

오오시마가즈히로
일본도쿄도마찌다시아사히마찌3쵸메5방1고텐끼가가꾸고교가부시키가
이사쥬오겐쥬쇼나이

야마모또오사부
일본도쿄도마찌다시아사히마찌3쵸메5방1고텐끼가가꾸고교가부시키가
이사쥬오겐쥬쇼나이

미요시테루조
일본도쿄도마찌다시아사히마찌3쵸메5방1고텐끼가가꾸고교가부시키가
이사쥬오겐쥬쇼나이

기따가와히로노신
일본도쿄도마찌다시아사히마찌3쵸메5방1고텐끼가가꾸고교가부시키가
이사쥬오겐쥬쇼나이

우메다도시히코
일본도쿄도마찌다시아사히마찌3쵸메5방1고텐끼가가꾸고교가부시키가
이사쥬오겐쥬쇼나이

가네코히로시
일본도쿄도마찌다시아사히마찌3쵸메5방1고텐끼가가꾸고교가부시키가
이사쥬오겐쥬쇼나이

아라이가즈히코
일본니이가따켄나까칸바라군가메다마찌요쥬고야3-1호유팔레스니이가
따가메다605

(74) 대리인 특허법인코리아나

심사관 : 강진관

(54) 히알루론산 겔, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 의용재료

요약

히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 공존시키고, 상기 공존상태를 유지함으로써 히알루론산 겔을 형성한다.

대표도

도 1

색인어

히알루론산, 관절증, 색전형성제, 연골조직 주입제, 대용 유리체

명세서

기술분야

본 발명은 신규의 투명성을 갖는 히알루론산 겔 및 이의 제조방법에 관한 것이며, 또한 생체적합성이 양호한 의용(醫用)재료에 관한 것이다.

배경기술

히알루론산은, β -D-N-아세틸글루코사민과 β -D-글루쿠론산이 교대로 결합된 직쇄상의 고분자 다당이다. 히알루론산은 포유동물의 결합조직에 분포되는 것 외에, 계관(cockscomb), 연쇄구균의 협막 등에도 존재하는 것이 알려져 있다. 계관, 탯줄 등이 추출재료로 사용되고 있는 것 외에, 연쇄구균의 배양물로부터도 정제물이 조제되고 있다.

천연 히알루론산은 분자량에 대하여 다분(polydisperse) 산성이지만, 종류 및 장기특이성을 갖지 않아, 생체에 이식 또는 주입한 경우에도 우수한 생체적합성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나, 생체에 히알루론산의 용액을 적용하는 경우에, 생체내 체류시간이 비교적 짧은 점에서, 그의 용도를 의용재료로 확장하기 위해서, 히알루론산을 다종다양한 화학수식제(chemical modifier)로 가교하여 체류성을 향상시키는 것이 시도되어 왔다.

(I) 관절에 대하여 살펴 보면, 관절액은 생체관절에 있어서 관절연골로 영양을 공급함과 동시에, 달리 유체를 찾아볼 수 없는 우수한 윤활기능과 쇼크업소버(shock absorber) 기능을 갖고 있다. 그의 우수한 점탄성기능은 관절액의 주성분 중 하나인 히알루론산에 크게 지배되는 것으로 밝혀져 있다.

일반적으로, 변형성 관절증, 만성관절 류머티즘 등의 각종 관절증 환자의 관절액 중의 히알루론산 농도 및 분자량의 분석 결과로부터, 정상 관절액에 비교하여, 농도 및 분자량의 저하경향이 관찰되고 있어, 이것이 관절액의 윤활작용, 관절연골 표면보호작용의 저하에 기인하는 운동기능장애 또는 동통증상의 발생 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되고 있다.

이들 관절환자 중 변형성 무릎 관절증에 유효한 수단으로서, 최근 고분자량 히알루론산 용액을 질환관절부위에 주입하는 방법이 널리 채용되고 있고 (Artz : 생화학공업 제, 평균분자량 90만; Hyalgan : Fidia 제조, 평균분자량 <50만), 여기에 사용되고 있는 고순도로 정제된 히알루론산은 계관 유래이다.

이와 같은 계관 유래의 히알루론산은 원래 생체에 존재하는 물질이기 때문에 매우 안전한데다, 또한 유효한 치료효과가 얻어지고는 있지만, 통상적으로는 효과를 얻기 위해서, 수회~10회의 빈번한 회수 투여를 필요로 한다.

이와 같은 분자량 100만 이하의 히알루론산을 사용한 토끼 무릎 관절강 투여 후의 관절강 내에서의 저류성 시험(persistency test)에서는, 1일~3일에 관절강에서 소실되는 결과로 되고 있는 점에서도 빈번한 회수의 투여 필요성을 추측할 수 있다 [블래드 · 코어클레이션 · 앤드 · 피브리놀리시스, Blood Coagulation and Fibrinolysis, vol2, 173, 1991].

또한, 생체 내에 존재하는 히알루론산의 분자량은 본래 수백만~1천만이나 되는 것으로 알려져 있어, 생체 내에 보다 가까운 고분자량 히알루론산의 더 한층의 효과를 기대할 수 있다는 인식하에서, 화학가교제를 처리함으로써 유도된 가교 히알루론산이 무릎 관절 치료제로서 개발되고 있다 [Hylan : Biomatrix제].

상기 가교 히알루론산은 상기 토끼 관절강 투여에 의한 저류성시험에서는 20일~30일의 장기간 저류하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 3회 투여로 충분한 효과를 얻을 수 있다는 임상시험결과도 얻어지고 있어, 현재, 관절증 치료제로 실용되고 있다 [저널 · 오브 · 류머톨로지 (Journal of Rheumatology vol.20,16,1993)].

(II) 다음에 색전(塞栓)에 대하여 예를 들면, 색전 형성에 의한 치료는, 맥관성질환, 동맥류 및 정맥류의 기형과 같은 각종 질환을 치료하는데 유효한 것으로 알려져 있다. 또 동맥이 종양에 영양을 공급하는 유로를 폐쇄함으로써 종양을 치료하는데도 유효하다.

색전 형성법(embolization)을 실시하는 일부 방법이 제안되어 있다. 예컨대, 일단에 벌룬(balloon)을 장착한 카테터를 사용하는 벌룬 색전 형성법이 개발되어 있다 (W. Taki 외, Surg. Neurol, Vol. 12, 363, 1979). 그 외에 2-히드록시에틸메타크릴레이트 (HEMA) 모노머를 중합촉매와 함께 카테터를 통하여 벌룬에 도입하는 방법도 알려져 있다 (W. Taki 외, Surg. Neurol, Vol. 13, 140, 1980).

암의 동맥 색전 요법으로서, 시스플라틴 함유 키틴 (타하라 외, 암과 화학요법, 21권, 13호, 2225면, 1994년), 시스플라틴 담지 폴리(벤질1-글루타메이트)미크로스페어 (Li C 외, Parm. Res., Vol.11(12), 1792, 1994), SMANCS 와 리피오돌 현탁액에 색전재로서 젤라틴 스폰지 (나카무라 외, 암과 화학요법, 22권, 11호, 1390면, 1996년) 를 사용한 예 등이 보고되어 있다. 또 화학요법제의 지속주입과 조합하는데에 적합한 화학 색전 요법재로서 폴리(DL-락트산)미크로스페어의 보고도 있고 (Flandroy P 외, J Control Release, Vol. 44(2/3), 153, 1997), 본 요법의 반복실시에는 며칠 동안 생분해할 필요성이 기재되어 있다.

별론 색전 형성법은, 별론이 오므라들기 때문에 폐색기간이 짧아 충분한 효과를 얻기 어려운 것, HEMA와 같은 모노머를 중합하는 방법에서는, 중합이 카테터 내에서 일어날 가능성이 있는 것 등 문제도 많다. 또 화학 색전 요법에 사용되는 색전재는, 대부분이 합성재료로, 생분해성이 부족하고, 생체적합성의 면에서 불안감이 남는다. 폴리(DL-락트산) 미크로스페어에 대해서도, 반복 투여를 고려하면, 생분해성만으로 안전성이 완전히 보증되는 것도 아니다.

히알루론산은 우수한 생체적합성을 갖는 점에서 안전성에는 문제가 없지만, 히알루론산 용액을 투여한 것만으로는 색전은 형성되지 않고, 또 국부에서의 체류성 및 저류성의 향상이 요망되었다.

(III) 연질 조직에 대하여 고려해 보면, 연질조직의 수복(repair) 또는 팽창(swell)을 위해 여러 재료를 주입하려는 노력은 피하주사바늘의 발명 후 급속하게 진전되어 왔다. 많은 물질이 연질조직이나 피부의 교정을 위해 인체에 주입되어 왔다. 이 중에서 액상 실리콘의 주입이 널리 실행되어 왔는데, 이의 장기적 잔류에 의한 피부 궤양과 같은 부작용 때문에, 최근에는 별로 사용되지 않게 되었다. 또 콜라겐의 주입이 실시되어 왔다. 사용되는 콜라겐으로는, 가교제로 화학가교된 것, 섬유상의 콜라겐 등 다양하다. 가교된 고체 콜라겐의 주입에는 절개수술이 필요하고, 정형성(plasticity)이나 유연성에서도 문제가 있다. 미국특허 3949073호에 섬유상으로 정형된 콜라겐에 대하여 기재되어 있다.

그러나, 이의 액상성분은 흡수되기 때문에 체적감소가 있어, 보충이 필요하게 된다. 또 주입가능한 이와 같은 타입의 콜라겐은, 면역물질과 같은 오염물질의 제거가 어렵고, 고가이며, 여러 물질도 최적이라고는 할 수 없다.

히알루론산을 연질조직 주입제로 사용하는 시도도 이루어지고 있다 (Ann. Plast. Surg., Vol.38, 308, 1997). 히알루론산의 용액을 사용하면, 체내에서의 흡수가 빠르기 때문에, 연질조직 내에서의 체류성, 저류성의 향상을 위해, 히알루론산을 화학적으로 가교하는 것이 다양하게 시도되고 있다 (미국특허 제4582865호 명세서, 일본 특허공보 평6-37575호, 일본 공개특허공보 평7-97401호, 일본 공개특허공보 소60-130601 호).

그리고, 예컨대 하이란B 겔은, 필라폼 (Hylaform) 으로서 유럽에서 시판되고 있다 (The Chemistry Biology and Medical Application of Hyaluronan and its Derivatives Vol.72,p278, PORTLAND PRESS).

(IV) 다음으로, 안구 후부, 특히 유리체와 접하는 망막에 대하여 고려하면, 망막은 안내 공간의 후부 경계를 형성하고, 수정체 및 모양체는 전부 경계를 형성하고 있다. 망막은 2층으로 이루어지고, 유리체액에 직접 접촉하고 있는 수용기층(receptor layer)은 감광성 세포를 갖고, 맥락막에 인접하는 층은 색소 상피세포로 이루어진다. 수용기층에 유체가 침입하면, 망막의 두 층이 분리되어 망막박리가 발생한다.

망막박리의 치료는, 예컨대 광응고, 냉동응고 등에 의해 박리망막을 색소 상피층 및 맥락막과 접촉시키는 방법으로 망막을 폐쇄한다. 접촉시킬 때에는 내향 버클(buckle)을 외측으로부터 망막 및 맥락막에 밀어붙이거나, 유리체액의 용량을 높이는 물질을 주입하여, 유리체액에 의해 망막에 압력을 가하는 방법이 이용된다.

후자의 경우, 충분히 재흡수되지 않는 출혈이 일어난 후, 또는 망막박리에 병발하는 막의 내방향으로의 성장 후에서와 같은 유리체액을 완전히 또는 부분적인 수술로 제거할 필요가 있는 증례(症例)에 대하여 대용 유리체(artificial vitreous body)로서 여러 물질이 시도되어 왔다.

이와 같은 대용 유리체는, 안구의 형태를 유지하고, 어느 정도의 기간 동안 유리체강 내에서 망막을 색소 상피에 밀어붙이면서 망막을 복위시키는 것을 목적으로 한다.

대용 유리체로는, 생리식염수, 글리세린, 동물 유리체, 공기, 각종 가스, 폴리비닐알코올, 콜라겐 겔, 실리콘오일, 히알루론산 및 퍼플루오로카본 등을 들 수 있는데, 현재 범용되고 있는 것으로는 공기, 육불화황(sulfur hexafluoride) 등의 가스, 실리콘오일, 퍼플루오로옥탄이나 퍼플루오로데카린 등의 퍼플루오로카본액이 있다.

대용 유리체로 사용되는 각종 가스는 팽창성 가스로, 그대로 또는 공기와 혼합하여 사용되고, 이의 유용성에 대해서도 확립되어 있다 [American Journal of Opht 히알루론산 Imology, Vol.98,180,1984].

그러나, 가스 팽창에 의한 안압 상승이나 동공 블록 등의 합병증, 또 각막 내피로의 접촉에 의한 각막 혼탁 등이 일어나는 경우가 있고, 또한 수술 후의 환자는 약간 머리를 구부린 자세를 장기간 동안 취할 필요가 있기 때문에, 환자의 부담도 크다.

실리콘오일은, 거의 흡수되지 않는 점을 이용하여 가스보다도 더욱 장기간 동안 안내 공간을 유지하여, 망막의 부착을 촉진시키는 유효한 물질이지만 [Retina, Vol. 7,180,1987], 망막의 압착 효과를 얻은 후에 제거하는 것을 전제로 하여 사용된다. 또 백내장, 녹내장이나 안조직에 대한 독성작용 등의 중대한 문제를 안고 있는 것으로 알려져 있다 [안과, Vol.27,1081,1985].

퍼플루오로카본액을 대용 유리체로 사용한 경우에는, 증식성 유리체 망막증, 백내장 및 저안압 등의 합병증이 보이고, 실리콘오일 또는 가스 이상의 안전성 및 유효성에 의문이 남아 있는 것으로 되어 있다 [새로운 안과, Vol.12,1053,1995].

히알루론산은 Balazs [Mod. Probl. Opht히알루론산 Imol.,Vol.10,3, 1972] 가 안과영역에서의 적용을 보고한 이래 많은 검토가 이루어져, 현재에는 안과수술, 특히 안내렌즈 삽입 후에 범용되고 있다.

히알루론산은 통상 생체에 존재하는 물질로, 독성 또는 면역반응이 일어날 가능성은 없다. 그러나, 유리체강 내에 주입되면, 분해되지 않고 방수에 용해되어 전방, 우각 선유주망을 통하여 안외로 배출되고, 안내 공간 유지효과의 지속시간은 심한 망막박리의 증례의 치료에 불충분하다.

히알루론산을 사용한 유리체 주입물에는, 예컨대 일본 공개특허공보 평5-184663호에 기재되어 있는 바와 같이 분자량 90만 이상, 바람직하게는 160만~200만의 히알루론산을 1.5질량% 이상, 바람직하게는 2~2.5질량%를 함유하는 것이 있지만, 안내 공간에서의 저류성이 나쁘고 [일본안과기요, Vol. 38,927, 1987)], 또 1.5질량%를 초과하는 이들 분자량의 히알루론산 용액을 유리체 내에 주입하는 것은, 실린지에 대한 하중이 커져 실용적이라고는 할 수 없다.

이상의 예와 같이 히알루론산의 생체 내 저류성을 향상시키는 것이 여러 용도에 필요하게 되어, 히알루론산을 다종다양한 화학수식체로 가교하는 것이 실시되어 왔다 (미국특허 제4582865호 명세서, 일본 공개특허공보 소60-130601호, 일본 공개특허공보 소63-281660호, 일본 특허공보 평6-37575호, 일본 특허공보 평6-69481호, 일본 공개특허공보 평7-97401호, 일본 공개특허공보 평9-59303호). 또 광가교성 히알루론산 유도체에 자외선을 조사함으로써 제조된 광가교성 히알루론산 겔이 알려져 있다 (일본 공개특허공보 평8-143604호).

그러나, 이와 같은 가교 히알루론산은 이제는 본질적으로 히알루론산 그 자체가 아니라, 가교제를 제거하기 위한 조작 및 가교제의 잔류를 완전히 부정하는 것이 어려운 것도 고려하면, 생체 내에 적용되는 물질에 요망되는 특성 중 무독성, 무항원성을 무조건 보증할 수는 없다.

본 발명자들은 가교제 등을 사용하지 않고 히알루론산 단독으로 이루어지는 난수용성 히알루론산 겔을 간편한 방법으로 제조하는 것을 처음으로 발견하였다 (PCT/JP98/03536호). 그러나, 이들은 시트상, 필름상, 파쇄상, 스폰지상 또는 괴상 등으로, 모두 투명성을 갖고 있지 않았다.

따라서, 난(難)수용성이고 또한 투명성을 갖는 히알루론산을 함유하는 재료가 여러 의료용도에서 유용한 것을 보고, 예의 검토하였다.

히알루론산 자체가 본래 갖고 있는 우수한 생체적합성의 특징을 최대한 살리기 위해서는, 화학적 가교제나 화학수식체를 사용하지 않은 난수용성의 투명성을 갖는 히알루론산 겔이 요망되지만, 이들은 아직 개발되어 있지 않았다.

한편, 안과영역, 특히 대용 유리체로서의 히알루론산 겔의 사용에 대해서는, 효과면에서 투명한 것이 필요하다. 그리고, 굴절율이 유리체의 굴절율 (1.3345~1.3348 ; 안과진료 플랙티스, Vol.22, p234, 1996, 분꼬오도, 도쿄) 에 가까운 것일수록 바람직하다. 그러나, 이들의 성능을 만족하는 히알루론산 겔은 개발되어 있지 않았다.

본 발명자들은 가교제 등을 사용하지 않고, 히알루론산 단독으로 형성되는 난수용성 히알루론산 겔 그 자체에 투명성을 부가할 수 있으면, 히알루론산 겔의 용도가 더욱 확대될 것으로 보고, 이점에 관해 예의 검토한 결과, 히알루론산과, 히알루

론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰(equimolar) 이상의 산성분을 공존시키고, 상기 공존상태를 유지함으로써 히알루론산 겔이 형성되는 것, 또 본 발명에서 얻어지는 히알루론산 겔은 투명성을 갖는 특징이 있는 것을 발견하였다.

발명의 상세한 설명

즉, 본 발명은 (1) 히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 공존시키고, 상기 공존상태를 유지함으로써 히알루론산 겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법, (2) 히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분의 공존하에서, 상기 공존상태를 -10℃~30℃로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 (1)에 기재된 히알루론산 겔의 제조방법, (3) 히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 공존시키고, 상기 공존상태를 -10℃~30℃로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법, (4) 히알루론산 농도가 5질량% 이상인 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 함유하는 히알루론산 산성 수용액을 -10℃~30℃로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법, (5) 히알루론산과, 상기 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 함유하는 산성 수용액을, 산성 수용액에 대하여 히알루론산을 5질량% 이상으로 혼합한 히알루론산 산성 혼합물을 -10℃~30℃로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법, (6) 히알루론산에, 상기 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 함유하는 산성 수용액을 히알루론산 농도가 5질량% 이상이 되도록 함침시키고, -10℃~30℃로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법, (7) 중성 수용액에 난용성이고 투명성을 갖는 것을 특징으로 하는 히알루론산 단독으로 형성된 히알루론산 겔, (8) 중성의 25℃ 수용액 중에서 1일 용해율이 50% 이하인 것을 특징으로 하는 (7)에 기재된 히알루론산 겔, (9) 히알루론산의 측진 산가수분해 조건하에서 히알루론산 겔을 처리함으로써 가용화된 히알루론산이 분기구조를 갖고, 상기 가용화된 히알루론산 중에, 분기도(branching degree)가 0.5 이상인 분자량 프랙션(fraction)을 부분적으로 함유하는 것을 특징으로 하는 청구항 7에 기재된 히알루론산 겔, (10) 중성의 25℃ 수용액 중에서 1일 용해율이 50% 이하이고, 투명성을 갖는 히알루론산 단독으로 형성된 히알루론산 겔을 함유하는 의용재료, (11) 다음의 요건을 만족하는 히알루론산 단독으로 형성된 투명성을 갖는 겔을 함유하는 의용재료:

히알루론산의 측진 산가수분해 조건하에서 히알루론산 겔을 처리함으로써, 가용화된 히알루론산이 분기구조를 갖고, 상기 가용화된 히알루론산 중에 분기도가 0.5 이상인 분자량 프랙션을 부분적으로 함유함,

(12) 중성의 25℃ 수용액 중에서 1일 용해율이 50% 이하이고, 히알루론산의 측진 산가수분해 조건하에서 히알루론산 겔을 처리함으로써 가용화된 히알루론산이 분기구조를 갖고, 상기 가용화된 히알루론산 중에 분기도가 0.5 이상인 분자량 프랙션을 부분적으로 함유하는 투명성을 갖는 히알루론산 겔과, 겔화되어 있지 않은 히알루론산을 함유하는 의용재료,

(13) 투명성을 갖는 겔이 파쇄상인 (10)~(12) 중 어느 한 항에 기재된 의용재료, (14) 의용재료가 관절증 치료용 주입제인 것을 특징으로 하는 (10)~(13) 중 어느 한 항에 기재된 의용재료, (15) 의용재료가 색전형성제인 것을 특징으로 하는 (10)~(13) 중 어느 한 항에 기재된 의용재료, (16) 의용재료가 연질조직 주입제인 것을 특징으로 하는 (10)~(13) 중 어느 한 항에 기재된 의용재료, (17) 의용재료가 대용 유리체인 것을 특징으로 하는 (10)~(13) 중 어느 한 항에 기재된 의용재료이다.

본 발명에 의하면, 히알루론산 단독으로 형성된 난수용성이고 투명성을 갖는 히알루론산 겔을 제공할 수 있다. 이와 같은 본 발명의 히알루론산 겔은, 가교제 등을 사용하지 않기 때문에, 생체 내에 존재하는 본래의 히알루론산의 구조를 유지하고 있고, 안전성 및 생체적합성이 우수한 것으로, 관절증 치료용 주입제, 색전형성제, 연질조직 주입제, 대용 유리체 등의 의용재료로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 실시예 10 과 비교예 3 의 GPC 크로마토그램과 각 프랙션의 분자량을 대비한 그래프이다.

도 2 는 비교예 3 을 직쇄상 히알루론산으로 하여 계산한 실시예 10 의 분기도와 분자량의 관계를 나타낸 그래프이다.

실시예

발명을 실시하기 위한 최선의 형태

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명에 사용되는 히알루론산은, 동물조직에서 추출한 것이나, 또 발효법으로 제조한 것이나, 그 기원에 상관없이 사용할 수 있다.

발효법에 사용하는 균주는 자연계로부터 분리되는 스트렙토코커스속 등의 히알루론산 생산능을 갖는 미생물, 또는 일본 공개특허공보 소 63-123392호에 기재된 스트렙토코커스·에쿠이FM-100 (미공연균기(微工研菌奇) 제9027호), 일본 공개특허공보 평2-234689호에 기재된 스트렙토코커스·에쿠이FM-300 (미공연균기 제2319호) 와 같은 고수율로 안정적으로 히알루론산을 생산하는 변이주가 바람직하다. 상기의 변이주를 사용하여 배양, 정제된 것이 사용된다.

본 발명에 사용되는 히알루론산의 분자량은, 약 1×10^5 ~ 약 1×10^7 Da의 범위 내인 것이 바람직하다. 또 상기 범위 내의 분자량을 갖는 것이면, 보다 고분자량인 것부터 가수분해처리 등을 하여 얻은 저분자량인 것까지도 동일하게 바람직하게 사용할 수 있다.

또한, 본 발명에서 말하는 히알루론산은, 이의 알칼리금속염, 예컨대 나트륨, 칼륨, 리튬의 염도 포함하는 개념으로 사용된다.

본 발명에서 말하는 히알루론산 단독으로 형성된 겔이란, 히알루론산 이외에 화학적 가교제나 화학적 수식제 등은 사용하지 않은 것, 또 양이온성의 고분자와 복합체화하지 않음으로써 겔을 형성시키는 것으로, 자기 가교한 겔을 의미하는 것이다.

한편, 히알루론산으로의 가교구조의 도입이나 히알루론산의 불용화 또는 난용화에 직접 관계하지 않는 물질을, 본 발명에서 말하는 히알루론산 겔을 형성시킬 때에 첨가할 수는 있다.

또 히알루론산 겔을 형성시킬 때에, 약학적 또는 생리학적으로 활성인 물질을 첨가하여, 이들을 함유하는 히알루론산 겔을 형성시킬 수도 있는 것으로, 어떠한 제한도 받지 않는다.

본 발명에서 말하는 히알루론산 겔이란, 중성 수용액에 난용성인 것을 특징으로 한다.

여기에서 난용성이란, 중성 수용액에 의한 25℃에서의 용해성을 측정한 경우, 12시간에서의 용해율이 50% 이하, 바람직하게는 30% 이하이고, 더욱 바람직하게는 10% 이하인 것을 말한다.

본 발명에서 말하는 히알루론산 겔이란, 3차원 그물코 구조를 갖는 고분자 및 이의 팽윤체이다. 3차원 그물코 구조는 히알루론산의 가교구조에 의해 형성되어 있다.

본 발명에서 말하는 히알루론산 겔은, 히알루론산의 촉진 산가수분해반응 조건하에서 히알루론산 겔을 처리함으로써 분해, 가용화할 수 있다. 가용화된 히알루론산이 가교구조를 유지하고 있는 경우, 분기점을 갖는 히알루론산으로서 고분자 용액론적으로 직쇄상의 히알루론산과 구별할 수 있다.

본 발명에서 말하는 히알루론산의 촉진 산가수분해반응 조건으로는, 수용액의 pH1.5, 온도 60℃가 적당하다. 히알루론산의 글리코시드 결합의 가수분해에 의한 주쇄절단반응이, 중성의 수용액 중과 비교하여, 산성이나 알칼리성의 수용액중에서 현저하게 촉진된다. 또한, 산가수분해반응은 반응온도가 높은 편이 더욱 촉진된다.

본 발명에서는 GPC-MALLS법을 이용하여, GPC로 분리된 분자량 프랙션의 분자량과 분기도를 온라인으로 연속적으로 측정하였다. 본 발명에서는 동일 용출 체적의 프랙션의 가용화된 히알루론산 분자량과 대조가 되는 직쇄상 히알루론산의 분자량을 비교하여 분기도를 계산하는 용출체적법을 이용하여, 분기도의 측정을 실시하였다. 분기도는 가용화된 히알루론산의 고분자쇄 1개당 존재하는 분기점의 수로, 가용화된 히알루론산의 분자량에 대하여 플롯된다. 상기 GPC-MALLS법을 이용한 용출체적법에 의한 분기도측정에 대해서는 PCT/JP98/03536에 서술되어 있다.

가용화된 히알루론산은, GPC용매 (0.2mol/l 질산나트륨용액) 로 희석하여 농도를 조제하고, 0.2 μ m의 멤브레인 필터로 여과한 후 측정에 사용하였다.

본 발명에서 말하는 히알루론산 겔 중에, 히알루론산의 축진 산가수분해 조건하에서도 안정적으로 존재하는 가교구조가 있는 경우, 가용화된 히알루론산에 분기구조가 고분자용액론적으로 확인된다. 본 발명에서 말하는 히알루론산 겔의 분기도는 0.5 이상이다.

또 본 발명에서 말하는 투명성을 갖는다는 것은, 본 발명의 히알루론산 겔을 층길이 10mm의 분광광도계용 셀에 넣고, 340nm~800nm 범위의 가시광에 대한 투과율을, 물의 투과율을 100%로 하여 측정한 경우, 투과율이 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상인 것을 말한다.

다음에 본 발명의 투명한 히알루론산 겔은, 히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 공존시키고, 상기 공존상태를 동결시키지 않고 유지함으로써 얻어진다.

본 발명의 산성으로 조제하기 위해 사용하는 산성분의 양은, 히알루론산염의 대이온 (counterion) 의 종류, 히알루론산의 분자량, 히알루론산 농도 및 생성되는 겔의 강도 등 여러 특성에 의해 적절히 결정되지만, 일반적으로는 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분의 양이 바람직하다.

산성분은 히알루론산보다 강한 산이라면 어느 산이나 사용할 수 있다. 산의 사용량을 저감하기 위해서는, 바람직하게는 강산, 예컨대 염산, 질산, 황산 등을 사용하는 것이 바람직하다.

또한, 히알루론산 농도가 5질량% 이하인 경우, 가령 히알루론산의 카르복실기가 충분한 비율로 프로톤화되도록 조제되어도, 히알루론산 겔은 얻을 수 없다.

본 발명은 히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물, 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 공존시킨 후에, 겔화를 진행시키기 위해 그 상태를 유지하는 것이 필요하다. 또 상기 유지는, 정치하여 일정시간 경과시켜도 상관없다.

또한, 이와 같이 유지하는 온도나 시간은, 히알루론산염의 대이온 (counterion)의 종류, 히알루론산의 분자량, 히알루론산 농도, 및 생성되는 겔의 강도 등의 여러 특성에 의해 적절히 결정되지만, 온도에 대해서는 수분이 동결되지 않고, 그리고 히알루론산의 산에 의한 분해를 억제하기 위해, -10 $^{\circ}$ C 이상 30 $^{\circ}$ C 이하에서 실시하는 것이 바람직하다.

히알루론산 산성 수용액이 동결되면, 불투명한 히알루론산 겔이 얻어진다.

본 발명에 사용되는 히알루론산 농도가 5질량% 이상인 히알루론산 산성 수용액의 조제방법은 한정되지 않지만, 히알루론산과 산성 수용액을 혼합하는 방법, 히알루론산에 산성 수용액을 함침하는 방법, 저농도로 조제한 히알루론산 산성 수용액을 소정 농도로 농축하는 방법이나, 고농도의 히알루론산 수용액에 산성분을 첨가하는 방법 등을 들 수 있다.

본 발명에 사용되는 히알루론산의 형태는 한정되지 않지만, 분말, 히알루론산 분말을 가압성형하여 얻어지는 블록상의 성형물, 히알루론산을 증류수에 용해하여 수용액으로 한 후, 통풍건조시켜 얻어지는 캐스트 필름이나 동결건조 후에 얻어지는 스폰지상 히알루론산 등의 형태를 들 수 있다. 히알루론산과 산성 수용액을 혼합하는 방법의 경우는, 히알루론산에 산성 수용액을 첨가하여 혼련하는 방법 등을 들 수 있다.

또 히알루론산에 산성 수용액을 함침하는 방법의 경우에는, 히알루론산에 산성 수용액을 소정 농도가 되도록 함침시키는 방법 등을 들 수 있다.

저농도로 조제한 히알루론산 산성 수용액을 소정 농도로 농축하는 방법의 경우, 먼저 히알루론산을 증류수에 용해한 후에 산성분을 첨가하는 것이나 히알루론산을 직접 산성 수용액에 용해하는 것 등에 의해, 저농도의 히알루론산 산성 수용액을 조제한다. 여기에서 용해하는 히알루론산의 형태는 한정되지 않는다. 또 여기에서 말하는 저농도란, 목적하는 히알루론산 겔의 히알루론산 농도보다 낮은 것을 말하지만, 취급 면에서 바람직하게는 히알루론산 농도가 5질량% 이하인 것이 바람직하다. 농축방법으로는 초원심분리, 통풍건조, 감압건조, 동결건조 등을 들 수 있다.

고농도의 히알루론산 수용액에 산성분을 첨가하는 방법의 경우, 먼저 히알루론산과 증류수를 혼합하는 것이나, 저농도의 히알루론산 수용액을 농축하는 것 등에 의해, 고농도의 히알루론산 수용액을 조제한다. 이때에 사용하는 히알루론산의 형태는 한정되지 않는다. 얻어진 고농도의 히알루론산 수용액에 산성분을 첨가하는 방법으로는, 기체상태의 산, 예컨대 염화수소의 분위기(霧圍氣)하에 노출시키는 방법이나, 히알루론산에 대하여 빈용매의 산용액, 예컨대 에탄올-염산용액 중에 침지하는 방법 등을 들 수 있다.

본 발명에서 얻어진 히알루론산 겔은, 히알루론산의 산가수분해를 피하기 위해, 카르복실기가 프로톤화된 산형의 히알루론산이나 산성으로 조정하기 위해 사용한 산 등의 성분을 중화할 필요가 있다. 중화는, 통상 수성용매에 의해 실시한다. 히알루론산 겔의 기능을 손상시키지 않는 것이면 특별히 제한은 없지만, 예컨대 인산 완충액, 수산화나트륨수용액 등이 사용된다.

여기에서는 이들을 총칭하여 중화에 사용하는 용액이라고 한다.

또, 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것 (중화방법) 은 특별히 제한은 없지만, 통상적으로는 배치법, 여과법, 컬럼 등에 충전하여 통액하는 방법 등이 사용된다. 이들 중화조건은, 중화액량, 회수 등을 포함하여, 산형의 히알루론산이나 산성으로 조정하기 위해 사용한 산 등의 성분을 중화할 수 있는 조건이면 되고, 히알루론산 겔의 형태나 용도에 따라 적절히 선택할 수 있다.

상기 중화에 사용하는 용액으로 처리된 히알루론산 겔은, 사용목적에 따라 용매중에 침지한 상태, 용매를 함유시킨 습윤상태, 통풍건조, 감압건조 또는 동결건조 등의 처리를 거친 건조상태에서 사용된다.

히알루론산 겔의 성형가공 등의 처리는, 제작시에는, 히알루론산 및 조제된 히알루론산 산성 수용액의 용기나 수법의 선택에 따라 시트상, 필름상, 파쇄상, 스폰지상, 피상, 섬유형상 및 튜브형상의 원하는 형태로의 히알루론산 겔의 제작이 가능하다. 예컨대, 히알루론산 분말을 가압성형한 것으로부터 블록상 및 시트상의 형태를 얻을 수 있다. 히알루론산 겔 제작 후의 가공으로는, 기계적분쇄에 의한 미세한 파쇄상이나 동결, 해동에 의한 스폰지상, 압연에 의한 필름화, 방사 등이 예시된다.

본 발명의 히알루론산 겔 조제에 있어서, 시약, 물, 용기 등에 주의하여 무균이고 엔도톡신이 없는 것을 얻을 수 있다.

이렇게 하여 조제된 히알루론산 겔은 겔 자체가 투명하다. 또 분쇄한 히알루론산 겔을 현탁시킨 상태에서도 투명한 상태를 유지할 수 있어, 주사통이나 백 등에 충전되어 사용할 수 있다. 또 본 발명의 히알루론산 겔을 형성시킬 때에, 약학적 또는 생리학적으로 활성인 물질을 첨가하여, 이들을 함유하는 히알루론산 겔을 형성시킬 수도 있다.

예컨대, 색전 형성 촉진의 목적으로 첨가되어, 혈액응고 카스케이드에서 피브리노젠을 피브린으로 변환함으로써 혈액을 응고시키는 트롬빈, 종양 동맥 폐색의 목적으로 사용하는 각종 항종양제 등을 들 수 있고, 조금도 제한되지 않는다.

본 발명의 히알루론산 겔은, 생체 내에서의 체류성, 저류성이 히알루론산 용액에 비하여 현저하게 향상되고, 또 가교제를 사용하지 않기 때문에, 안전성 및 생체적합성이 우수한 점에서, 의용재료로서 관절증 치료용 주입제, 색전형성제, 연질조직 주입제, 대용 유리체 등에 적용할 수 있다.

실시예

이하, 실시예에서 본 발명을 상세하게 설명하는데, 본 발명은 이들에 의해 한정되지 않는다.

실시예 1

히알루론산나트륨 (극한점도로부터의 환산분자량 : 2×10^6 Da) 의 분말 100mg을 3000N/cm² 으로 3분 동안 가압하고, 8mm × 8mm × 2mm의 직방체의 성형물을 얻었다. 상기 성형물을 스티롤제의 각형 용기에 넣고, 1mol/l염산을 570mg, 히알루론산 농도로 하여 15질량%가 되도록 함침시켜 용기를 밀폐한 후, 5℃로 설정한 냉장고에 6일 동안 정치하여 보존하였다. 그 결과, 직방체의 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다.

실시예 2

실시에 1 에 있어서, 히알루론산 농도가 7질량%가 되도록 1mol/l의 염산을 1330mg 함침시켰다. 그리고, 실시에 1 과 동일한 조작을 실시하였다. 그 결과, 직방체의 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다.

실시에 3

실시에 1 에 있어서, 히알루론산나트륨 (극한점도로부터 환산분자량 : 9×10^5 Da) 을 사용하여 동일한 조작을 실시하여, 5℃로 설정한 냉장고에 17일 동안 정치하여 보존하였다. 그 결과, 직방체의 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다.

실시에 4

실시에 1 에 있어서, 0.45mol/l의 염산을 사용하여 동일한 조작을 실시하여, 5℃로 설정한 냉장고에 17일 동안 정치하여 보존하였다. 그 결과, 직방체의 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다

실시에 5

실시에 1 과 동일한 조작을 실시하여, 25℃에서 3일 동안 정치하여 보존하였다. 그 결과, 직방체의 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다

실시에 6

히알루론산나트륨 (극한점도로부터 환산분자량 : 2×10^6 Da) 을 증류수에 용해시키고, 1질량%의 히알루론산 수용액을 조제하였다. 조제된 히알루론산 수용액을, 유리판 상에서 80℃에서 통풍건조시키고, 두께 약 200 μ m의 캐스트 필름을 얻었다. 실시에 1 에 있어서, 상기 캐스트 필름을 사용하여 동일한 조작을 실시하였다. 그 결과, 시트상의 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다.

실시에 7

히알루론산나트륨 (극한점도로부터 환산분자량 : 2×10^6 Da) 의 분말 100mg을, 50ml의 유리병에 넣고, 1mol/l의 염산을 900mg, 히알루론산 농도가 10질량%가 되도록 첨가하여, 스파툴러(spatula)로 혼합하였다. 그리고, 병을 밀폐한 후, 5℃로 설정한 냉장고에 8일 동안 정치하여 보존하였다. 그 결과, 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다.

실시에 8

히알루론산나트륨 (극한점도로부터 환산분자량 : 2×10^6 Da) 의 분말을 1mol/l의 염산에 용해하고, 1질량%의 히알루론산 수용액을 조제하였다. 조제된 히알루론산 용액을 초원심분리처리를 실시한 후, 상등액을 제거한 결과, 히알루론산 농도는 18질량%로 까지 농축되었다. 상기 농축된 히알루론산 용액을 5℃로 설정한 냉장고에 3일 동안 정치하여 보존하였다. 그 결과, 투명한 히알루론산 겔이 얻어졌다.

또한, 초원심분리처리는, 기계는 히따찌공기사 제조 CS120EX, 로터는 S100AT5, 샘플 튜브는 4 PC 튜브를 사용하고, 회전수는 99000 rpm, 처리온도는 5℃, 처리시간은 24시간에서 실시하였다.

비교예 1

실시에 1 에 있어서, 1mol/l의 염산 대신에 증류수를 사용하여 동일한 조작을 실시하였다. 그 결과, 투명한 히알루론산 겔 형성의 용액은 얻어졌지만, 투명한 히알루론산 겔은 얻을 수 없었다.

비교예 2

실시에 1 에 있어서, 히알루론산 농도가 3질량%가 되도록 1mol/l의 염산을 3230mg 함침시켰다. 그리고, 실시에 1 과 동일한 조작을 실시하였다. 그 결과, 투명한 히알루론산 겔 형성의 용액은 얻어졌지만, 투명한 히알루론산 겔은 얻을 수 없었다.

실시예 9: 히알루론산 겔의 용해성 시험

생리식염수에 50mmol/l 농도로 인산 완충 성분을 첨가하고, pH7의 인산 완충 생리식염수를 조제하였다. 얻어진 히알루론산 겔을 건조중량으로 10mg의 히알루론산을 함유하는 히알루론산 겔에 대하여, 50ml 인산 완충 생리식염수의 비율로, 인산 완충 생리식염수 중에 침지하였다. 또 비교예 1의 히알루론산 겔 형상 용액도 건조중량으로 10mg을 50ml의 인산 완충 생리식염수 중에 침지하였다. 그리고, 25℃에서 완만하게 교반하의 인산 완충 생리식염수 중에 용출되는 히알루론산의 비율을 인산 완충 생리식염수의 히알루론산 농도로부터 구하였다.

따라서, 중성의 25℃ 수용액 중에서의 히알루론산 겔의 용해성은 상기 시험에 의해 규정되는 것이다.

히알루론산 농도의 측정

인산 완충 생리식염수 중의 히알루론산의 농도는 GPC 를 사용하여 시차굴절율 검출기(differential refractometer)의 피크면적으로부터 구하였다.

상기에 따라 구체적으로 실시예 1~8 및 비교예 1, 2의 히알루론산 겔의 용해성시험을 실시하였다. 그 결과를 표 1에 나타낸다.

[표 1]
용해성 비교

실험No	시료	용해율(%)			비고
		1일 후	7일 후	14일 후	
1	실시예1의 투명성HA겔	0	1	11	실시예
2	실시예2의 투명성HA겔	4	10	19	실시예
3	실시예3의 투명성HA겔	2	10	25	실시예
4	실시예4의 투명성HA겔	4	10	28	실시예
5	실시예5의 투명성HA겔	18	44	94	실시예
6	실시예6의 투명성HA겔	8	54	100	실시예
7	실시예7의 투명성HA겔	22	67	100	실시예
8	실시예8의 투명성HA겔	4	24	56	실시예
9	비교예1의 겔형상 용액	100	-	-	비교예
10	비교예2의 겔형상 용액	100	-	-	비교예

(주) HA : 히알루론산

예컨대, 실험 No.1의 실시예 1에서 얻어진 히알루론산 겔의 용해율을 조사하면, 1일 경과 후에는 5% 이하의 용해율이고, 7일 경과 후에는 1%, 또한 14일 경과 후에는 11%의 용해율이었다. 즉, 7일 경과하여도 90% 이상의 히알루론산 겔이 잔존하고 있었다. 이에 대하여, 실험 No.9, 10의 비교예 1, 2에서 얻어진 히알루론산형상의 용액의 용해율은 1일 경과 후에서 100%의 용해율이고, 완전히 용해되었다.

따라서, 비교예 1, 2(실험 No.9, 10)에서 얻어진 히알루론산 겔형상의 용액은 수중에서의 용해속도가 매우 빠른 것에 대하여, 본원발명의 제조방법으로 얻어진 히알루론산 겔(예컨대, 실험No.1~8)의 수중에서의 용해속도가 매우 느린 것이 발견된다.

이에 의해 본원발명에서 얻어진 히알루론산 겔은 생체 내 체류시간이 긴 것으로 시사되었다.

실시예 10

히알루론산 겔의 가용화시험

증류수를 염산으로 pH1.5로 조정하였다. 실시예 1 에서 얻어진 히알루론산 겔을 실시예 9 에 기재된 인산 완충 생리식염수에 5일 동안 침지한 후, 히알루론산 겔을 인산 완충 생리식염수에서 꺼냈다. 이어서, 건조중량으로 15mg의 히알루론산을 함유하는 히알루론산 겔을 pH1.5의 염산수용액 15ml 에 침지하였다. 상기 용액을 60℃로 설정한 오븐 속에서 방치하여 가수분해를 실시하였다.

1시간 후, 2.5시간 후, 5시간 후에 0.5ml씩 용액을 샘플링하였다. 2.5시간 후에 육안으로 확인할 수 있는 히알루론산 겔은 거의 소실되었다.

비교예 3

히알루론산나트륨 (극한점도로부터의 환산분자량 : 2×10^6 Da) 을 증류수에 용해하고, 0.1질량%의 히알루론산 수용액을 조정하였다. 상기 수용액을 pH를 1mol/l염산으로 pH1.5로 조정하였다. 상기 히알루론산의 산성 수용액을 15ml를, 60℃ 오븐 속에 4시간 방치하여, 직쇄상 히알루론산의 산가수분해를 실시하였다.

실시예 11

가용화 히알루론산의 분자량과 분기도의 측정

실시예 10 에서 가용화된 히알루론산과 비교예 2 에서 얻어진 직쇄상 히알루론산의 산가수분해물은, GPC 용매로 2.5배로 희석하여 농도를 0.04질량%로 조제하고, 0.2µm의 멤브레인 필터로 여과한 후, 0.1ml 주입하여 GPC-MALLS의 측정을 실시하였다.

GPC 컬럼으로 쇼와전공사 제조 SB806HQ를 1개, 시차굴절을 검출기로서 닛뽕분광사 제조 830-RI, MALLS는 Wyatt사 제조 DAWNDSP-F를 사용하여, 용매 질산나트륨 0.2mol/l 수용액, 측정온도 40℃, 유속 0.3ml/분, 데이터 취득 간격 1회/2초로 측정하였다. 산란각도의 측정은 산란각도 21.7°~90°의 8검출기를 사용하였다. 데이터 처리 소프트웨어는 Wyatt사 제조의 ASTRA Version4.10 을 사용하였다.

상기에 따라 실시예 10 에서 가용화된 히알루론산과 비교예 3 에서 얻어진 직쇄상 히알루론산의 산가수분해물의 측정을 실시하였다. 측정결과를 표 2 에 나타낸다.

[표 2]

실험No.	반응시간(시간)	중량평균분자량 Mw	분자량분포 Mw/Mn	가용화율(%)	비고
11	1	36.8만	1.8	28	실시예10
12	2.5	58.4만	2.7	84	실시예10
13	6	10.7만	1.8	97	실시예10
14	4	35.0만	1.7	-	비교예3

예컨대, 실험 No.11 의 실시예 10 에서 반응시간 1 시간으로 샘플링한 경우, 히알루론산 겔의 가용화율이 작다. 실험 No.13의 반응시간 6시간으로 샘플링한 경우, 분자량이 크게 저하되어 분기도측정이 곤란해진다. 실험 No.12 의 반응시간 2.5시간으로 샘플링한 경우, 히알루론산 겔의 가용화율도 크고, 분기점을 갖는 히알루론산의 존재를 반영하여 분자량분포도 2.7로 커지고 있다.

실험 No.12 의 실시예 10 에서 반응시간 2.5 시간으로 샘플링한 가용화된 히알루론산과 실험 No.14 의 비교예 3 에서 얻어진 직쇄상 히알루론산의 산가수분해물의 GPC 크로마토그램과 분기도의 계산결과를 도 1 및 도 2 에 나타낸다.

도 1 은 실시예 10 과 비교예 3 의 GPC 크로마토그래피와 각 프랙션의 분자량을 대비한 그래프이다. 여기에서 부호 1 은 실시예 10의 GPC 크로마토그램을, 부호 2 는 비교예 3 의 GPS 크로마토그램을, 부호 3 은 실시예 10 의 각 프랙션을, 부호 4 는 비교예 3 의 각 프랙션의 분자량을 나타낸다. 도 1 로부터, 실시예 10의 GPC 크로마토그램 (1) 은 비교예 3 의

GPC 크로마토그램 (2) 과 비교하여, 고분자량측에 솔더가 있는 것을 알 수 있다. 동일 용출체적의 프랙션의 분자량을 비교하면, 실시예 10에서는 용출체적 8.6ml 이하, 분자량으로 약 20만 이상의 영역에서 비교예 3 보다도 명확하게 큰 분자량을 갖는 것을 알 수 있다.

실시예 10에서는, 분기점이 존재하기 때문에, 비교예 3 과 비교하여, 동일 용출 체적의 프랙션의 분자량이 커지고 있다.

도 2 는 비교예 3 을 직쇄상 히알루론산으로서 계산한 실시예 10 의 분기도와 분자량의 관계를 나타낸 그래프이다. 즉, 분기도는 도 1 의 동일 용출 체적 프랙션의 양자의 분자량으로부터 수학적식을 사용하여 계산하였다.

도 2 로부터, 실시예 10 의 분기도는 분자량 약 20만 이상의 영역에서, 분기도 0.5 이상에서 급속하게 증대해 가는 것을 알 수 있다. 본 발명에서 얻어진 히알루론산 겔 중에, 히알루론산의 축진 산가수분해 조건하에서도 안정적으로 존재하는 가교 구조가 포함되어 있는 것을 알 수 있다.

동일하게 하여 실시예 2~8 에서 얻어진 히알루론산 겔의 분기도는 모두 0.5 이상이였다.

실시예 12: 투명 겔 슬러리

실시예 1 에서 얻어진 투명한 히알루론산 겔 0.8g에 대하여 생리식염수 80ml를 첨가하였다. 마이크로 호모게나이저 (Nissei Excel Auto Homogenizer) 를 사용하여 파쇄처리를 실시하여 평균입경 약 300 μ m 의 파쇄상 히알루론산 겔을 함유하는 슬러리를 얻었다.

이 히알루론산 겔 슬러리를 테루모주식회사 제조의 2.5ml용 실린지 (피스톤누름부 직경 약 12mm) 에 충전하고, 테루모주식회사 제조의 게이시 21G 의 주사침을 장착하여 25 $^{\circ}$ C 부근의 실온에서 0.1ml/초의 속도로 토출(ejection)된 경우의 힘을 측정하였다 (시마쓰제작소 제조의 텐시론 EZ Test-20N 사용). 토출력은 약 10N 으로 용이한 토출이 가능하였다.

실시예 13: 투명 겔 조성물

실시예 1 에서 얻어진 투명한 히알루론산 겔 0.8g에 대하여 생리식염수 40ml를 첨가하였다. 마이크로 호모게나이저 (Nissei Excel Auto Homogenizer) 를 사용하여 파쇄처리를 실시하여 평균입경 약 300 μ m 의 파쇄상 히알루론산 겔을 함유하는 슬러리를 얻었다. 상기 슬러리에 히알루론산 농도 1질량%의 히알루론산 생리식염수 용액 40ml를 첨가하여 히알루론산 겔 조성물을 얻었다.

이 히알루론산 겔 조성물에 대하여 실시예 10 에 기재한 방법으로 토출력을 측정한 결과, 토출력은 약 12N 으로 용이한 토출이 가능하였다.

비교예 4: 히알루론산 겔 슬러리

PCT/JP98/03536호에 기재되어 있는 제조방법에 의해 히알루론산 겔을 조제하고, 다시 히알루론산 겔 슬러리로 하였다.

히알루론산나트륨 (극한점도로부터의 환산분자량 : 2×10^6 Da) 을 증류수에 용해하고, 1.0질량%의 히알루론산 수용액을 조제하였다. 상기 수용액의 pH를 1N질산으로 pH1.5로 조정하고, 히알루론산 산성 수용액을 얻었다.

이 히알루론산 산성 수용액 50ml를 금속제 용기에 넣고, -20 $^{\circ}$ C로 설정한 냉장고에 넣었다. 120시간 지난 후에 꺼내, 25 $^{\circ}$ C에서 해동하여 히알루론산 겔을 얻었다.

다음으로, 이것을 증류수로 충분히 투석하고, 과잉의 산 및 염화나트륨을 제거하였다. 이어서, pH7의 25mmol/l의 인산을 함유하는 완충 생리식염수로 충분히 투석중화한 후, 다시 증류수로 충분히 투석하여 동결건조에 의해 시트상의 히알루론산 겔을 얻었다.

히알루론산 겔 100mg을 10ml의 25mmol/l인산을 함유하는 완충 생리식염수에 넣고, 마이크로 호모게나이저 (Polytron, Kinematica AG 제조) 로 파쇄하고, 히알루론산 겔 슬러리를 얻었다.

실시예 14: 투명성 시험

실시에 1~8, 12, 및 13 에서 얻어진 히알루론산 겔 및 비교예 4 에서 얻어진 히알루론산 겔 슬러리를 층길이 10mm의 분광광도계용 셀에 넣고, 340nm~800nm 범위의 가시광에 대한 투과율을 물의 투과율을 100%로 하여 측정하였다 (벡크만 제조 DU-64 분광광도계 사용). 그 결과를 표 3 에 나타낸다. 표 3 의 투과율은 상기 측정범위에서의 투과율의 범위를 나타낸다. 또 대조로서 1질량%의 히알루론산 인산 완충 생리식염수용액을 사용하였다.

[표 3]
투명성 비교

실험No.	시료	투과율 (%) (최소~최대)	비고
15	실시에1의 투명성HA겔	92~95	실시에
16	실시에2의 투명성HA겔	95~98	실시에
17	실시에3의 투명성HA겔	93~95	실시에
18	실시에4의 투명성HA겔	90~96	실시에
19	실시에5의 투명성HA겔	92~98	실시에
20	실시에6의 투명성HA겔	91~95	실시에
21	실시에7의 투명성HA겔	92~95	실시에
22	실시에8의 투명성HA겔	92~97	실시에
23	실시에12의 투명성HA겔 슬러리	93~98	실시에
24	실시에13의 투명성HA겔 조성물	95~100	실시에
25	비교예4의 HA겔 슬러리	6~8	비교예
26	1%농도의 HA 용액	99~100	대조

표 3 으로부터 실시예 1~8, 12 및 13 에서 얻어진 시료는 투명한 것이 나타났다.

실시에 15: 토끼 관절강 내에서의 저류성 비교

체중 2.5~3.0kg 성숙한 건강한 뉴질랜드 화이트계의 용성 토끼의 양 무릎 관절부 주변을 전기 면도기로 털을 깎아 소독한 후, 실시예 12 에서 얻어진 투명 겔 슬러리, 실시예 13 에서 얻어진 투명 겔 조성물 또는 히알루론산 (극한점도값으로부터의 환산분자량 : 2×10^6 Da) 1질량% 생리식염수용액을 왼쪽 무릎 관절강에 0.1ml/kg 체중의 용량으로 투여하였다. 대상으로서 생리식염수를 동일 개체의 오른쪽 무릎 관절강 내로 0.1ml/kg 체중의 용량으로 투여하였다. 투여 후 격일마다 양 무릎관절액을 회수하여, 관절액 중의 히알루론산 농도를 GPC로 정량하였다.

또한, 잔존율(persistence)은 다음 수학적식으로 산출하였는데, 내재성 히알루론산량이란 생리식염수를 투여한 관절강에서 채취한 관절액 중의 히알루론산의 양을 나타낸다.

$$\text{잔존율 (\%)} = (\text{회수량} - \text{내재성 히알루론산량}) / \text{투여량} \times 100$$

그 결과를 표 4 에 나타낸다.

[표 4]
저류성 비교

실험No	시료	HA잔존율(%)n=3의 평균값							비고
		2일	4일	6일	8일	10일	12일	14일	
27	실시에12의 투명성HA겔 슬러리	91	70	33	15	7	2	0	실시에
28	실시에13의 투명성HA겔 조성물	92	79	40	21	12	4	0	실시에
29	1% 농도의 HA용액	45	6	0	NT	NT	NT	NT	비교예

(주) NT 는 시험을 실시하지 않은 것을 나타냄.

표 4 로부터 과제 난수용성 히알루론산 겔은, 생체 내에서의 저류성이 히알루론산 용액에 비하여, 현저하게 향상되고 있는 것을 알 수 있었다.

실시에 16: 브라디키닌 동통 억제작용

체중 10kg 전후의 자성 비글견(beagle)의 뒷다리 무릎 관절강 내에 미리 실시예 12 에서 얻어진 투명 겔 슬러리 (0.3ml/kg 체중), 실시예 13 에서 얻어진 투명 겔 조성물 (0.3ml/kg 체중), 히알루론산 용액 (극한점도값으로부터의 환산분자량 : 2×10^6 Da), 1질량% 생리식염수용액을 0.3ml/kg 체중) 또는 대조로서의 생리식염수 0.3ml/kg 체중을 투여하고, 투여 2일, 4일 7일 후에 발통물질인 브라디키닌 생리식염수용액 (BK : $0.2 \mu\text{g/ml}$ 를 0.05ml/kg 체중) 을 투여하고, 1~2분 동안, 3~4 분 동안, 5~6분 동안의 동통 발에 대한 체중부하율을 지표로 하여 동통억제작용을 측정하였다. 그 결과를 표 5 에 나타낸다.

[표 5]
관절 동통 억제효과비교

시험No	시료	체중부하율(%)n=10의 평균값			비고
		2일후	4일후	7일후	
30	실시예 12의 투명성HA겔 슬러리	70	68	46	실시예
31	실시예 13의 투명성HA겔 조성물	73	71	55	실시예
32	1% 농도의 HA용액	60	39	26	비교예
33	대조(생리식염수)	27	25	29	비교예

체중부하율(%) = {(BK투여 후 각 시점의 투여 다리에 대한 평균체중 부하량)/(BK투여전 1분 동안의 투여 다리에 대한 평균체중 부하량)} × 100

표 5 로부터, 히알루론산 용액이 7일 후에는 대조와 동일 레벨로 저하된 것에 비교하여, 투명 겔 슬러리 및 투명 겔 조성물은 7일 후에도 동통억제효과를 지속하였다.

실시에 17: 트롬빈 함유 투명 겔 슬러리의 조제

실시예 12 에서 얻어진 투명 겔 슬러리에, 100mg 당 0.5NIH 단위에 상당하는 양의 트롬빈용액을 첨가하여 트롬빈함유 유동성 히알루론산 겔을 조제하였다.

실시에 18: 색전형성시험

실시예 17 에서 얻어진 트롬빈함유 투명 겔 슬러리를 주사기에 흡인하고, 체중 약 2.5kg의 토끼 (뉴질랜드 화이트종) 의 동맥내로 약 0.1ml 투여하였다. 주입한 겔은 신속하게 응괴를 형성하여, 육안에서 폐색상태를 확인할 수 있었다.

1개월 후까지 형태관찰을 계속하였는데 변화는 볼 수 없고, 최종 관찰 후의 부검에 의한 색전의 조직학적 검토에서는 충분한 폐색상태이었다.

또한, 비교로서 실시한 1.0질량%의 히알루론산 용액에서는 폐색이 형성되지 않았다.

실시에 19: 모르모트(guinea pig)에 대한 투여시험

350~400g의 웅성 하드레이(Hartray)계 모르모트를 20마리를 마취하여, 실시예 12에서 얻어진 투명 겔 슬러리, 실시예 13에서 얻어진 투명 겔 조성물 및 히알루론산나트륨(극한점도값으로부터의 환산분자량: 2×10^6 Da)의 1.0질량%의 생리식염수용액을 그 피부 내에 주사하였다. 피내투여량은 0.05ml로 하고, 동물당 10부위의 주입을 실시하였다. 0, 1, 2, 3 및 4주 후에 각 1마리씩 각 부위의 조직을 샘플링하였다. 고정하여 포매한 조직의 절편을 만들어, 헤마톡시린-에오신 염색 및 아르지안 블루 염색을 실시하였다. 또 현미경으로 조직반응을 관찰하였다.

그 결과, 실시예 12 및 실시예 13의 시료에서는, 4주 후에도 투여직후의 피부의 상태를 유지하고, 피부조직 중에 히알루론산이 존재하고 있었다. 한편, 히알루론산의 1.0질량%의 생리식염수용액에서는 4주째에 전부 히알루론산이 흡수되어 있었다. 또한, 모두 세포침출물은 관찰되지 않아, 염증반응이 없었던 것이 시사되었다.

실시예 20: 굴절율 측정

실시예 12에서 얻어진 투명 겔 슬러리 및 실시예 13에서 얻어진 투명 겔 조성물에 대하여, 아베굴절계(Abbe refractometer; 주식회사 아타고 제조)를 사용하여 20℃에서의 굴절율을 측정하였다. 실시예 12 및 실시예 13의 굴절율은 각각 1.334 및 1.335 이고, 유리체의 굴절율에 가까운 것이었다.

실시예 21: 집토끼의 망막박리에 대한 효과

체중 2.5~3.0kg의 백색 집토끼(뉴질랜드 화이트종) 15마리(15안)에 대하여 마취하였다. 0.5% 인도메타신 및 5% 염산 페닐렌프린을 점안하여 산동시켜, 2% 염산 리드카인을 구후마취(retrobulbar anaesthetization)에 사용하였다.

세안 및 안주변의 소독을 실시한 후, 집토끼를 수술용 현미경하에 놓고 고정하고, 결막 및 각막을 절개하였다. 강막을 절개하여 관류 탭을 삽입하고, 다시 유리체 절제도 및 라이트가이드(light guide)를 뚫어넣기 위한 강막절개를 실시하여, 유리체 절제도 및 라이트가이드를 뚫어넣었다.

유리체 절제도에 의해 유리체를 흡인하면서 절제한 후, 유리체도를 빼 선단을 만족시킨 21G 침을 삽입하였다. 21G침을 상이측의 망막하에 꽂아 멸균공기 약 0.1ml를 주입하고, 부분적으로 망막을 박리시켰다. 박리 후 다시 유리체 절제도를 꽂아, 박리망막을 일부 절개하고, 열공을 제작하였다.

관류액과 공기의 교환 후, 실시예 12에서 얻어진 투명 겔 슬러리 및 실시예 13에서 얻어진 투명 겔 조성물을 유리체강 내에 주입하고, 공기와 교환하여 망막을 복위시켰다. 레이저 안내광 응고장치의 프로브를 유리체강 내에 삽입하여 안내응고를 실시한 후, 8-0 나일론사로 강막창 및 결막창을 봉합하였다.

그 결과, 실시예 12 및 실시예 13에서 조제한 시료는, 1개월 후에 검안경적으로는 재박리 등의 이상소견은 관찰되지 않고, 광응고부위의 반흔화의 상태도 양호하였다. 슬릿 트림프에 의한 검사에서도 유리체 혼탁이나 염증성 반응은 관찰되지 않았다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 공존시키고, 상기 공존상태를 유지함으로써 히알루론산 겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분의 공존하에서, 상기 공존상태를 -10℃~30℃로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 히알루론산과, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 하는 물 및 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 공존시키고, 상기 공존상태를 $-10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 히알루론산 농도를 5질량% 이상으로 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 함유하는 히알루론산 산성 수용액을 $-10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법.

청구항 5.

제 3 항에 있어서, 히알루론산과, 상기 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 함유하는 산성 수용액을, 산성 수용액에 대하여 히알루론산을 5질량% 이상으로 혼합한 히알루론산 산성 혼합물을 $-10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법.

청구항 6.

제 3 항에 있어서, 히알루론산에, 상기 히알루론산의 카르복실기와 등몰 이상의 산성분을 함유하는 산성 수용액을 히알루론산 농도가 5질량% 이상이 되도록 함침시키고, $-10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 히알루론산 겔을 형성하고, 상기 겔을 중화에 사용하는 용액으로 처리하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔의 제조방법.

청구항 7.

중성 수용액에 난용성이고 투명성을 갖는 것을 특징으로 하는 히알루론산 단독으로 형성된 히알루론산 겔 (여기서, 난용성은 중성 수용액에 의한 25°C 에서의 용해성을 측정한 경우, 12시간에서의 용해율이 50% 이하임을 나타내고, 투명성은 상기 히알루론산 겔을 총길이 10mm의 분광광도계용 셀에 넣고, 340nm~800nm 범위의 가시광에 대한 투과율을, 물의 투과율을 100%로 하여 측정한 경우, 투과율이 50% 이상임을 나타냄).

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 중성의 25°C 수용액 중에서 1일 용해율이 50% 이하인 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔.

청구항 9.

제 7 항에 있어서, 히알루론산의 축진 산가수분해 조건하에서 히알루론산 겔을 처리함으로써 가용화된 히알루론산이 분기 구조를 갖고, 상기 가용화된 히알루론산 중에, 분기도가 0.5 이상인 분자량 프랙션을 부분적으로 함유하는 것을 특징으로 하는 히알루론산 겔.

청구항 10.

중성의 25℃ 수용액 중에서 1일 용해율이 50% 이하이고, 투명성을 갖는 히알루론산 단독으로 형성된 히알루론산 겔을 함유하는 의용(醫用)재료 (여기서, 투명성은 상기 히알루론산 겔을 층길이 10mm의 분광광도계용 셀에 넣고, 340nm~800nm 범위의 가시광에 대한 투과율을, 물의 투과율을 100%로 하여 측정한 경우, 투과율이 50% 이상임을 나타냄).

청구항 11.

다음의 요건을 만족하는 히알루론산 단독으로 형성된 투명성을 갖는 겔을 함유하는 의용재료 (여기서, 투명성은 상기 히알루론산 겔을 층길이 10mm의 분광광도계용 셀에 넣고, 340nm~800nm 범위의 가시광에 대한 투과율을, 물의 투과율을 100%로 하여 측정한 경우, 투과율이 50% 이상임을 나타냄) :

히알루론산의 축진 산 가수분해 조건하에서 히알루론산 겔을 처리함으로써 가용화된 히알루론산이 분기구조를 갖고, 상기 가용화된 히알루론산 중에 분기도가 0.5 이상인 분자량 프랙션을 부분적으로 함유함.

청구항 12.

중성의 25℃ 수용액 중에서 1일 용해율이 50% 이하이고, 히알루론산의 축진 산 가수분해 조건하에서 히알루론산 겔을 처리함으로써 가용화된 히알루론산이 분기구조를 갖고, 상기 가용화된 히알루론산 중에 분기도가 0.5 이상인 분자량 프랙션을 부분적으로 함유하는 투명성을 갖는 히알루론산 겔과, 겔화되어 있지 않은 히알루론산을 함유하는 의용재료 (여기서, 투명성은 상기 히알루론산 겔을 층길이 10mm의 분광광도계용 셀에 넣고, 340nm~800nm 범위의 가시광에 대한 투과율을, 물의 투과율을 100%로 하여 측정한 경우, 투과율이 50% 이상임을 나타냄).

청구항 13.

제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 투명성을 갖는 겔이 파쇄상인 의용재료.

청구항 14.

제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 의용재료가 관절증 치료용 주입제인 것을 특징으로 하는 의용재료.

청구항 15.

제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 의용재료가 색전형성재(塞栓形成材)인 것을 특징으로 하는 의용재료.

청구항 16.

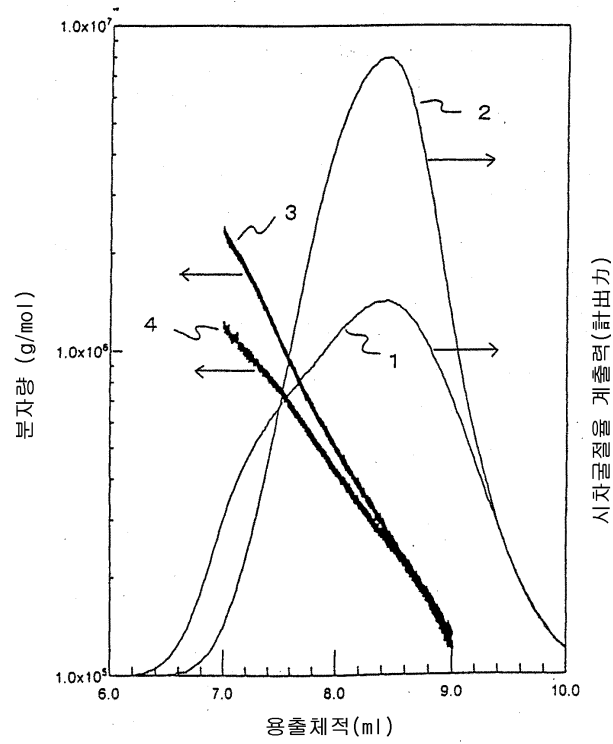
제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 의용재료가 연질조직 주입제인 것을 특징으로 하는 의용재료.

청구항 17.

제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 의용재료가 대용 유리체(artificial vitreous body)인 것을 특징으로 하는 의용재료.

도면

도면1



도면2

