통상적으로 수 인치) 따라서 바늘을 통과하는 흐름이 더 큰 저항에 적용되는 것과 같은 특정 용도에서는 더 넓은 바늘이 사용될 수도 있다. 특정 용도에서, 주사될 용적도 또한 수 ml 만큼, 예를 들면, 적어도 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml, 3 ml 또는 4 ml 만큼 증가될 수 있다. 특정 용도에서, 보다 작은 용적이 사용될 수 있는 경우(예를 들면, 가는 주름 또는 얇은 피부 보강의 "스레딩(threading)" 또는 충전), 사용되는 용적은, 예를 들면, 2 ml, 1.5 ml, 1.0 ml, 0.75 ml, 0.5 ml 또는 0.1 ml 미만일 수 있다. 전형적으로, 상기 용도들은 더 짧은 좁은 게이지의 바늘, 예를 들면, 길이가 ½ 인치인 29G, 30G 또는 31G를 사용한다.
- [0163] 사용되는 바늘의 게이지 및 바늘의 길이는 특정 용도 및/또는 제형에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 보다 구조 지속성 조직 지지체를 제공하기 위해 사용될 수 있는 더 높은 수준의 유도체화(예를 들면, 가능한 변형된 부위의 20 내지 30%, 1.5% 폴리사카라이드 및 5% 단백질 함량)를 갖는 제형은 전형적으로 짧은 더 넓은 바늘(예를 들면, 27 또는 25G x ½" 또는 1")을 사용하여 적용된다. 또 다른 예는, 전형적으로 31G 바늘과 같이 더 미세한 바늘을 통해 전달되는, 낮은 유도체화(약 5%), 낮은 HA(<1%) 및/또는 단백질(<3%)을 갖는 제형일 것이다.
- [0164] 특정 태양에서, 압출된 물질은 지지체 없이 압출될 수 있다 - 통상적으로 초기 표면으로부터 수직으로 또는 수직으로부터 45° 의 각도에서 압출될 수 있다. 물질의 응집성 가닥(thread)을 생성하는 능력은 상기 물질을, 이 식물의 스레딩이 구조적 지지체를 제공하기 위해 매트릭스 또는 격자내의 피부에서 수행되는 용도에 특히 유리하도록 만들 수 있다.
- [0165] 다른 전달 방법, 예를 들면, 캐놀라, 카테터, 유연성 중합체 카테터 및/또는 바늘없는 주사기도 또한 사용될 수 있다.
- [0166] 특정 태양에서, 본원에 개시된 방법 및/또는 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형의 이점들 중 적어도 하나는 생성된 물질 제형에 포함될 수 있는 단백질의 양이 제한 요소가 아니라는 것이다. 예를 들면, 가교결합 단백질 매트릭스에 포함되는 단백질 잔기 함량은, 화학적 가교결합제, 예를 들면, 글루타르알데하이드와 같이 단백질을 가교결합시키는 다른 방법을 사용하는 경우 바늘 압출에 저항성이 될 수 있는(가교결합 물질은 매우 치밀할 수 있으므로) 양 이상으로 약 35 또는 40 mg/ml를 포함할 수 있다. 단백질 잔기는 분자내로, 분자간에, 및/또는 그의 조합으로 가교결합될 수 있다. 단백질 잔기는 실질적으로 또는 오직 분자간에만 가교결합될 수 있다. 가교결합 단백질 매트릭스 제형은 보다 유연할 수 있고/있거나 고단백질 농도에서 주사가 가능할 수 있다.
- [0167] 본원에 개시된 가교결합 단백질 매트릭스 조성물, 물질 및/또는 제형은 키트 또는 패키지에 사용될 수 있다. 특정 태양에서, 상기 키트 또는 패키지는 가교결합 단백질 매트릭스 조성물로 미리충전된 주사기, 및 적절한 크기의 바늘 또는 바늘 전달 시스템, 예를 들면, 바늘 롤러 볼 유형 시스템, 자동 주사 펜 유형 시스템 또는 메조 테라피(mesotherapy) 주사 총 유형 시스템의 중합물을 포함한다. 상기 패키지 또는 키트는 또한 제공된 조성물을 주사하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 다른 태양에서, 상기 키트 또는 패키지는 하나 이상의 주사기, 하나 이상의 별도의 용기, 예를 들면, 사용될 조성물을 함유하는 병 또는 앰플, 다중-바늘, 및 키트를 사용하는 방법에 관한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0168] **실시예**
- [0169] 하기의 실시예 및 프로토콜은 개시내용의 특정 태양으로서 및 그의 이점을 나타내기 위해 제공된다. 실시예 및 프로토콜은 예시로서 나타내며, 명세서 또는 하기에 나오는 특허청구범위를 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다.
- [0170] EDC 및 NHS를 사용한 히알루론산(HA)의 유도체화 절차:
- [0171] 1. 물에 HA를 1%(아마도 2% 이하)의 최종 농도로 용해시킨다.
- [0172] 2. 유도체화될 HA 1 g 당 1 g의 N-하이드록시숙신이미드(NHS)를 가한다.
- [0173] 3. HA 1 g 당 1 g의 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드(EDC)를 가한다.
- [0174] 4. 반응물을 철저히 교반시켜(약 10 내지 20 분) 완전히 용해시킨다.
- [0175] 5. 20 내지 25 °C에서 60 분간 반응시킨다.

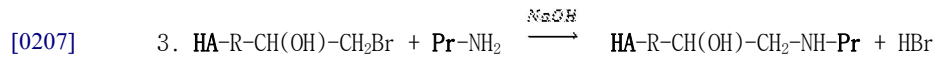
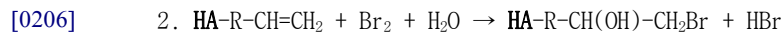
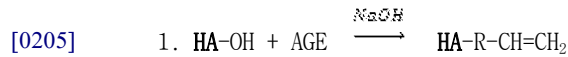
- [0176] 6. NaCl을 1%의 최종 농도로 가한다.
- [0177] 7. 2 부피의 이소프로판올(IPA)을 가하여 유도체화 HA를 침전시킨다.
- [0178] 8. 여과, 약한 원심분리 또는 다른 적당한 방법에 의해, 침전된 유도체화 HA를 회수하고 상등액을 폐기한다.
- [0179] 9. 회수된 유도체화 HA를 약하게 압착하여 과량의 액체를 제거한다.
- [0180] 10. 침전된 유도체화 HA를 60% IPA에서 세척한다.
- [0181] 11. 세척액을 제거하고 폐기시킨다.
- [0182] 12. 회수된 유도체화 HA를 약하게 압착하여 과량의 액체를 제거한다.
- [0183] 13. 회수된 유도체화 HA의 양을 계량한다.
- [0184] 14. 회수된 유도체화 HA를 멸균수에 단계 1에서 용해시킨 HA의 초기량을 기준으로 2.5%의 최종 농도로 용해시킨다.
- [0185] 15. NHS 유도체화의 양을 분석한다(화학적 변형 및 UV 분석 기준).
- [0186] 16. 용해된 유도체화 HA의 농도를 분석한다(화학적 변형 및 UV 분석 또는 건조 중량 기준).
- [0187] 17. 유도체화 HA의 농도를 2%(20 mg/ml)로 조정한다.
- [0188] 18. 유도체화 HA를 멸균 여과시킨다.
- [0189] 주: 단계 7 내지 14는 가능한 한 빨리 수행되어야 한다. 예를 들면, 이들 단계에 총 30 분 미만이 허용되어야 한다(하지만, 침전된 HA의 실제 용해는 더 오래 걸릴 수 있다).
- [0190] 가교결합 단백질 매트릭스의 제조 절차:
- [0191] 1. 단백질을 멸균 PBS에 100 mg/ml의 최종 농도로 용해시키고 필터 멸균시킨다.
- [0192] 2. 단백질 농도를 분석한다(예를 들면, UV 분석 기준).
- [0193] 3. 임의의 기포 도입없이 철저한 혼합/교반하에 각 부피의 20 mg/ml 유도체화 HA를 100 mg/ml 단백질과 혼합한다.
- [0194] 4. 30 내지 60 분간 겔이 되도록 방치한다(20 내지 25 °C).
- [0195] 5. 주사기에 충전시킨다.
- [0196] 다음은 하기 실시예에서 사용된 일반 절차이다.
- [0197] **실시예 1**
- [0198] 카보다이이미드 및 N-하이드록시숙신이미드(NHS)를 사용한 가용성 히알루론산 가교결합제의 제조를 위한 개략도
- [0199] 히알루론산(HA)은 β -D-글루쿠론산-[1,3]- β -D-N-아세틸-글루코사민 다이사카라이드 단위로 이루어진 폴리사카라이드이다. HA의 이상적 구조는 도 1에 나타내었다.
- [0200] 볼 수 있듯이, HA는 다이사카라이드 단위 당 하나의 카복실기를 함유하며, 이것은 본원에 개시된 가교결합 접근방법 중 하나 이상에서 사용될 수 있는 작용기이다. 상기 접근방법에서는, HA의 카복실기와 단백질의 유리 아미노기 사이에 공유 화학 결합이 형성된다. 이것은 HA를 카보다이이미드, 예를 들어, 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드(EDC)와 반응시켜 활성 o-아실이소우레아 에스터를 생성함으로써 수행될 수 있다. 상기 화합물은 1급 아미노기와 같은 친핵체화 반응성이지만, 상기 화합물은 또한 불안정하며 임의의 적당한 반응기의 부재하에 물에서 신속하게 가수분해될 것이다. 그러므로, 활성 o-아실이소우레아 에스터로부터 보다 안정한 중간 활성 에스터를 생성하는 것이 종종 바람직하며, 이것은 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 또는 설폰-N-하이드록시숙신이미드(설폰-NHS)와 같은 화합물을 사용한 축합 반응에 의해 수행될 수 있다. 이것은 NHS 활성화 HA를 생성하며, 이어서 이것을 단백질로부터의 1급 아미노기와 반응시켜 매우 안정한 아마이드 결합을 생성할 수 있다. 상기 반응의 도식들은 도 2에 나타내었다.
- [0201] 상기 접근방법의 주 이점들 중 하나는 HA가 단백질과 혼합되기 전에 유도체화될 수 있다는 것으로, 이것은 최종 제형중 잔류 유도체화 시약의 존재를 제한하거나 배제할 것이다. 과량의 시약을 제거하기 위한 주된 접근방법

은 수산화성 유기 용매, 예를 들어, 이소프로필 알콜(IPA) 또는 에탄올을 사용하여 침전시킨 후, 물/용매 혼합물로 세척하거나 적당한 분획분자량(molecular weight cut-off)을 갖는 반투과성 막을 사용하여 정용여과(diafiltration)시키는 것이다. 일단 유도체화 HA가 정제되면, 이어서 이것을 물 또는 적절한 완충액, 예를 들어, 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 용해시킨 다음, 단백질과 혼합하여 HA의 NHS 활성화 카복실산과 단백질로부터의 아미노 기 사이의 반응을 통해 가교결합 제형을 생성할 수 있다. 상기 접근방법에서, HA는 효과적으로 단백질에 대한 가교결합제가 된다. 생성된 제형의 성질은 단백질이 짧은 가교결합제와 결합되거나 HA가 단백질 부재하에 짧은 가교결합제에 의해 가교결합된 제형과 상이할 것으로 예상된다.

[0202] **실시예 2**

[0203] 헤테로이작용성 시약 알릴글리시딜 에터(AGE)를 사용한 가용성 히알루론산 가교결합제의 제조를 위한 개략도

[0204] 본 접근방법은 단백질과 HA의 가교결합을 위한 2단계 접근방법을 가능하게 하는 헤테로이작용성 시약으로 히알루론산(HA)을 유도체화시키는 것을 기초로 한다. 본 실시예에서 선택된 방법은 알릴글리시딜 에터(AGE)의 사용이었으며, 이때 AGE의 초기 혼입은 옥시란 기가 강알칼리성 조건하에 HA의 하이드록실 기와 반응할 때 일어나, 안정한 에터 결합을 형성한다. 상기와 같이 혼입된 알릴 기는 이어서 브롬과 같은 할라이드와의 반응에 의해 할로히드린으로 전환될 수 있다. 상기 할로히드린은 이어서 1급 아미노 기를 통해 단백질과 반응하여 안정한 2급 아민 결합을 형성할 수 있다. 할로히드린과 1급 아미노 기 사이의 반응은 높은 pH 값에서 더 효과적으로 일어나지만, 일부 반응은 pH 8.5 내지 9 이상에서 일어나기 시작할 것이다.



[0208] 상기에 나타난 반응 도식은 단백질을 HA와 가교결합시키는 것에 대한 것이다. HA = 히알루론산, R = O-CH₂-CH(OH)-CH₂-O-CH₂, AGE = 알릴글리시딜 에터, Pr = 단백질.

[0209] **실시예 3**

[0210] 폴리사카라이드 가교결합제 A의 제조:

[0211] 본 실시예에서는, 5 ml의 1% 저분자량 히알루론산 용액, 1 ml H₂O, 100 mg NHS(시그마(Sigma)) 및 100 mg EDC(시그마)를 함께 혼합하고 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. 유도체화된 히알루론산을 이어서 2 부피의 IPA로 침전시키고, 짧게 압착하여 침전물의 물 및 용매 함량을 감소시키고, 66% 에탄올로 세척한 다음, 실온에서 4 ml 포스페이트 완충 식염수(시그마)에 재용해시켰다. 유도체화된 HA는 1 시간 이내에 완전히 용해되었다. 유도체화 HA의 농도를 수분 분석기를 사용하여 측정 한 후, 단백질 가교결합에 사용하기 전에 2% 용액으로 희석하였다. 모든 제제는 멸균하였으며, 실험들은 가능한 경우 층류 후드에서 수행하였다.

[0212] **실시예 4**

[0213] 폴리사카라이드 가교결합제 B의 제조:

[0214] 본 실시예에서는, 5 ml의 1% 카복시메틸 셀룰로스 용액, 1 ml H₂O, 100 mg NHS(시그마) 및 100 mg EDC(시그마)를 함께 혼합하고 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. 유도체화된 카복시메틸 셀룰로스를 이어서 2 부피의 IPA로 침전시키고, 짧게 압착하여 침전물의 물 및 용매 함량을 감소시키고, 66% 에탄올로 세척한 다음, 실온에서 4 ml 포스페이트 완충 식염수(시그마)에 재용해시켰다. 모든 제제는 멸균하였으며, 실험들은 가능한 경우 층류 후드에서 수행하였다.

[0215] **실시예 5**

[0216] 폴리사카라이드 가교결합제 C의 제조:

[0217] 본 실시예에서는, 4 ml의 2% HA를 0.5 ml의 10M NaOH 및 0.5 ml의 AGE와 혼합하고 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. 이어서, 용액을 1 ml 9M 아세트산으로 중화시키고, 40 mg의 NaCl을 가한 후 2 부피의 IPA로 침전시켰다. 침전물을 60% IPA로 세척하고, 여과지상에서 패딩 건조시킨 다음 3 ml 물에 재용해시켰다. 이어서, 혼입된 알

릴 기를 브롬수를 사용하여 전환시켰다(250 μ l를 가하였으나, 완전 전환에 필요한 양은 200 내지 250 μ l이었다). 과량의 브롬을 제거하기 위해, 30 mg의 NaCl에 이어 2 부피의 IPA를 가하여 용액을 재침전시켰다. 침전 물을 60% IPA로 세척하고, 여과지상에서 패딩 건조한 후, 2 ml 물에 재용해시켰다. 0.5 ml의 용액을 사용하여 수분 분석기에서 유도체화 HA의 최종 농도를 검사하였으며, 건조 물질 함량은 2.59%인 것으로 나타났다. 유도체화 HA를 단백질 가교결합에 사용하기 전에 2% 용액으로 희석하였다.

[0218] **실시예 6**

[0219] rh 트로포엘라스틴 1을 사용한 단백질 기본 제형의 제조:

[0220] 본 실시예에서는, 포스페이트 완충 식염수(엘라스타젠(Elastagen)) 중의 200 mg/ml rh 트로포엘라스틴 용액 250 μ l를 250 μ l의 포스페이트 완충 식염수와 혼합한 후 실시예 3의 히알루론산 가교결합제 500 μ l를 가하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 후 짧게 원심분리하여 기포를 제거하였다. 물질을 실온에서 30 분간 방치하여 제형화하였다. 이어서, 제형을 층류 후드에서 멸균 1 ml 주사기에 충전시켰다. 이렇게 제조된 제형은 모두 길이가 10 내지 20 cm인 응집성 가닥으로서 미세 게이지 31G 바늘을 통해 압출가능한 안정된 물질의 성질을 나타내었다.

[0221] **실시예 7**

[0222] 소 혈청 알부민(BSA)을 사용한 단백질 기본 제형의 제조:

[0223] 본 실시예에서는, 포스페이트 완충 식염수(시그마) 중의 200 mg/ml BSA 용액 250 μ l를 250 μ l의 포스페이트 완충 식염수와 혼합한 후 실시예 3의 히알루론산 가교결합제 500 μ l를 가하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 후 짧게 원심분리하여 기포를 제거하였다. 물질을 실온에서 30 분간 방치하여 제형화하였다. 이렇게 제조된 제형은 길이가 10 내지 20 cm인 응집성 가닥으로서 미세 게이지 31G 바늘을 통해 압출가능한 안정된 물질의 성질을 나타내었다.

[0224] **실시예 8**

[0225] rhHSA를 사용한 단백질 기본 제형의 제조:

[0226] 본 실시예에서는, 포스페이트 완충 식염수(시그마) 중의 재조합 HSA(시그마)의 20 mg/ml 용액을 동 부피의 실시예 3의 히알루론산 가교결합제와 혼합하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 후 짧게 원심분리하여 기포를 제거하였다. 물질을 실온에서 30 분간 방치하여 제형화하였다. 이에 의해 미세 게이지 31G 바늘을 통해 압출가능한 부드러운 가교결합된 투명한 무색 HSA 제형이 생성되었다.

[0227] **실시예 9**

[0228] rh 트로포엘라스틴 2를 사용한 단백질 기본 제형의 제조:

[0229] 본 실시예에서는, 포스페이트 완충 식염수(엘라스타젠) 중의 100 mg/ml rh 트로포엘라스틴 용액 500 μ l를 pH 8.5에서 실시예 5의 2% 히알루론산 가교결합제 500 μ l와 혼합하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 후 짧게 원심분리하여 기포를 제거하였다. 물질을 실온에서 12 시간동안 방치하여 제형화하였다. 생성된 제형은 HA 가교결합 트로포엘라스틴의 안정된 투명 무색 매트릭스 제형이었다.

[0230] **실시예 10**

[0231] 제형중 단량체 함량의 평가

[0232] 본 실시예에서는, 실시예 6에서 제조된 제형 분취량을 PBS에 침지시키고 생성된 상등액을 SDS-PAGE로 분석하였다(생성된 겔은 도 3에 예시되어 있다).

[0233] 부하: PBS에 침지시킨, 실시예 6에서 제조된 제형

[0234] 라인 M: 마커.

[0235] 라인 A 및 B: 상등액.

[0236] 라인 TE: 순수한 TE.

[0237] 겔로부터 볼 수 있듯이, HA-TE 제제로부터는 단량체가 추출되지 않았다.

[0238] **실시예 11**

- [0239] 제형 레올로지의 평가
- [0240] 본 실시예에서는, 실시예 6에서 제조된 제형의 전단 흐름에서의 레올로지 행태를 원뿔-평판 구조를 사용하는 하케(Haake) RS150 레오미터(rheometer)를 사용하여 연구하였다. 25 °C로 유지된 온도하에 35 mm/1° 티타늄 원뿔을 연구에 사용하였다.
- [0241] 변화하는 각 진동수하에 소 진폭 진동 전단 흐름에 대한 제형의 반응은 0.1 내지 100 rad/s의 각 진동수 범위에서 저장 모듈러스(G')에 의해 좌우된다. 상기 범위에 걸쳐, 저장 모듈러스는 각 진동수의 변화에 대해 비교적 영향받지 않았다. 정상 전단 흐름에서, 변형은 약 200 Pa 이하의 응력하에 선형으로 증가한다. 상기 값 이상에서는 적용된 응력의 작은 변화가 변형에 상당한 증가를 야기하였다. 전단 점도를 전단율에 대해 플롯팅한 경우, 유체는 저 전단율에서 약 260 Pa의 일정한 점도를 나타내었다. 그러나, 점도는 약 0.4/s의 전단율 이상에서 전단율 증가에 따라 급속히 감소하였다.
- [0242] 실시예 6에서 제조된 단백질 기본 제형의 레올로지 성질은, 비-가교결합 폴리사카라이드, 및 BDDE와 같은 짧은 가교결합체와 가교결합된 후 미세 바늘 압출이 가능하도록 미세화된 폴리사카라이드 생성물과 상당히 상이하였다. 이들 폴리사카라이드 생성물은 점성 유체와 보다 유사한 행태를 나타내며, 시험한 동일 진동수에 대한 손실 모듈러스(G'')로부터 그의 레올로지 성질에 더 큰 기여도를 갖는다. 실시예 6에서 제조된 제형의 복합 모듈러스의 비교적 일정한 값은 폴리사카라이드 기본 생성물에 대한 특별한 차이점을 제공한다.
- [0243] 하기에, 추가의 태양 또는 예를 나타낸다:
- [0244] 1. i) 하나 이상의 단백질 잔기; 및 ii) 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 포함하는 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 조성물.
- [0245] 2. 조성물이 주사가능한 조성물인, 태양 1의 조성물.
- [0246] 3. 조성물이 캐놀라, 카테터, 유연성 중합체 카테터, 바늘 주사기 또는 바늘없는 주사기에 의해 전달되는, 태양 1 또는 2의 조성물.
- [0247] 4. 조성물이 10 cm 이상의 길이까지 압출가능한, 태양 1 내지 3 중 하나 이상의 조성물.
- [0248] 5. 조성물이 18 내지 31G의 바늘을 통해 약 5 내지 약 30 cm의 길이까지 압출가능하고, 압출된 조성물이 실질적으로 표면 지지체 없이 응집되는, 태양 1 내지 4 중 하나 이상의 조성물.
- [0249] 6. 조성물이 25G 바늘을 통해 5 cm, 10 cm, 12 cm, 15 cm, 18 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의 길이까지 압출가능한, 태양 1 내지 5 중 하나 이상의 조성물.
- [0250] 7. 조성물이 미세 게이지 바늘을 통해 압출될 때 10 cm, 15 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의 길이까지 압출가능한, 태양 1 내지 6 중 하나 이상의 조성물.
- [0251] 8. 조성물이 미세 게이지 바늘을 통해 압출될 때 표면 지지체 없이 5 내지 30 cm, 10 내지 20 cm 또는 15 내지 30 cm의 길이까지 압출가능하고, 압출된 조성물이 실질적으로 응집성이며 실질적으로 응집되는, 태양 1 내지 7 중 하나 이상의 조성물.
- [0252] 9. 조성물이 중간 게이지 바늘을 통해 압출될 때 또 다른 물리적 지지체 없이 10 cm, 15 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의 길이까지 압출가능하고, 압출된 조성물이 실질적으로 응집성이며 실질적으로 응집되는, 태양 1 내지 8 중 하나 이상의 조성물.
- [0253] 10. 조성물이 큰 게이지 바늘을 통해 압출될 때 추가의 표면 지지체 없이 10 cm, 15 cm, 20 cm 또는 25 cm 이상의 길이까지 압출가능하고, 압출된 조성물이 실질적으로 응집성이며 실질적으로 응집되는, 태양 1 내지 9 중 하나 이상의 조성물.
- [0254] 11. 조성물이 추가의 표면 지지체 없이 수직으로부터 45° 이상의 각도에서 10 cm, 20 cm 또는 30 cm 이상의 길이까지 압출가능하고, 물질의 응집성 가닥을 형성하는, 태양 1 내지 10 중 하나 이상의 조성물.
- [0255] 12. 압출된 조성물이 물질의 응집성 가닥을 형성하는, 태양 1 내지 11 중 하나 이상의 조성물.
- [0256] 13. 조성물이 실질적인 추가의 처리없이 압출될 수 있는, 태양 1 내지 12 중 하나 이상의 조성물.
- [0257] 14. 조성물이 미세 게이지 바늘을 통해 실질적인 추가의 처리없이 압출될 수 있고 압출될 때 실질적으로 응집성이고 실질적으로 추가의 물리적 지지체없이 응집되는, 태양 1 내지 13 중 하나 이상의 조성물.

- [0258] 15. 압출된 조성물의 스트링이 압출시에 파괴되지 않도록 조성물이 바늘 압출후 충분한 응집성을 유지하는, 태양 1 내지 14 중 하나 이상의 조성물.
- [0259] 16. 조성물 스트링의 파괴없이 10 cm 이상, 12 cm 이상, 15 cm 이상, 18 cm 이상 또는 20 cm 이상의 조성물 스트링이 바늘로부터 압출될 수 있도록 조성물이 바늘 압출후 충분한 응집성을 유지하는, 태양 1 내지 15 중 하나 이상의 조성물.
- [0260] 17. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 전장 단백질 잔기를 포함하는, 태양 1 내지 16 중 하나 이상의 조성물.
- [0261] 18. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 실질적인 전장 단백질 잔기를 포함하는, 태양 1 내지 17 중 하나 이상의 조성물.
- [0262] 19. 조성물이 바늘을 통해 분출될 수 있도록 조성물이 실질적으로 유연성인, 태양 1 내지 18 중 하나 이상의 조성물.
- [0263] 20. 조성물이 미세 게이지 바늘을 통해 분출이 가능하도록 충분한 유연성을 갖는, 태양 1 내지 19 중 하나 이상의 조성물.
- [0264] 21. 조성물이 하나 이상의 단백질 잔기가 그의 전장 또는 실질적인 전장을 유지할 수 있게 하고, 하나 이상의 단백질 잔기가 신속한 재흡수 또는 파괴로부터 보호되는, 태양 1 내지 20 중 하나 이상의 조성물.
- [0265] 22. 조성물이 하나 이상의 단백질 잔기가 그의 전장 또는 실질적인 전장을 유지할 수 있게 하고, 조성물이 바늘 주사가능하고, 응집성 구조를 유지하며, 생체내 조성물의 재흡수를 지연시키기에 충분하게 가교결합되는, 태양 1 내지 21 중 하나 이상의 조성물.
- [0266] 23. 하나 이상의 단백질 잔기가 실질적인 전장이고 실질적으로 분자내 가교결합이 없는, 태양 1 내지 22 중 하나 이상의 조성물.
- [0267] 24. 조성물이 조직 적합성이고, 조직 내부성장을 증대시키거나, 조직 재성장을 증대시키거나, 이들의 조합인, 태양 1 내지 23 중 하나 이상의 조성물.
- [0268] 25. 조성물이 전형적이고 바람직한 구조로 개조되고 새로운 조직내에 혼입될 수 있는, 태양 1 내지 24 중 하나 이상의 조성물.
- [0269] 26. 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기가 물 또는 식염수 용액중에 가용성 또는 충분히 가용성으로 유지되는, 태양 1 내지 25 중 하나 이상의 조성물.
- [0270] 27. 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기가 수성 또는 생리학적 매질중에 충분히 가용성인, 태양 1 내지 26 중 하나 이상의 조성물.
- [0271] 28. 하나 이상의 가교결합 단백질 잔기가 실질적으로 분자간 가교결합되는, 태양 1 내지 27 중 하나 이상의 조성물.
- [0272] 29. 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기가 실질적인 생체이용성, 실질적인 생체분해성, 실질적인 생체흡수성 또는 실질적인 생체재흡수성 중 하나 이상의 성질을 갖는, 태양 1 내지 28 중 하나 이상의 조성물.
- [0273] 30. 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기가 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기, 하나 이상의 올리고사카라이드 잔기 또는 이들의 조합을 포함하는, 태양 1 내지 29 중 하나 이상의 조성물.
- [0274] 31. 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기가 저분자량, 중간분자량, 고분자량 폴리사카라이드 잔기 또는 이들의 조합을 포함하는, 태양 1 내지 30 중 하나 이상의 조성물.
- [0275] 32. 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기가 약 50,000 내지 약 275,000 달톤의 분자량을 포함하는, 태양 1 내지 31 중 하나 이상의 조성물.
- [0276] 33. 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기가 히알루론산, 셀룰로스 유도체, 카복시 셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시-프로필셀룰로스, 카복시메틸 아밀로스, 잔탄 검, 구아 검, α -글루칸, β -글루칸, β -1,4-글루칸, β -1,3-글루칸, 알기네이트, 카복시메틸 텍스트란, 글리코사미노글리칸 유도체, 콘드로이틴-6-설페이트, 더마틴 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트-코-글리콜)산, 트라이칼슘 포스페이트 또는 1-하이드록시

아파타이트 잔기, 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염, 유도체 또는 조합으로부터 유도되거나 이를 포함하는, 태양 1 내지 32 중 하나 이상의 조성물.

- [0277] 34. 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기가 히알루론산 잔기로부터 유도되거나 이를 포함하는, 태양 1 내지 33 중 하나 이상의 조성물.
- [0278] 35. 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기가 카복시메틸 셀룰로스 잔기로부터 유도되거나 이를 포함하는, 태양 1 내지 34 중 하나 이상의 조성물.
- [0279] 36. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 약 0.01 내지 약 30%의 농도로 포함하는, 태양 1 내지 35 중 하나 이상의 조성물.
- [0280] 37. 하나 이상의 단백질 잔기가, 하나 이상의 라이신 잔기, 하나 이상의 아르기닌 잔기 또는 이들의 조합을 포함하는 아민-함유 측쇄 잔기를 포함하는, 태양 1 내지 36 중 하나 이상의 조성물.
- [0281] 38. 하나 이상의 단백질 잔기가 트로포엘라스틴, 엘라스틴, 알부민, 콜라겐, 콜라겐 단량체, 면역글로불린 또는 인슐린 잔기, 또는 이들의 유도체 또는 조합으로부터 유도되거나 이를 포함하는, 태양 1 내지 37 중 하나 이상의 조성물.
- [0282] 39. 하나 이상의 단백질 잔기의 양이 약 1 내지 약 200 mg/ml인, 태양 1 내지 38 중 하나 이상의 조성물.
- [0283] 40. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 생체활성 단백질을 포함하는, 태양 1 내지 39 중 하나 이상의 조성물.
- [0284] 41. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 천연 인간 단백질과 실질적으로 동일한 합성 단백질 잔기로부터 유도되거나 이를 포함하는, 태양 1 내지 40 중 하나 이상의 조성물.
- [0285] 42. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 안정화된 단백질 잔기로부터 유도되거나 이를 포함하는, 태양 1 내지 41 중 하나 이상의 조성물.
- [0286] 43. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 세포의 단백질 잔기로부터 유도되거나 이를 포함하는, 태양 1 내지 42 중 하나 이상의 조성물.
- [0287] 44. 세포의 단백질이 트로포엘라스틴, 엘라스틴, 콜라겐 또는 이들의 유도체인, 태양 1 내지 43 중 하나 이상의 조성물.
- [0288] 45. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 약 0.1 내지 약 5%의 농도로 포함하는, 태양 1 내지 44 중 하나 이상의 조성물.
- [0289] 46. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 약 0.1 내지 약 1.5%의 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기 대 약 0.1 내지 약 6%의 하나 이상의 단백질 잔기의 비를 포함하는, 태양 1 내지 45 중 하나 이상의 조성물.
- [0290] 47. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 폴리사카라이드 잔기를 포함하는 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기 약 0.1 내지 약 1.5% 대 하나 이상의 단백질 잔기 약 0.1 내지 약 6%의 비를 포함하는, 태양 1 내지 46 중 하나 이상의 조성물.
- [0291] 48. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 5%, 10%, 20% 또는 25% 이상의 활성화 카복실 및/또는 하이드록실기, 변형된 카복실 및/또는 하이드록실기 또는 이들의 조합을 포함하는 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합 분자로부터 제조되는, 태양 1 내지 47 중 하나 이상의 조성물.
- [0292] 49. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 5% 이상의 활성화 카복실 및/또는 하이드록실기, 변형된 카복실 및/또는 하이드록실기 또는 이들의 조합을 포함하는 하나 이상의 사카라이드-함유 가교결합 분자로부터 제조되는, 태양 1 내지 48 중 하나 이상의 조성물.
- [0293] 50. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 5% 미만의 단량체성 단백질을 포함하는, 태양 1 내지 49 중 하나 이상의 조성물.
- [0294] 51. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 1% 미만의 단량체성 단백질을 포함하는, 태양 1 내지 50 중 하나 이상의 조성물.
- [0295] 52. 조성물이 수술, 미용, 조직 벌크화, 실금 치료, 피부 대체 제품, 피부과, 피부과 수술, 화장품 또는 이들의 조합 중 하나 이상에서 치료적으로 사용되는, 태양 1 내지 51 중 하나 이상의 조성물.

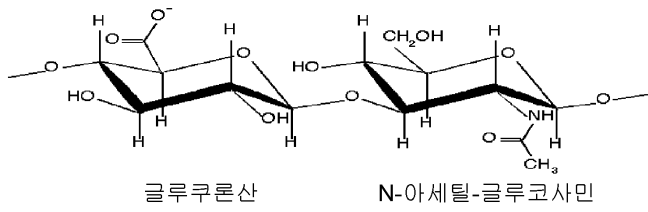
- [0296] 53. 조성물이 피부과에서 치료적으로 사용되는, 태양 1 내지 52 중 하나 이상의 조성물.
- [0297] 54. 조성물이 피부과 수술에서 치료적으로 사용되는, 태양 1 내지 53 중 하나 이상의 조성물.
- [0298] 55. 조성물이 미용술, 피부과 또는 이들의 조합에서 국소 적용으로 치료적으로 사용되는, 태양 1 내지 54 중 하나 이상의 조성물.
- [0299] 56. 조성물이 피부과에서 국소 적용으로 치료적으로 사용되는, 태양 1 내지 55 중 하나 이상의 조성물.
- [0300] 57. 조성물이 안면 주름의 치료, 안면 주름의 충전, 가는 주름의 치료, 노화 피부의 치료, 흉터있는 조직의 치료, 피부 함몰의 치료 또는 이들의 조합을 위해 사용되는, 태양 1 내지 56 중 하나 이상의 조성물.
- [0301] 58. 조성물이 실질적으로 생체활성인 단백질 잔기의 국소 침착물의 이식에 사용되는, 태양 1 내지 57 중 하나 이상의 조성물.
- [0302] 59. 조성물이 실질적으로 생체활성인 단백질 잔기의 국소 침착물의 이식에 사용되는, 태양 1 내지 58 중 하나 이상의 조성물.
- [0303] 60. 조성물이 실질적으로 생체활성인 단백질 잔기의 서방성 침착물의 이식에 사용되는, 태양 1 내지 59 중 하나 이상의 조성물.
- [0304] 61. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 생체분자 및/또는 생체중합체와 가교결합된 하나 이상의 단백질 잔기를 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상 포함하고, 상기 생체분자 및/또는 생체중합체가 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 포함하는, 태양 1 내지 60 중 하나 이상의 조성물.
- [0305] 62. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 가교결합 생체분자, 생체중합체 또는 이들의 조합과 실질적으로 가교결합되는 하나 이상의 단백질 잔기를 포함하는, 태양 1 내지 61 중 하나 이상의 조성물.
- [0306] 63. 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기 상의 가교결합의 수가 하나 이상의 폴리사카라이드 잔기 상의 가능한 가교결합 부위의 수의 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 이상일 수 있는, 태양 1 내지 62 중 하나 이상의 조성물.
- [0307] 64. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스에 혼입되지 않고 결합되지 않은 채 남아 있는 단백질 단위의 수가 1%, 3%, 5% 또는 7% 이상일 수 있는, 태양 1 내지 63 중 하나 이상의 조성물.
- [0308] 65. 20%, 15%, 10% 또는 7% 미만의 단백질 단위가 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스중에 혼입되지 않고 결합되지 않은 채 남아 있는, 태양 1 내지 64 중 하나 이상의 조성물.
- [0309] 66. 약 90 내지 약 100%의 단백질 단량체가 조성물중에 혼입될 수 있도록 단백질 단량체가 가교결합될 수 있는, 태양 1 내지 65 중 하나 이상의 조성물.
- [0310] 67. 하나 이상의 단백질 잔기가 전장 단백질 또는 실질적인 전장 단백질로부터 유도되고, 단백질 잔기의 구조가 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기에 의해 실질적으로 차폐되지 않는, 태양 1 내지 66 중 하나 이상의 조성물.
- [0311] 68. 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기에 의해 실질적으로 차폐되지 않는 구조를 갖는 하나 이상의 단백질 잔기를 포함하는 조성물이 보다 조직 적합성이고, 조직 내부성장, 재생장을 증대시키거나 이들의 조합일 수 있는, 태양 1 내지 67 중 하나 이상의 조성물.
- [0312] 69. 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기에 의해 실질적으로 차폐되지 않는 구조를 갖는 하나 이상의 단백질 잔기를 포함하는 조성물이 보다 전형적이고 바람직한 구조로 개조되고/되거나 새로운 조직내에 혼입될 수 있는, 태양 1 내지 68 중 하나 이상의 조성물.
- [0313] 70. 하나 이상의 단백질을 하나 이상의 가용성 사카라이드-함유 분자와 가교결합시키는 것을 포함하는, 태양 1 내지 69 중 하나 이상의 조성물의 제조 방법.
- [0314] 71. 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스가 i) 하나 이상의 단백질 잔기; 및 ii) 하나 이상의 사카라이드-함유 잔기를 포함하고; 가교결합이 i) 하나 이상의 사카라이드-함유 분자를 하나 이상의 반응성 화학 기를 포함하도록 변형시키고, ii) 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자를, 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자 상의 반응기에 상보적인 반응성 화학 기를 포함하는 하나 이상의 단백질과 결합시키고, iii) 하나 이상의 단백질과 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자 사이에 하나 이상의 결합을 형성하는 것을 포함하는, 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 포함하는 조성물의 제조 방법.
- [0315] 72. 하나 이상의 반응성 화학 기가 하나 이상의 단백질과 결합될 때 공유 결합을 형성할 수 있는 화학 기인, 태

양 70 또는 71의 방법.

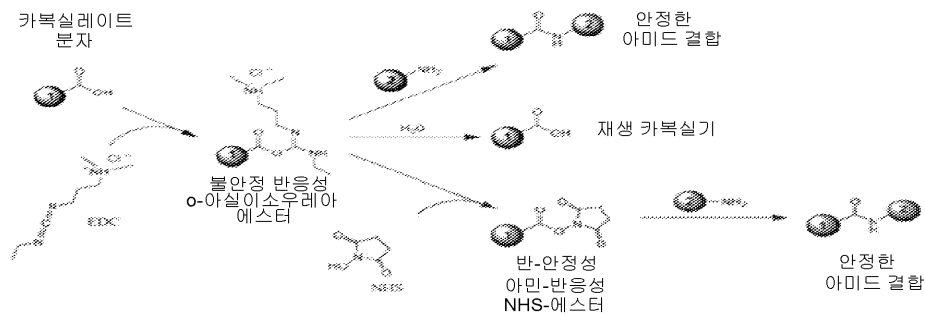
- [0316] 73. 하나 이상의 결합이 공유 결합인, 태양 70 내지 72 중 하나 이상의 방법.
- [0317] 74. 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자가 물 및/또는 식염수 용액중에 가용성 또는 실질적으로 가용성인, 태양 70 내지 73 중 하나 이상의 방법.
- [0318] 75. 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자가 물 또는 생리적 완충액 중에 가용성 또는 실질적인 가용성으로 유지되는, 태양 70 내지 74 중 하나 이상의 방법.
- [0319] 76. 하나 이상의 사카라이드-함유 분자가 카복실 및/또는 하이드록실 기를 포함하는, 태양 70 내지 75 중 하나 이상의 방법.
- [0320] 77. 하나 이상의 사카라이드-함유 분자가 카복실 및/또는 하이드록실 기를 활성화시켜 변형되는, 태양 70 내지 76 중 하나 이상의 방법.
- [0321] 78. 상기 방법이 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자의 침전 및/또는 여과에 의해 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자를 정제하여 미반응 변형 반응물을 제거하거나 실질적으로 제거하는 것을 추가로 포함하는, 태양 70 내지 77 중 하나 이상의 방법.
- [0322] 79. 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자가 하나 이상의 단백질과 결합될 때 가교결합제로 사용되는, 태양 70 내지 78 중 하나 이상의 방법.
- [0323] 80. 변형된 하나 이상의 사카라이드-함유 분자의 용액을 하나 이상의 단백질과 혼합하여 하나 이상의 가교결합 단백질 매트릭스를 생성하는, 태양 70 내지 79 중 하나 이상의 방법.
- [0324] 81. 태양 1 내지 69 중 하나 이상의 조성물을 주사하는 것을 포함하는 사용 방법.
- [0325] 82. 주사가 다음 중 하나 이상에서 조직을 벌크화시키거나 증대시키거나 이들의 조합을 위해 사용되는, 태양 81의 방법: 의학 또는 수의학; 수술; 복원 수술; 미용 수술; 미용; 조직 벌크화; 피부과 수술; 눈 수술; 류마티스 내과; 약리학; 화장품 분야; 일반 외과에서 전색 출혈; 재건 외과 또는 신경외과에서 신경 및 혈관 재건; 성형 외과; 정형외과 수술에서 피부, 혈관 또는 연골 이식물 또는 이식편의 고정; 무릎 골관절염 치료; 혈관 수술; 세포 또는 생체활성 분자, 예를 들면, 병소 복원을 자극하기 위한 성장 인자의 전달을 위한 비히클로서; 상처 치료 및 조직 재생을 촉진하거나 뼈 생성을 촉진하기 위한 가교결합 단백질 매트릭스 조성물과 함께 성장 인자의 국소 전달; 정형외과 절차에서 연골 복원 자극; 만성 궤양과 같은 병리학적 상처 질환 치료; 배양중 자가 세포의 증식을 통한 인공 조직을 생성하기 위한 인공뼈대 역할; 성형 수술에서 조직 증대, 예를 들면, 피부 주름 충전 또는 입술 재건을 위한 조직 증대; 체강 또는 결합의 보충; 미용 의료; 정형외과 치료; 또는 눈 수술중과 같이 수술시 유출된 용적 복원.
- [0326] 83. 태양 1 내지 69 중 하나 이상의 조성물을 국소적으로 적용하는 것을 포함하는 사용 방법.
- [0327] 84. 국소 적용이 미용술, 피부과, 안면 주름의 충전, 가는 주름, 노화 피부의 치료, 흉터있는 조직 또는 피부 함몰 중 하나 이상에서 건강하거나 손상된 조직에 사용되는, 태양 83의 방법.
- [0328] 85. 태양 1 내지 69 중 하나 이상의 조성물을 투여하기 위한 키트.
- [0329] 본 개시내용을 특정 태양들과 관련하여 설명하였지만, 본 개시내용은 개시된 태양들로 제한되지 않으며, 반대로 다양한 변형 및 동등한 방식을 포함하는 것임을 주지해야 한다. 또한, 본원에 기술된 다양한 태양들은 다른 태양들과 함께 수행될 수 있다. 예를 들면, 한 태양의 양태들은 또 다른 태양을 실현시키기 위해 또 다른 태양의 양태들과 조합될 수 있다. 또한, 한 태양의 각각의 별개의 특징 또는 성분들은 또 다른 태양을 구성할 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

