



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0090965
(43) 공개일자 2017년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/08 (2006.01) A61K 47/36 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 37/0072 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0012519
(22) 출원일자 2016년02월01일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020160011843 2016년01월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한미약품 주식회사
경기도 화성시 팔탄면 무하로 214
(72) 발명자
최성철
경기도 수원시 영통구 청명로 132, 333동 1604호
(영통동, 벽산삼익아파트)
김현일
경기도 파주시 책향기로 337, 305동 101호 (문발동, 숲속길마을동문굿모닝힐아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **복합 히알루론산 가교물 및 그 제조방법**

(57) 요약

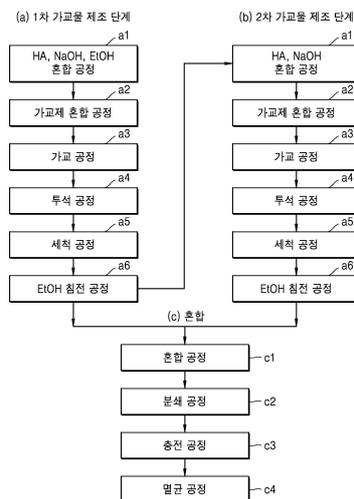
본 발명의 일 양상은

에탄올 함유 알칼리 수용액 중에서, 히알루론산을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 반응시키는 단계를 포함하는, 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법;

상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 반응시키는 단계를 포함하는 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법; 및

상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물 및 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 조합을 포함하는 복합 히알루론산 가교물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0024 (2013.01)

(72) 발명자

양기영

충청남도 천안시 동남구 청수14로 16, 303동 103호
(청당동, 버들마을우미린아파트)

박효승

경기도 평택시 평택로28번길 12, 1009호 (평택동)

이백호

경기도 평택시 원평2로35번길 41, A동 305호 (통복동)

명세서

청구범위

청구항 1

에탄올 함유 알칼리 수용액 중에서, 히알루론산을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 가교반응시키는 단계를 포함하는, 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법.

청구항 2

알칼리 수용액 중에서, 제1항의 제조방법에 따라 제조된 히알루론산 가교물을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 추가로 가교반응시키는 단계를 포함하는, 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 히알루론산은 미생물 발효에 의해 생성된 히알루론산인 것인 제조방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 히알루론산은 히알루론산, 히알루론산의 염, 또는 이들의 혼합물인 것인 제조방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 히알루론산의 염은 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼륨, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트, 히알루론산 테트라부틸암모늄염, 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것인 제조방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 히알루론산은 분자량 100,000 내지 6,000,000인 히알루론산 나트륨인 것인 제조방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제는 부탄디올디글리시디에테르(1,4-butandiol diglycidyl ether: BDDE), 에틸렌글리콜디글리시디에테르(ethylene glycol diglycidyl ether: EGDGE), 헥산디올디글리시디에테르(1,6-hexanediol diglycidyl ether), 프로필렌글리콜디글리시디에테르(propylene glycol diglycidyl ether), 폴리프로필렌글리콜디글리시디에테르(polypropylene glycol diglycidyl ether), 폴리테트라메틸렌글리콜디글리시디에테르(polytetramethylene glycol diglycidyl ether), 네오펜틸글리콜디글리시디에테르(neopentyl glycol diglycidyl ether), 폴리글리세롤폴리글리시디에테르(polyglycerol polyglycidyl ether), 디글리세롤폴리글리시디에테르(diglycerol polyglycidyl ether), 글리세롤폴리글리시디에테르(glycerol polyglycidyl ether), 트리메틸프로판폴리글리시디에테르(tri-methylpropane polyglycidyl ether), 비스에폭시프로폭시에틸렌(1,2-(bis(2,3-epoxypropoxy)ethylene), 펜타에리쓰리톨폴리글리시디에테르(pentaerythritol polyglycidyl ether), 소르비톨폴리글리시디에테르(sorbitol polyglycidyl ether), 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 에탄올 함유 알칼리 수용액은 에탄올을 5 ~ 13 w/w%로 함유하는 알칼리 수용액인 것인 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 에탄올 함유 알칼리 수용액은 에탄올을 5 ~ 13 w/w%로 함유하는 0.7 ~ 1.3 w/w% 수산화나

트롬 수용액인 것인 제조방법.

청구항 10

탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물; 및

탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 조합을 포함하는 복합 히알루론산 가교물.

청구항 11

에탄올 함유 알칼리 수용액 중에서, 히알루론산을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 반응시키는 단계를 포함하는 가교방법으로 제조된 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물; 및

알칼리 수용액 중에서, 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 반응시키는 단계를 포함하는 방법으로 제조된 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 조합을 포함하는 복합 히알루론산 가교물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 탄성 100 ~ 150 Pa 및 점도 20 ~ 60 Pa인 복합 히알루론산 가교물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물 및 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 8:2 내지 9:1의 중량비로 조합한 것인, 복합 히알루론산 가교물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 복합 히알루론산 가교물은 평균 입자 크기가 500 ~ 750 μm 가 되도록 입자화된 것인 복합 히알루론산 가교물.

청구항 15

제10항 또는 제11항에 따른 복합 히알루론산 가교물을 포함하는 생체 적합성 소재.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 생체 적합성 소재는 관절염 치료용 삽입물, 주름살 치료용 삽입물, 성형용 필터, 및 약물 전달체로 구성된 군에서 선택되는 것인 생체 적합성 소재.

청구항 17

제1항의 제조방법으로 제조된 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물 및 제2항의 제조방법으로 제조된 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 조합하는 단계를 포함하고,

제조하고자 하는 복합 히알루론산 가교물의 점탄성에 따라 상기 조합 비율을 조절하는 것인,

복합 히알루론산 가교물을 제조하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물 및 상기 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 9:1 내지 8:2의 중량비로 조합하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 히알루론산 가교물의 제조방법 및 그 제조방법으로 제조된 히알루론산 가교물을 포함하는 생체에 적용하기 적절한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산의 가교물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0002] 히알루론산은 N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루쿠론산으로 이루어진 반복 단위(repeating unit)가 선형으로 연결되어 있는 생체 고분자 물질로서, 동물의 태반, 안구의 유리액, 관절의 활액, 또는 닭벼슬 등에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한, 히알루론산은 스트렙토코코스속 미생물(예: *Streptococcus equi*, *Streptococcus zoepidemecus*) 또는 스타필로코코스속 미생물에 의한 발효에 의해서도 생산되는 것으로 알려져 있다.

[0003] 현재 미국에는 1회 투여만으로 6 개월간 효과가 지속되는 히알루론산 가교물 주사제인 Synvisc-one 이 시판되고 있다. Synvisc-one 은 닭 벼슬의 히알루론산을 포르말린 함유 수용액으로 추출하면서 얻어진 히알루론산 가교물을 함유하며, 히알루론산에 연결된 단백질이 포르말린에 의해 약하게 가교되어 낮은 점탄성을 가진다(특허문헌 1). 상기 약하게 가교된 히알루론산은, 추가로 가교제 DVS(divinyl sulfone)에 의해 더욱 가교되어 증가된 점탄성을 갖는 히알루론산 가교물과 조합되어 인체의 관절강에 적용하기 적절한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물(Synvisc-one)을 구성한다.

[0004] 그런데, 닭 벼슬과 같은 동물 유래 히알루론산은 동물 기원 바이러스 및 원료 품질의 균일성 문제로 인해 품질 관리가 용이하지 않은 문제가 있다. 따라서, 관절강에 적절한 점탄성을 갖는 히알루론산 주사제의 개발을 위해, 동물 기원이 아닌 미생물 유래 히알루론산을 이용한 낮은 점탄성의 가교물 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. US 4,713,448

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 양상은 낮은 점탄성의 히알루론산 가교물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 일 양상은 생체에 적용하기 적절한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산의 가교물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 일 양상은 상기 복합 히알루론산의 가교물을 포함하는 생체 적합성 소재를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 일 양상은 생체에 적용하기 적절한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산의 가교물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양상은

[0011] 에탄올 함유 알칼리 수용액 중에서, 히알루론산을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 반응시키는 단계를 포함하는, 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 일 양상은 알칼리 수용액 중에서, 상기 본 발명의 일 양상에 따른 제조방법에 따라 제조된 히알루론산 가교물을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 반응시키는 단계를 포함하는, 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 일 양상은

[0014] 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물; 및

[0015] 상기 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 조합을 포함하는 복합 히알루론산 가교물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 일 양상은

[0017] 탄성 50-200 Pa 및 점도 20-100 Pa의 히알루론산 가교물; 및

- [0018] 탄성 400-800 Pa 및 점도 40-100 Pa의 히알루론산 가교물의 조합을 포함하는 복합 히알루론산 가교물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 일 양상은
- [0020] 상기 본 발명에 따른 임의의 복합 히알루론산 가교물을 포함하는 생체 적합성 소재를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 일 양상은
- [0022] 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물 및 상기 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 조합하는 단계를 포함하고,
- [0023] 제조하고자 하는 복합 히알루론산 가교물의 점탄성에 따라 상기 조합 비율을 조절하는 것인,
- [0024] 복합 히알루론산 가교물을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 일 양상에 따른 히알루론산 가교물의 제조방법에 따르면, 알칼리 수용액 중에서 에폭시계 가교제를 이용한 히알루론산의 가교물 제조 시 에탄올을 알칼리 수용액 중에서 함유시킴으로써 점탄성이 낮은 히알루론산의 가교물을 제조할 수 있으며, 반응 조건에 따라 히알루론산 가교물의 점탄성 조절이 가능하게 되었다. 또한, 낮은 점탄성의 히알루론산 가교물을, 추가로 더 가교시켜 제조된 높은 점탄성의 히알루론산 가교물과 조합함으로써, 원하는 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 제조할 수 있게 되었다. 따라서, 본 발명의 일 양상에 따르면 생체에 적용하기 적합한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 제조할 수 있으며, 특히 인체 관절액과 유사한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 획득할 수 있어 골관절염의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명의 일 구체예에 따른 복합 히알루론산 가교물의 제조방법의 순서도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된, 고분자량(약 2.5 MDa) 히알루론산의 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합비율을 9:1로 제조한 복합 히알루론산 가교물에 대해 입도를 측정된 결과를 나타낸 입도 분포 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된, 고분자량 히알루론산의 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합비율을 9:1로 제조한 복합 히알루론산 가교물에 대한 MTT 분석 결과를 양성 대조군(Teflon) 및 음성 대조군(Latex)에 대한 결과와 함께 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용 전부는 본 명세서에 참고로 통합된다.
- [0029] 본 발명자들은 미생물 유래의 정제된 히알루론산 원료를 이용하여 약하게 가교된 히알루론산 가교물을 제조하기 위해 포르말린의 사용을 시도하였으나, 미생물 유래의 정제된 히알루론산은 낮은 단백질 함량으로 인해 포르말린에 의한 가교물을 얻을 수 없었다. 이에 단백질 함량이 낮은 미생물 유래의 정제된 히알루론산을 약하게 가교시킬 수 있는 방법에 대해 연구한 결과, 알칼리 수용액 중에서 다관능성 에폭시계 가교제를 이용하는 종래 히알루론산의 가교반응에서 알칼리 수용액 중에 에탄올을 부가하여 가교반응을 수행할 경우 히알루론산이 약하게 가교되어 새로운 범위의 낮은 점탄성을 갖는 히알루론산 가교물을 제조할 수 있음을 발견하게 되었다. 또한, 상기 약하게 가교되어 낮은 점탄성을 갖는 히알루론산 가교물을 다관능성 에폭시계 가교제를 이용하여 2차 가교반응을 수행할 경우 더욱 가교되어 증가된 점탄성을 갖는 히알루론산 가교물을 획득할 수 있음을 확인하였다.
- [0030] 본 발명은 일 양상에 있어서, 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 제공한다.
- [0031] 상기 히알루론산 가교물은 특정 가교방법으로 제조된 히알루론산 가교물로 한정되는 것은 아니다.

- [0032] 일 구체예에서, 상기 히알루론산 가교물은 에탄올 함유 알칼리 수용액 중에서, 히알루론산을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 가교반응시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있으며, 하기 보다 상세하게 설명한다.
- [0033] 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물은 히알루론산이 사용될 수 있는 임의의 생체 적합성 소재로서 사용될 수 있으며, 예를 들어 관절염 치료용 삽입물, 주름살 치료용 삽입물, 성형용 필터, 및 약물 전달체로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 필요할 경우, 상기 히알루론산 가교물은 가교반응을 추가로 수행하여 획득될 수 있는 더 높은 점탄성을 갖는 히알루론산 가교물과 조합되어, 보다 적합한 생체 적합성 소재로서 사용될 수도 있다.
- [0034] 본 발명은 다른 일 양상에 있어서, 에탄올 함유 알칼리 수용액 중에서, 히알루론산을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 가교반응시키는 단계를 포함하는, 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명은 또 다른 일 양상에 있어서, 알칼리 수용액 중에서, 상기 제조방법에 따라 제조된 히알루론산 가교물을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 추가로 가교반응시키는 단계를 포함하는, 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물의 제조방법을 제공한다.
- [0036] 본 명세서에서는, 상기 제조방법에 따라 제조된 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 1차 가교물, 그 1차 가교물에 대해 추가로 가교반응을 수행하여 제조된 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 2차 가교물이라고 명명하기도 한다. 상기 1차 가교물은 히알루론산 겔의 형태를 가지며, 상기 2차 가교물은 히알루론산 입자 형태를 가진다.
- [0037] 본 명세서에서, 상기 히알루론산은 히알루론산 자체, 히알루론산의 염, 또는 이들의 혼합물을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 상기 히알루론산의 염은 생체에 적용하기에 적합한 임의의 염 형태일 수 있으며, 예를 들어 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼륨, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트, 히알루론산 테트라부틸암모늄염, 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 히알루론산의 염은 히알루론산 나트륨이다.
- [0038] 상기 히알루론산은 분자량 100,000 내지 6,000,000인 히알루론산일 수 있다. 상기 분자량에 따라, 생성되는 히알루론산 가교물의 점탄성이 달라질 수 있다.
- [0039] 일 구체예에서, 상기 히알루론산은 분자량 100,000 내지 6,000,000인 히알루론산 나트륨이다.
- [0040] 상기 히알루론산은 당해 기술분야에 공지된 임의의 히알루론산을 포함하며, 임의의 원료로부터 얻은 히알루론산을 이용할 수 있다. 상기 히알루론산은 동물(예: 동물 태반, 닭벼슬,)일 수도 있고, 발효시 히알루론산을 생산할 수 있는 임의의 미생물(예: 스태필로코코스속(*Staphylococcus*) 미생물, 스트렙토코코스속(*Streptococcus*) 미생물) 유래의 히알루론산일 수 있다.
- [0041] 일 구체예에서, 상기 히알루론산은 미생물 유래의 히알루론산이며, 예를 들어 스태필로코코스속 미생물 유래의 히알루론산이다. 미생물 유래의 히알루론산은 동물 기원 히알루론산의 바이러스 문제 혹은 원료 품질의 균일성 문제로부터 자유로울 수 있어 의약품으로서 제조 시 품질관리의 측면에서 우수한 장점이 있다.
- [0042] 상기 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제는 당해 기술분야에 공지된 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 임의의 에폭시계 가교제이며, 예를 들어 부탄디올디글리시디에테르(1,4-butandiol diglycidyl ether: BDDE), 에틸렌글리콜디글리시디에테르(ethylene glycol diglycidyl ether: EGDGE), 헥산디올디글리시디에테르(1,6-hexanediol diglycidyl ether), 프로필렌글리콜디글리시디에테르(propylene glycol diglycidyl ether), 폴리프로필렌글리콜디글리시디에테르(polypropylene glycol diglycidyl ether), 폴리테트라메틸렌글리콜디글리시디에테르(polytetramethylene glycol diglycidyl ether), 네오펜틸글리콜디글리시디에테르(neopentyl glycol diglycidyl ether), 폴리글리세롤폴리글리시디에테르(polyglycerol polyglycidyl ether), 디글리세롤폴리글리시디에테르(diglycerol polyglycidyl ether), 글리세롤폴리글리시디에테르(glycerol polyglycidyl ether), 트리메틸프로판폴리글리시디에테르(tri-methylpropane polyglycidyl ether), 비스에폭시프로폭시에틸렌(1,2-bis(2,3-epoxypropoxy)ethylene), 펜타에리트리톨폴리글리시디에테르(pentaerythritol polyglycidyl ether), 소르비톨폴리글리시디에테르(sorbitol polyglycidyl ether), 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0043] 일 구체예에서, 상기 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제는 부탄디올디글리시디에테르(BDDE),

에틸렌글리콜디글리시딜에테르(EGDGE), 헥산디올디글리시딜에테르, 또는 이들의 임의의 조합이다.

- [0044] 일 구체예에서, 상기 에폭시계 가교제는 상기 히알루론산 또는 히알루론산 가교물에 대비 10 $\mu\text{l/g}$ ~ 100 $\mu\text{l/g}$ 의 범위로 반응시킬 수 있으며, 보다 구체적으로는 20 $\mu\text{l/g}$ ~ 100 $\mu\text{l/g}$ 의 범위로 반응시킬 수 있다. 상기 에폭시계 가교제가 상기 범위보다 적은 양으로 반응할 경우 1차 가교물의 경우 겔 형성이 이루어지지 않을 수 있고, 2차 가교물의 경우 입자 형태의 가교물이 형성되지 않을 우려가 있으며, 상기 범위보다 과량으로 반응할 경우 1차 가교물이 목표로 하는 낮은 점탄성의 겔이 아닌 입자 형태의 가교물이 형성될 우려가 있다.
- [0045] 상기 에탄올 함유 알칼리 수용액은 에탄올을 5 ~ 13 w/w%로 함유하는 알칼리 수용액일 수 있다. 상기 에탄올 농도의 변화에 따라 히알루론산 가교물의 점도를 조절할 수 있으며, 상기 에탄올 농도 범위에서 히알루론산 나트륨이 에탄올에 추출되지 않으면서 안정적으로 혼합되어 가교반응이 가능하다.
- [0046] 상기 알칼리 수용액은 pH 9 ~ 13의 알칼리 수용액일 수 있으며, 히알루론산 가교물의 제조에 사용될 수 있는 것으로 공지된 임의의 알칼리 수용액일 수 있다. 예를 들어, 상기 알칼리 수용액은 수산화나트륨 수용액, 수산화칼륨 수용액, 또는 암모니아수이다. 일 구체예에서, 상기 알칼리 수용액은 수산화나트륨 수용액이다.
- [0047] 일 구체예에서 상기 에탄올 함유 알칼리 수용액은 에탄올을 5 ~ 13 w/w%로 함유하는 0.7 ~ 1.3 w/w% 수산화나트륨 수용액이다.
- [0048] 실험 결과, 알칼리 수용액 중에서 히알루론산을 2 개 이상의 에폭시 작용기를 갖는 에폭시계 가교제와 반응 시, 알칼리 수용액 중에 에탄올 이외의 알코올(예: 메탄올, 이소프로판올)이 함유될 경우에는 히알루론산 겔이 형성되지 않는 것으로 나타났으며, 에탄올이 함유될 경우에는 히알루론산 겔이 형성되는 것으로 나타났으며, 반응시간에 따라 점탄성이 달라지는 것으로 확인되었다. 따라서, 유기용매 중에서도 특히 에탄올을 함유 시 히알루론산 하이드로겔이 형성되는 것으로 확인되었다. 또한, 원하는 점탄성을 갖는 히알루론산 겔을 형성하기 위해 반응시간을 적절히 변경할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0049] 상기 가교반응은 에탄올의 존재 하에서 실온보다 다소 높은 온도범위에서 수행함으로써 빠른 가교반응을 진행할 수 있으며, 빠른 가교반응의 진행에 의해 약한 가교 결합이 유도될 수 있다. 상기 실온보다 다소 높은 반응온도 범위는 약 40 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 일 수 있다.
- [0050] 상기 1차 가교물은 하이드로겔 형태의 히알루론산 가교물이며, 상기 1차 가교물을 재가교한 2차 가교물은 입자 형태의 가교물이다.
- [0051] 실험 결과, 상기 1차 가교물 및 2차 가교물을 조합하여, 원하는 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 획득할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0052] 본 발명은 또 다른 일 양상에 있어서,
- [0053] 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 저점탄성의 히알루론산 가교물; 및
- [0054] 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 고점탄성의 히알루론산 가교물의 조합을 포함하는 복합 히알루론산 가교물을 제공한다.
- [0055] 상기 저점탄성의 히알루론산 가교물 및 상기 고점탄성의 히알루론산 가교물은 특정 가교방법으로 제조된 히알루론산 가교물로 한정되는 것은 아니며, 일 구체예에서 상기 저점탄성의 히알루론산 가교물 및 고점탄성의 히알루론산 가교물은 각각 상기 본 발명의 일 양상에 따른 히알루론산 가교물의 제조방법에 따라 제조된 히알루론산 1차 가교물 및 히알루론산 2차 가교물이다.
- [0056] 상기 복합 히알루론산 가교물은 원하는 점탄성에 따라, 상기 저점탄성의 히알루론산 가교물 및 고점탄성의 히알루론산 가교물의 비율을 조절할 수 있다.
- [0057] 본 발명은 또 다른 일 양상에 있어서,
- [0058] 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 1차 가교물 및
- [0059] 상기 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 2차 가교물의 조합을 포함하는 복합 히알루론산 가교물을 제공한다.
- [0060] 상기 복합 히알루론산 가교물은 원하는 점탄성에 따라, 상기 1차 가교물 및 2차 가교물의 비율을 조절할 수 있다.

- [0061] 본 발명은 또 다른 일 양상에 있어서, 상기 임의의 복합 히알루론산 가교물을 포함하는 생체 적합성 소재를 제공한다.
- [0062] 상기 생체 적합성 소재는 히알루론산이 사용될 수 있는 임의의 생체 적합성 소재일 수 있으며, 예를 들어 관절염 치료용 삽입물, 주름살 치료용 삽입물, 성형용 필러, 및 약물 전달체로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 이러한 생체 적합성 소재는 그 구체적인 용도에 따라 바람직한 점탄성 범위가 달라질 수 있으며, 이러한 원하는 점탄성에 따라 복합 히알루론산 가교물을 구성하는 상기 저점탄성의 히알루론산 가교물 및 고점탄성의 히알루론산 가교물의 혼합비율, 또는 히알루론산 1차 가교물 및 히알루론산 2차 가교물의 혼합비율을 조절할 수 있다.
- [0063] 일 구체예에서, 상기 복합 히알루론산 가교물은 탄성 100 ~ 150 Pa 및 점도 20 ~ 60 Pa인 복합 히알루론산 가교물이며, 인체 관절 보충액으로서 사용하기에 적절한 점탄성 범위를 가진다. 탄성 100 ~ 150 Pa 및 점도 20 ~ 60 Pa은 인체 관절액과 유사한 점탄성 범위인 것으로 공지되어 있다(Balazs, E. A. "The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid." *Disorders of the Knee* 2 (1974): 61-74.). 이러한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 획득하기 위한 상기 저점탄성의 히알루론산 가교물 및 고점탄성의 히알루론산 가교물의 혼합비율, 또는 상기 1차 가교물 및 상기 2차 가교물의 조합 비율은 히알루론산 분자량에 따라 달라질 수 있다.
- [0064] 실험 결과, 고분자량(약 2.5 MDa) 히알루론산 및 저분자량(약 0.9 MDa) 히알루론산에 대해, 각각 가교반응을 수행하여 1차 가교물을 얻은 다음, 재가교반응을 수행하여 2차 가교물을 획득하고, 1차 가교물 및 2차 가교물을 다양한 비율로 조합하여, 복합 히알루론산 가교물을 제조한 다음, 각각의 점탄성을 측정하였다. 그 결과, 출발 물질로서 고분자량 히알루론산을 사용하였는지 저분자량 히알루론산을 사용하였는지에 따라 1차 가교물의 점탄성이 달라졌다. 또한, 분자량에 상관 없이 히알루론산의 1차 가교물에 비해 2차 가교물의 점탄성이 현저히 증가하였고, 1차 가교물 및 2차 가교물의 조합 비에 따라 복합 히알루론산 가교물의 점탄성이 달라지는 것으로 확인되었다 (실험예 2 참조).
- [0065] 또한, 출발물질로서 사용된 히알루론산 원료의 분자량에 따라 원하는 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 획득하기 위한 1차 가교물 및 2차 가교물의 조합비율이 달라지는 것으로 나타났다. 고분자량(약 2.5 MDa) 히알루론산 원료를 출발물질로서 사용할 경우는 1차 가교물 및 2차 가교물을 약 9:1의 중량비로 조합할 경우, 저분자량(약 0.9 MDa) 히알루론산 원료를 출발물질로서 사용할 경우는 1차 가교물 및 2차 가교물을 약 8:2의 중량비로 조합할 경우, 관절염 치료용 삽입물로서 사용하기에 적절한 점탄성 범위(탄성 100 ~ 150 Pa 및 점도 20 ~ 60 Pa)를 갖는 복합 히알루론산 가교물을 획득할 수 있다 (실험예 2 참조).
- [0066] 일 구체예에서, 상기 복합 히알루론산 가교물은 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa인 히알루론산 1차 가교물 및 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa인 히알루론산 2차 가교물을 8:2 내지 9:1의 비율로 포함한다.
- [0067] 일 구체예에서, 상기 복합 히알루론산 가교물은 평균 입자 크기가 약 500 ~ 750 μm 로 입자화된 것이다. 상기 입자화는 상기 1차 가교물 및 2차 가교물을 조합한 다음 통상적인 분쇄과정에 의해 수행할 수 있다.
- [0068] 일 구체예에 따른 복합 히알루론산 가교물의 제조방법을 도 1에 순서도로서 표시하였으며, 이에 따른 제조방법을 설명하면 다음과 같다.
- [0069] 단계 (a)는 하이드로겔 형태의 히알루론산 1차 가교물의 제조 단계이다. 예를 들어, 단계(a)에서 사용되는 히알루론산 나트륨(HA 로 약칭하기도 함)은 한미약품에서 스트렙토코코스 속 미생물 발효에 의해 제조된 것을 사용할 수 있다. (a1) 단계는 히알루론산 나트륨 함유 완충액을 에탄올 함유 수산화나트륨 수용액과 혼합하는 단계이다. 이 단계에서 에탄올과 수산화 나트륨의 혼합 비율에 따라서 생성되는 히알루론산 하이드로겔의 점탄성이 조절될 수 있다. 약 0.7 ~ 1.3 w/w%의 수산화나트륨 수용액에 대해 에탄올 약 5 ~ 13 w/w% 존재 하에서 반응을 수행할 경우, 히알루론산 나트륨이 에탄올에 추출되지 않으면서 안정적으로 혼합되어 가교반응이 가능하다. (a2) 단계에서는 가교제를 혼합하는 공정으로서, 히알루론산 나트륨 g당 10 μl ~ 100 μl 를 첨가하여 진행할 수 있다. 가교제가 상기 범위에 미치지 못할 경우 원하는 점탄성의 히알루론산 가교물이 생성되지 않을 수 있다. (a3) 단계는 에탄올 함유 알칼리 수용액 중에서, 히알루론산 나트륨이 가교제와 반응하는 가교반응 공정이다. 이 단계에서 상온보다 높은 반응온도 및 반응물 중의 에탄올의 존재로 인해 빠른 가교 반응이 진행될 수 있으며, 이로 인해 약한 가교 결합이 유도될 수 있다. 상기 반응은 약 40 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 오븐에서 약 4 ~ 6 시간 동안 진행될 수 있다. 얻어진 하이드로겔 형태의 히알루론산 가교물을 (a4) 단계에서 완충액에서 투석을 진행한 뒤 (a5) 단계에서 증류수로 중성화 반응을 수행할 수 있다. (a6) 단계에서는 약 95% 에탄올로 히알루론산 하이드로

겔의 침전을 유도하여, 히알루론산 가교물을 분말상으로 획득할 수 있다.

- [0070] 단계 (b)는 단계 (a)에서 획득된 히알루론산 1차 가교물을 재가교하여 입자 형태의 히알루론산 2차 가교물 제조 단계이다. (b1)은 단계 (a6)에서 수득한 히알루론산 나트륨 가교물을, 약 0.7 ~ 1.3 w/w%의 수산화 나트륨 수용액에 가하고 혼합하는 단계이다. (b2) 단계는 가교제를 부가하여 혼합하는 단계이다. 이 단계에서는 가교제를 약 10 ~ 100 μl /(a)단계의 수득 HA 1g의 양으로 부가하여 진행할 수 있다. (b3) 단계는 히알루론산 나트륨이 가교제와 반응하는 가교반응 공정이다. 상기 반응은 40 ~ 60°C 오븐에서 약 8 ~ 10 시간 동안 진행될 수 있다. (a3) 단계보다 오랜 시간동안 가교반응을 진행함으로써 입자형태의 히알루론산 가교물의 형성을 유도할 수 있다. 얻어진 입자 형태의 히알루론산 가교물을 (b4) 단계에서 완충액에서 투석을 진행한 뒤 (b5) 단계에서 증류수로 중성화반응을 수행할 수 있다. (b6) 단계에서는 약 95% 에탄올로 히알루론산 입자의 침전을 유도하여, 히알루론산 가교물을 분말상으로 획득할 수 있다.
- [0071] 단계 (c)는 단계 (a)와 단계 (b)에서 수득된 하이드로겔 형태의 히알루론산 나트륨 1차 가교물 및 입자 형태의 히알루론산 나트륨 2차 가교물을 다양한 비율로 혼합한 다음 분쇄/충진/멸균 후 최종물을 제조하는 단계이다. (c1) 단계는 하이드로겔 형태의 히알루론산 나트륨 1차 가교물 및 입자 형태의 히알루론산 나트륨 2차 가교물을 약 9 : 1 내지 약 8 : 2로 혼합하고 완충액에 용해하여 복합 히알루론산 가교물을 제조할 수 있다. (c2) 단계에서는 얻어진 복합 히알루론산 가교물을 분쇄하는 과정을 수행하여 500 ~ 750 μm 로 입자화할 수 있다. 그런 다음, 주사기에 충전하는 단계(c3) 및 주사기에 충전된 복합 히알루론산 가교물을 멸균하는 단계(c4)를 수행함으로써, 원하는 점탄성을 갖는 최종적인 복합 히알루론산 가교물을 완성할 수 있다.
- [0072] 일 구체예에서, 상기 생체 적합성 소재는 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물 및 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 가교물을 조합한, 평균 입자 크기가 약 500 ~ 750 μm 로 입자화된 탄성 100 ~ 150 Pa 및 점도 20 ~ 60 Pa인 관절 보충액이다.
- [0073] 일 구체예에서, 상기 생체 적합성 소재는 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 1차 가교물 및 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 2차 가교물을 조합한, 평균 입자 크기가 약 500 ~ 750 μm 로 입자화된 탄성 100 ~ 150 Pa 및 점도 20 ~ 60 Pa인 관절 보충액이다.
- [0074] 상기 관절 보충액은 인체의 실제 관절액과 유사한 점탄성을 가지므로, 효과적인 관절 보충액으로 사용될 수 있으며, 하이드로겔 형태의 1차 가교물 및 입자 형태의 2차 가교물 모두를 포함하여 관절에 대한 윤활 및 유격 작용 모두를 수행할 수 있으며, 따라서 인체 관절액과 매우 유사한 기능을 수행할 수 있다. 또한, 하이드로겔 형태의 1차 가교물 및 입자 형태의 2차 가교물 모두를 포함하여, 생체내에서 쉽게 분해되지 않고 구조적으로 안정하여 1회 투여로도 약 6 개월 이상 관절 보충액으로서의 효과가 지속 가능한 장점이 있다.
- [0075] 본 발명은 다른 일 양상에 있어서,
- [0076] 상기 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 1차 가교물; 및 상기 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 2차 가교물을 조합하는 단계를 포함하고,
- [0077] 제조하고자 하는 복합 히알루론산 가교물의 점탄성에 따라 상기 조합 비율을 조절하는 것인,
- [0078] 복합 히알루론산 가교물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0079] 상기 방법에 따르면, 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa의 히알루론산 1차 가교물, 및 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 2차 가교물의 조합비율을 조절함으로써 필요로 하는 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 획득할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 탄성 50 ~ 200 Pa 및 점도 20 ~ 100 Pa 히알루론산 1차 가교물 및 탄성 400 ~ 800 Pa 및 점도 40 ~ 100 Pa의 히알루론산 2차 가교물을 9:1 내지 8:2의 중량비로 조합함으로써 관절액과 유사한 점탄성 범위인 탄성 100 ~ 150 Pa 및 점도 20 ~ 60 Pa 의 복합 히알루론산 가교물을 획득할 수 있다. 원하는 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 제조하기 위한, 상기 히알루론산 1차 가교물 및 히알루론산 2차 가교물의 조합 비율은 달라질 수 있으며, 동일한 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 제조 시에도 히알루론산 원료의 분자량 및 1차 가교물과 2차 가교물의 제조 조건(반응온도, 반응시간 등)에 따라 상기 조합 비율이 달라질 수 있다.
- [0080] [실시예]
- [0081] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세히 설명하나, 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐

본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0082] **제조예 1: 유기용매 미함유 알칼리 수용액 중의 HA 가교물 제조**

[0083] 10g 히알루론산 나트륨을 1 w/w% NaOH 수용액에 혼합하였다. 혼합 후, BDDE 50 μ l/히알루론산 나트륨 1g 의 비율로 혼합한 후 40 $^{\circ}$ C 에서 3, 12, 또는 24 시간 동안 반응시켰다.

[0084] **제조예 2: 에탄올 함유 알칼리 수용액 중의 HA 가교물 제조(1)**

[0085] 10g 히알루론산 나트륨을 10 w/w% 에탄올 혼합한 1 w/w% NaOH 수용액에 혼합하였다. 혼합 후, BDDE 50 μ l /히알루론산 나트륨 1g 의 비율로 혼합한 후 40 $^{\circ}$ C 에서 약 3, 5, 12, 또는 24 시간 동안 반응시켰다.

[0086] **제조예 3: 에탄올 함유 알칼리 수용액 중의 HA 가교물 제조(2)**

[0087] 10g 히알루론산 나트륨을 10 w/w% 에탄올 혼합한 1 w/w% NaOH 수용액에 혼합하였다. 혼합 후, EGDGE 50 μ l /히알루론산 나트륨 1g 의 비율로 혼합한 후 40 $^{\circ}$ C 에서 약 24시간 동안 반응하였다.

[0088] **제조예 4: 에탄올 함유 알칼리 수용액 중의 HA 가교물 제조(3)**

[0089] 10g 히알루론산 나트륨을 10 w/w% 에탄올 혼합한 1 w/w% NaOH 수용액에 혼합하였다. 혼합 후, 1,6 헥산디올 디글리시딜에테르 50 μ l /히알루론산 나트륨 1g 의 비율로 혼합한 후 40 $^{\circ}$ C 에서 약 24 시간 동안 반응하였다.

[0090] **제조예 5: 메탄올 함유 알칼리 수용액 중의 HA 가교물 제조**

[0091] 10g 히알루론산 나트륨을 10 w/w% 메탄올 혼합한 1 w/w% NaOH 수용액에 혼합하였다. 혼합 후, BDDE 50 μ l /히알루론산 나트륨 1g 의 비율로 혼합한 후 40 $^{\circ}$ C 에서 약 3, 12, 또는 24 시간 동안 반응시켰다.

[0092] **제조예 6: 이소프로판올 함유 알칼리 수용액 중의 HA 가교물 제조**

[0093] 10g 히알루론산 나트륨을 10 w/w% 프로판올 혼합한 1 w/w%NaOH 수용액에 혼합하였다. 혼합 후, BDDE 50 μ l /히알루론산 나트륨 1g 의 비율로 혼합한 후 40 $^{\circ}$ C 에서 약 3 또는 24 시간 동안 반응시켰다.

[0094] **실험예 1: 제조예 1 내지 6에서 제조된 HA 가교물의 겔 형성 확인 및 점탄성 측정**

[0095] 상기 제조예에서 획득된 HA 가교물의 겔 형성 여부를 육안으로 확인하였으며, 점탄성을 측정하였다. 점탄성은 회전형 레오미터인 Kinexus Pro Rheometer(Malvern, Worcestershire, UK)로 측정하였다. 동적 점탄성 측정을 위하여 지름이 20 mm인 콘(Cone)을 이용하였으며, 콘과 플레이트(Plate) 사이의 측정거리(GAP)은 0.5 mm이며 온도는 25 $^{\circ}$ C 로 분석 종료 전까지 일정하게 유지하였다. 콘트롤 프로그램(control program)으로 주파 진동(frequency oscillation)을 이용하였으며, 주파수의 범위를 0.1 ~ 5Hz 로 설정하여 저장 탄성률(storage modulus, G'), 손실 탄성률(loss modulus, G'') 측정하였다. 저장 탄성률은 시료에 저장된 에너지(탄성 거동)을 의미하고 손실 탄성률은 손실된 에너지(점성 거동)을 의미한다.

[0096] 그 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0097] [표 1]

반응 조건			반응 결과
	유기용매	40 °C 반응시간	겔 형성 여부
제조예 1	미함유	3hr	겔 형성 안됨
		12hr	겔 형성
		24hr	겔 형성
제조예 2	에탄올	3hr	겔 형성 안됨
		5hr	겔 형성
		12hr	겔 형성
		24hr	겔 형성
제조예 3	에탄올	24hr	겔 형성
제조예 4	에탄올	24hr	겔 형성
제조예 5	메탄올	3hr	겔 형성 안됨
		12hr	겔 형성 안됨
		24hr	겔 형성 안됨
제조예 6	이소프로판올	3hr	겔 형성 안됨
		12hr	겔 형성 안됨
		24hr	겔 형성 안됨

[0098]

[0099] [표 2]

반응 조건			반응 결과		
	유기용매	40 °C 반응시간	겔 형성 여부	점탄성 값	
				G'	G''
제조예 1	미함유	3hr	겔 형성 안됨	-	-
		12hr	겔 형성	1789.7	300.8
		24hr	겔 형성	2377.7	369.8
제조예 2	에탄올	3hr	겔 형성 안됨	-	-
		5hr	겔 형성	78.8	29.6
		12hr	겔 형성	379.2	63.3
		24hr	겔 형성	1908.3	356.2

[0100]

[0101] 상기 표 1 및 표 2의 결과에 따르면, 알칼리 수용액 중에 유기용매를 함유하지 않는 제조예 1 및 에탄올을 함유하는 제조예 2 내지 4는 겔이 형성되는 것으로 확인되었다. 24 시간이 경과된 다음에는 히알루론산이 갈변되어 가고 반응을 더 이상 진행할 수 없었다.

[0102] 알칼리 수용액 중에 유기용매를 함유하지 않는 제조예 1에 비해 에탄올을 함유하는 제조예 2의 히알루론산 가교물이 점탄성이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 따라서, 알칼리 수용액 중에 에탄올을 함유시킴으로써 가교반응이 저하되어 점탄성이 낮게 조정된 히알루론산 가교물이 생성되는 것으로 확인되었다.

[0103] 제조예 5 및 6에서는 에탄올 이외의 저급 알코올을 알칼리 수용액 중에 함유시켜 반응시켰으나, 에탄올을 제외한 다른 유기용매 중에서는 오랜 시간 반응시켜도 하이드로겔 형태의 히알루론산 가교물이 생성되지 않는 것으로 확인되었다.

[0104] **실시예 1: 하이드로 겔 형태의 히알루론산 1차 가교물의 제조**

[0105] 고분자 히알루론산 나트륨(분자량 2.5Mda) 및 저분자 히알루론산나트륨(분자량 0.9Mda) 각각에 대해 별도로 실시예 1 내지 3의 제조 공정을 수행하였다. 상기 고분자 히알루론산 나트륨(분자량 2.5Mda) 및 저분자 히알루론산나트륨(분자량 0.9Mda)은 모두 스트렙토코코스 (*Streptococcus zooepidemicus*)의 발효에 의해 생성된 것으로서, 한미약품(주)로부터 입수하였다.

[0106] 10 w/w%의 비율로 에탄올을 함유하는 1 w/w% 수산화 나트륨 수용액에 혼합한 다음, 상기 혼합 용매 중에 히알루론산 나트륨을 가하여 완전히 용해시킨 다음, BDDE를 50 μ l/히알루론산 나트륨 1g의 비율로 가하고 혼합하였다. 상기 혼합이 완료되면 반응온도 약 40℃, 반응시간 약 5시간으로 가교반응을 수행시켰다. 반응이 완료된 하이드로겔 형태의 히알루론산 1차 가교물을 PBS 용액 (Phosphate Buffered saline)에 투석하였다. 투석 후 얻어진 하이드로겔을 BDDE를 제거하기 위해 증류수로 세척함으로써, 중성화 된 하이드로겔을 95% 에탄올 수용액에 추출하여 분말상의 히알루론산 1차 가교물을 수득하였다.

[0107] **실시예 2: 입자 형태의 히알루론산 2차 가교물의 제조**

[0108] 상기 실시예 1에서 수득된 히알루론산 1차 가교물에 2차 가교반응을 수행하였다. 상기 실시예 1에서 얻어진 분말상의 히알루론산 가교물을 1 w/w% 수산화 나트륨 수용액 중에 1:5의 중량비로 혼합하여 완전히 용해시켰다. 얻어진 반응 혼합물에 BDDE를 50 μ l/1차 가교물 1g의 비율로 가하고 혼합하였다. 상기 혼합이 완료되면, 반응온도 40℃로 약 8 시간으로 가교반응을 수행하였다. 반응이 완료된 후 생성된 2차 가교물을 PBS 용액으로 약 12 ~ 24 시간동안 투석을 수행하였다. 투석 후 얻어진 입자의 BDDE를 제거하기 위해 증류수로 세척함으로써 중성화 된 하이드로겔을 95% 에탄올 수용액에 추출하여 분말상의 히알루론산 2차 가교물을 수득하였다.

[0109] **실시예 3: 복합 히알루론산 가교물의 제조**

[0110] 상기 실시예 1에서 수득된 히알루론산 1차 가교물과 실시예 2에서 수득된 히알루론산 2차 가교물을 PBS 용액에 9:1 또는 8:2로 혼합하고 최종 농도는 2 w/w%로 혼합용액을 제조한 다음, 그 혼합용액을 500 μ m Mesh에 물리적 힘을 가하여 통과시켜 분쇄하였다. 분쇄된 혼합물을 주사기(syringe)에 충전한 뒤 약 121℃에서 약 20 분간 멸균하였다.

[0111] **실험예 2: 복합 히알루론산 가교물의 점탄성 측정**

[0112] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 히알루론산 1차 가교물 및 히알루론산 2차 가교물을 PBS 중에 10:0, 9:1, 8:2, 및 0:10의 중량비로 최종 농도가 2 w/w%이 되도록 혼합용액을 제조한 다음, 그 혼합용액을 500 μ m Mesh에 물리적 힘을 가하여 통과시켜 분쇄하였다. 그런 다음, 혼합용액에 대해 회전형 레오미터인 Kinexus Pro Rheometer(Malvern, Worcestershire, UK)을 이용하여 점탄성을 측정하였다.

[0113] 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0114] [표 3]

실험 조건		결과	
히알루론산	혼합비 [1차:2차]	탄성(G') [Pa/2.5Hz]	점성(G'') [Pa/2.5Hz]
2.5Mda 히알루론산	10:0	78.8	29.6
	9:1	114.40	45.19
	8:2	162.30	53.76
	0:10	712.70	88.50
0.9Mda 히알루론산	10:0	55.35	28.50
	9:1	70.38	34.94
	8:2	106.10	45.71
	0:10	435.50	48.43

[0115]

[0116] 상기 표 3의 결과에 따르면, 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합 비율에 따라 복합 히알루론산 가교물은 서로 다른 점탄성 값을 나타내었다.

[0117] 고분자 히알루론산의 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합비율을 9:1로 한 복합 히알루론산 가교물이 탄성 114.40 Pa, 점성 45.19 Pa를 나타냈고, 저분자 히알루론산의 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합비율을 8:2로 한 복합 히알루론산 가교물이 탄성 106.1 Pa, 점성 45.71 Pa를 나타내어, 인체의 관절액과 유사한 점탄성을 갖는 것으로 확인 되었다.

[0118] 또한, 원료 히알루론산의 분자량에 따라 동일한 조건에서 생성된 가교물의 점탄성이 달라지는 것으로 나타났으며, 원료 히알루론산의 분자량이 높을수록 동일한 가교 조건에서 점탄성이 더 높게 나타났다. 따라서, 원료 히알루론산의 분자량에 따라, 원하는 점탄성을 갖는 복합 히알루론산 가교물을 제조하기 위한 히알루론산의 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합비율이 달라짐을 알 수 있다.

[0119] **실험예 3: 복합 히알루론산 가교물의 입도 분석**

[0120] 상기 실험예 2에서 인체 관절액과 유사한 점탄성을 갖는 것으로 확인된, 고분자량 히알루론산의 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합비율을 9:1로 제조한 복합 히알루론산 가교물에 대해, 입도분석기(Microtrac, Montgomeryville, PA)를 이용하여 입도를 측정하였다.

[0121] 그 결과를 도 2에 입도 분포 그래프로서 나타내었다.

[0122] 도 2의 결과에 따르면, 평균 입자의 크기는 약 606um (D₁₀: 235.8um, D₅₀: 553.5um, D₉₀: 1009um)인 것으로 확인 되었다.

[0123] **실험예 4: 세포 독성 평가**

[0124] 상기 실험예 2에서 인체 관절액과 유사한 점탄성을 갖는 것으로 확인된, 고분자량 히알루론산의 1차 가교물 및 2차 가교물의 혼합비율을 9:1로 제조한 복합 히알루론산 가교물의 독성을 평가하기 위해, MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium) 분석을 수행하였다.

[0125] MTT 평가는 상기 복합 히알루론산 가교물로부터 72 시간 동안 방출되어 나오는 용출물에 대한 독성 평가를 진행 하였다. 양성 대조군으로서 Teflon, 음성대조군으로서 Latex에서 방출되어 나오는 용출물에 대한 독성 평가를 함께 수행하였다. MTT 분석 결과 얻어진 세포 생존율 결과를 도 3에 그래프로서 나타내었다.

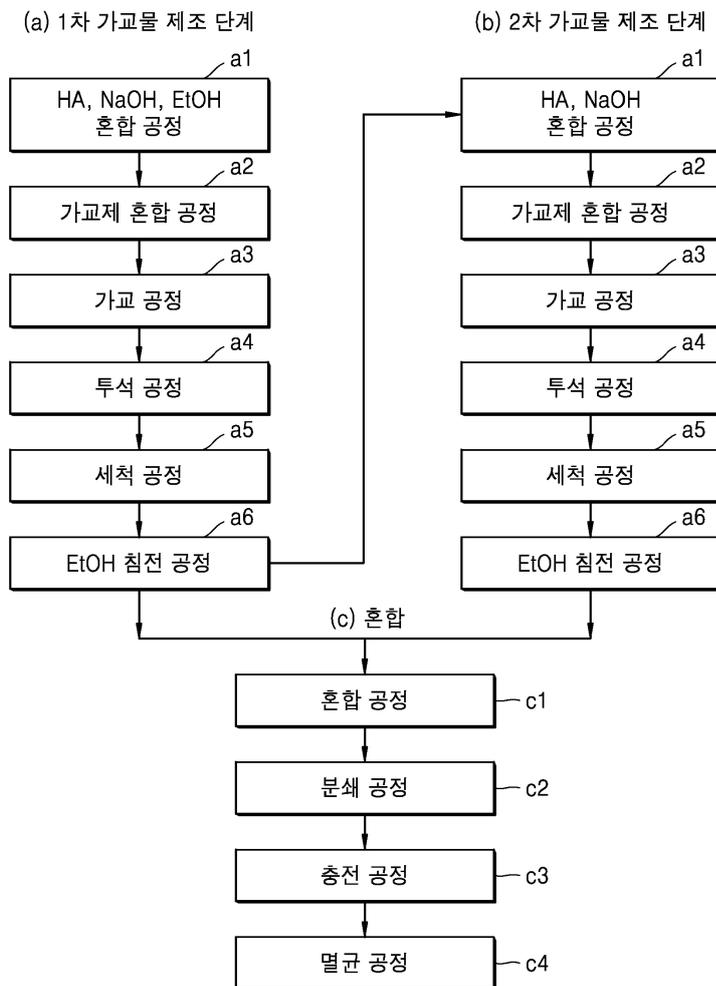
[0126] 도 3의 결과에 따르면, 세포 생존율이 Teflon은 100% 이며 Latex는 37% 를 나타내었다. 이에 반해, 복합 히알루론산 가교물은 세포 생존율이 89.93%로 나타나 세포 독성의 하한선인 80% 이상을 나타내었다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 복합 히알루론산 가교물은 세포 독성이 없으며 생체 적합성이 높은 것으로 확인되었다.

[0127]

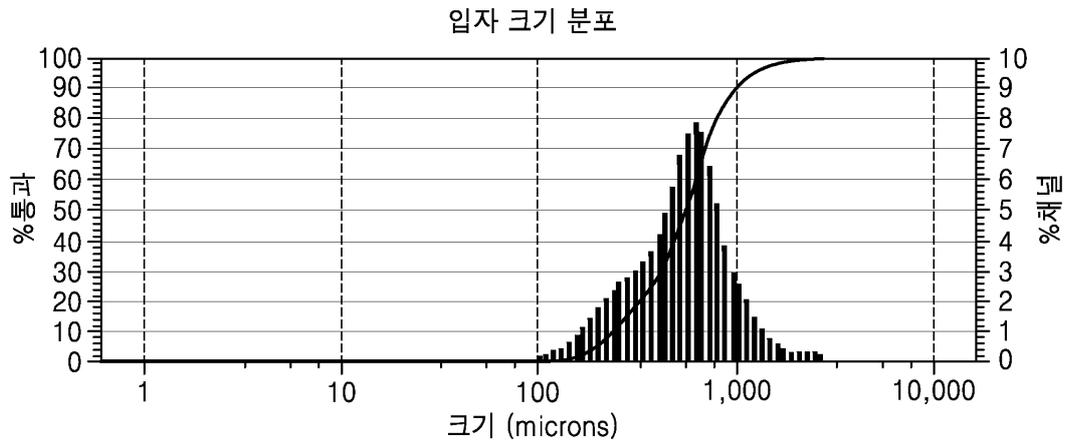
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 상기 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

