

명세서

발명의 명칭: DNA 분획물을 포함하는 필러 제조방법 및 이로부터 제조된 필러

기술분야

- [1] 본 발명은 DNA 분획물을 포함하는 필러 제조방법 및 이로부터 제조된 필러에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인체의 연부조직(soft tissue)은 콜라겐, 엘라스틴 등의 단백질과 글리코사미노글리칸을 포함하는 세포외기질에 의해 그 구조를 유지하고 있으며, 다양한 요인에 의해 연부조직의 결손이 발생하는 경우, 외과적 또는 비외과적으로 생체조직이나 합성 화합물을 주입하여 그 형태를 복원 또는 교정한다.
- [3] 이러한 복원 또는 교정을 위해 주입되는 필러(filler, 충전제)는 성인의 안면부 주름 부위의 일시적인 개선, 볼륨 회복 등을 위해 피하에 주입되어 물리적인 수복을 통해 스스로 부피를 유지하는 작용원리를 갖는 의료기기로서, 일반적으로 주입액이 주사기에 충전되어 있으며 함께 사용하는 주사침과 조합되어 구성된다.
- [4] 현재 제품으로 개발된 필러는 히알루론산을 기반으로 하는 제품이 주를 이루며, 히알루론산의 화학구조적 안정성을 높여 생체 내에서 물성유지 기간을 길게 유지시키기 위해 가교제를 첨가하여 히알루론산을 안정화시키는 방식을 주로 사용하고 있다(국제공개특허 제WO/2019/130360호). 그러나, 생체 내에서 분해된 가교제 성분은 이물질로 인식되어 염증반응을 일으킬 수 있고, 이로 인해 공정상 세척을 통해 가교제를 제거하는 단계가 필요하며, 이후 가교제의 잔류량의 확인도 필수적이므로 제조공정상 효율에 문제가 있다.
- [5] 또한, 히알루론산을 기반으로 한 필러는 겔이 충전된 주사기를 고온 조건에서 고압증기(autoclave) 등을 통해 멸균하는 방법을 주로 사용하고 있으나, 멸균 과정에서의 점탄성 감소가 문제될 수 있으며, 이를 보완하기 위해 히알루론산을 고농도로 포함시키거나 가교된 히알루론산을 사용하는 경우, 시술 시 환자의 고통이 심해져 만족도가 떨어지며, 시술자의 시술 편의성 또한 떨어지는 문제점이 있다.
- [6] 한편, 히알루론산을 기반으로 한 필러들의 기능적인 면을 보완하기 위해 폴리뉴클레오타이드 등을 포함하는 필러도 연구 중에 있다. 그러나, 제조과정 중 반드시 거치게 되는 멸균과정에서 폴리뉴클레오타이드의 변성 등으로 인해

실제 제조과정에서 혼합된 폴리뉴클레오타이드 용량 대비 기능성이 만족스럽지 않거나 그 함량으로 인해 시술시 고통을 유발하여 환자의 만족감이 높지 않은 문제점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 종래 문제점을 해결하기 위해 노력한 결과, 필터 제조에 있어 특정 제조방법을 사용하는 경우, 공정상의 이점으로 인해 제조효율이 높고, 포함되는 성분들의 함량을 낮추면서도 제조된 필터의 점탄성을 확보할 수 있으며, 상기 제조방법에 의해 제조된 필터가 종래 사용되는 제품 대비 피부의 두께 및 피부 주름 개선 효과, 콜라겐 형성능 등이 우수하고, 주입 시 통증이 적어 환자 및 시술자의 만족도가 높다는 점을 입증하고 본 발명을 완성하기 이르렀다.
- [8] 본 발명은 a) DNA 분획물을 용매에 혼합하여 용액을 제조하는 단계; b) 상기 제조된 용액을 제균필터로 제균하는 단계; 및 c) 상기 제균된 용액에 히알루론산 및/또는 pH 조절제를 혼합하는 단계;를 포함하는 필터 제조방법을 제공한다.
- [9] 본 발명은 상기 제조방법을 통해 제조된 필터를 제공한다.
- [10] 본 발명은 상기 필터가 충전된 프리필드시린지를 제공한다.

과제 해결 수단

- [11] 이하 이를 구체적으로 설명한다. 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합은 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기의 구체적인 서술에 의해 본 발명 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [12]
- [13] 본 발명은 a) DNA 분획물을 용매에 혼합하여 용액을 제조하는 단계; b) 상기 제조된 용액을 제균필터로 제균하는 단계; 및 c) 상기 제균된 용액에 히알루론산 및/또는 pH 조절제를 혼합하는 단계;를 포함하는 필터 제조방법을 제공한다.
- [14] 하기에서는 제조방법의 각 단계에 대해 구체적으로 설명한다.
- [15] 본 발명의 a) 단계는 DNA 분획물을 용매에 혼합하여 DNA 분획물이 용해된 용액을 제조하는 단계이다.
- [16] 본 발명에서 상기 "DNA 분획물"은 뉴클레오타이드를 구성하는 5탄당의 3번 탄소와 또 다른 뉴클레오타이드의 인산기가 공유결합으로 연결되어 만들어진 사슬 형태의 중합체를 의미하며, 상기 뉴클레오타이드는 인산, 당, 염기가 각각 1개씩 연결된 분자로, 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C), 티민(T) 및 우라실(U)을 포함하는 핵산을 구성하는 단위이다.
- [17] 본 발명에서 상기 DNA 분획물은 세포 간 구성 물질인 세포외 기질(ECM, Extracellular matrix) 생성을 촉진시키고, 인체 안에서 피부치유 능력을 활성화시킬 수 있어 피부 스스로 노화되고 위축된 재생능력을 회복시켜주는 기능을 가지므로, 피부 자체의 기능성을 높이는 역할을 할 수 있다.
- [18] 본 발명에서 상기 DNA 분획물은 DNA 분획물 자체, 이의 염 또는 이들의

조합을 모두 포함하며, 직접 합성하거나 상업적으로 판매되는 제품을 구매하여 사용할 수 있다.

- [19] 본 발명에서 상기 DNA 분획물은 폴리뉴클레오타이드(Polynucleotide, PN), 폴리데옥시리보뉴클레오타이드(Polydeoxyribonucleotide, PDRN) 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 이들의 단편을 포함한다. 본 발명의 실시예들에 따르면, 상기 DNA 분획물은 폴리뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [20] 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 염은 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 나트륨, 폴리뉴클레오타이드 칼륨, 폴리뉴클레오타이드 칼슘, 폴리뉴클레오타이드 마그네슘, 폴리뉴클레오타이드 아연 등일 수 있으며, 상기 폴리데옥시리보뉴클레오타이드의 염은 예를 들어, 폴리데옥시리보뉴클레오타이드 나트륨, 폴리데옥시리보뉴클레오타이드 칼륨, 폴리데옥시리보뉴클레오타이드 칼슘, 폴리데옥시리보뉴클레오타이드 마그네슘, 폴리데옥시리보뉴클레오타이드 아연 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예들에 따르면, 상기 폴리뉴클레오타이드의 염은 폴리뉴클레오타이드 나트륨일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [21] 본 발명에서 상기 DNA 분획물은 분자량이 1,800 내지 6,000 kDa일 수 있으며, 바람직하게는 1,800 내지 2,300 kDa, 더욱 바람직하게는 2,000 내지 2,300 kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [22] 상기 DNA 분획물의 분자량이 상기 범위 미만인 경우, 최종적으로 제조된 필터의 점탄성이 너무 낮아 물리적 지지체로서의 역할을 할 수 없을 수 있고, 상기 범위를 초과하는 경우, 제균필터를 적용함에 있어서 분자량 자체로 인해 제조 속도, 필터의 막힘 등의 문제점이 발생하여 제조효율이 저하될 수 있다.
- [23] 본 발명에서 상기 DNA 분획물은 최종 필터 부피 기준 0.5 %(w/v) 내지 2 %(w/v)로 포함되도록 혼합되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 1 %(w/v) 내지 1.5 %(w/v)로 포함되도록 혼합되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [24] 상기 범위 미만으로 DNA 분획물이 혼합되는 경우, DNA 분획물로 인한 효과, 예를 들면, 피부재생, 진피 치밀도 증가, 콜라겐 생성 촉진 등의 효과가 미미할 수 있고, 물리적 지지체로서 요구되는 점탄성을 만족하지 못할 수 있으며, 상기 범위를 초과하여 DNA 분획물이 포함되는 경우, 제조된 필터의 점탄성 증가로 인해 피부 주입 시 통증이 유발되어 환자의 만족도가 떨어질 수 있고, 시술자의 불편함 또한 가중시킬 수 있다.
- [25] 본 발명의 a) 단계에서 사용되는 용매는 DNA 분획물을 용해시킬 수 있고 제균필터를 적용함에 있어서 제조효율의 저하를 유발하지 않는 용매라면 어느 것이든 사용할 수 있으나, 본 발명의 실시예들에 따르면, 상기 용매는 주사용수인 것이 바람직할 수 있다.
- [26] 후술하는 실험예에서 주사용수를 용매로 사용하는 경우, 제균필터를 적용하는 b) 단계에 있어서, 제균되는 속도가 빠르고, 제균필터의 막힘 현상을 방지할 수 있어 제조효율이 크게 향상될 수 있다는 점을 구체적으로 확인하였다.

- [27] 본 발명에서 a) 단계는 DNA 분획물이 용매에 균일(또는 균질)하게 분포되도록 용매에 DNA 분획물을 용매에 혼합한 후 교반하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [28] 상기 교반은 b) 단계의 제균필터를 통한 제균속도를 향상시킬 수 있으며, DNA 분획물의 응집에 의한 필터의 막힘 현상을 방지할 수 있어 제조효율을 증가시킬 수 있다.
- [29] 본 발명에서 b) 단계는 DNA 분획물이 용해된 용액을 제균필터를 통해 제균하는 단계이다.
- [30] 본 발명에서 "제균필터"는 바이오 공정 과정 또는 Filling & Formulation 과정에서 사용되는 것으로, 주로 PES, PVDF, Nylon 또는 PTFE를 원료로 제작되는 필터를 의미한다.
- [31] 본 발명에서 상기 제균필터는 유해균을 제거하기에 적절한 공극 크기(pore size)를 가지는 것일 수 있으며, 본 발명의 실시예들에 따르면, 상기 제균필터의 공극 크기(pore size)는 0.2 μm 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [32] 본 발명에서 제균필터가 적용되는 b) 단계의 도입 순서는 제조되는 필터의 보존성과 제조효율을 위해 중요하다. 즉, 본 발명의 목적상 b) 단계는 반드시 히알루론산 및/또는 pH 조절제를 혼합하기 전 수행되어야 한다. DNA 분획물이 용해된 용액과 히알루론산 및/또는 pH 조절제가 용해된 용액에 제균필터를 각각 적용한 뒤 혼합하는 것보다, DNA 분획물이 용해된 용액에 제균필터를 적용한 뒤, 히알루론산 및/또는 pH 조절제를 혼합하는 것이 필터링 속도 측면에서 유리하다.
- [33] 본 발명에서 c) 단계는 제균된 용액에 히알루론산 및/또는 pH 조절제를 혼합하는 단계이다.
- [34] 본 발명에서 상기 "히알루론산(hyaluronic acid)"은 생체 고분자 물질로 글루크로닉산 및 아세틸글루코사민으로 구성된 선형 폴리사카리드로서 세포외기질(extracellular matrix, ECM), 관절의 윤활액, 연골을 구성하는 지지체에 존재하는 글리코사미노 글리칸 중의 하나이다. 히알루론산은 점탄성적인 성질을 가지고 있어 피부 보충제 등으로 사용될 수 있으며, 생체 내 적용 시 면역적인 측면에서도 문제가 없는 우수한 생체적합성을 가진 재료이다.
- [35] 본 발명에서 상기 히알루론산은 히알루론산 자체, 이의 염 또는 이들의 조합을 모두 포함하는 의미로 사용되며, 직접 합성하거나 상업적으로 판매되는 제품을 구매하여 사용할 수 있다.
- [36] 상기 히알루론산의 염은 예를 들면 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 또는 히알루론산 코발트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예들에 따르면, 상기 히알루론산의 염은 히알루론산 나트륨일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 본 발명에서 상기 히알루론산은 분자량이 100 내지 5,000 kDa일 수 있으며, 바람직하게는 500 내지 1,200 kDa일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 700 내지 1,200 kDa일 수 있다.

- [38] 상기 범위 미만인 경우, 최종 제조된 필러의 점도가 너무 낮아 물리적 지지체로서 적합하지 않을 수 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 최종 필러의 점도가 너무 높아져 본 발명이 의도하고 있는 용도, 예를 들면, 얇은 주름을 개선하기 위한 용도에 적합하지 않을 수 있고, 피부에 주사 시 통증을 유발할 수 있다.
- [39] 본 발명에서 상기 히알루론산은 미가교(또는 비가교)된 것일 수 있다.
- [40] 종래 필러의 경우, 히알루론산의 생체 효소에 의한 분해를 막고 탄성을 보완하기 위해 가교제를 사용하며, 상기 가교제는 주로 BDDE(1,4-Butanediol diglycidyl ether), DVS(divinyl sulfone) 등의 화학적 가교제를 사용하여 제조된다. 이러한 화학적 가교제는 부작용 및 안전성에 대한 문제로 인해 공정상 세척 단계가 반드시 필요하고, 가교제의 잔류량의 확인도 필수적이므로 제조공정상의 효율이 저하되는 문제점이 있다.
- [41] 본 발명은 필러 제조에 있어서 미가교 히알루론산을 사용하므로 가교제를 사용하는 경우 필수적으로 요구되는 세척단계나 가교제 잔류량 확인 등의 단계가 요구되지 않아 제조공정상의 효율을 극대화할 수 있으며, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 필러는 미가교 히알루론산을 사용함에도 기존 제품과 유사한 체내 분해속도를 확보하여 조직 수복시 지속기간이 길면서도, 기존 제품보다 더 우수한 콜라겐 형성능을 확보할 수 있어 체내 주입하기 위한 필러로 유용하게 사용될 수 있다.
- [42] 본 발명에서 상기 히알루론산은 최종 필러의 전체 부피 대비 0.1 %(w/v) 내지 1 %(w/v)의 농도로 포함되도록 혼합되는 것일 수 있다.
- [43] 상기 범위 미만인 경우, 최종적으로 제조된 필러의 점도가 너무 낮아 물리적 지지체로서 적합하지 않을 수 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 최종적으로 제조된 필러의 점도가 너무 높아져 피부에 주사시 통증을 유발할 수 있고, 본 발명이 의도하고 있는 용도, 예를 들면, 얇은 주름을 개선하기 위한 용도에 적합하지 않을 수 있다.
- [44] 본 발명에서 "pH 조절제"는 pH를 조절하거나 안정화하기 위하여 사용하는 물질을 의미한다.
- [45] 상기 pH 조절제는 예를 들면, 염화나트륨, 인산일수소 나트륨, 인산이수소 나트륨 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [46] 본 발명에서 상기 pH 조절제는 주사용수 등의 용제에 용해되어 농축된 상태를 포함하는 것일 수 있다. 즉, 본 발명에서 pH 조절제는 b) 단계에서 제공된 용액에 pH 조절제 자체를 혼합하거나, pH 조절제를 주사용수 등의 용제에 용해시켜 농축 후 b) 단계에서 제공된 용액에 혼합될 수 있다.
- [47] 본 발명의 c) 단계에서는 히알루론산 및 pH 조절제에서 선택된 하나 이상이 혼합될 수 있다. 예를 들어, c) 단계에서 히알루론산 또는 pH 조절제가 혼합될 수 있으며, 히알루론산 및 pH 조절제가 모두 혼합될 수 있다.
- [48] 본 발명의 c) 단계에서 히알루론산 및 pH 조절제가 모두 혼합되는 경우,

단계적으로 혼합되거나 히알루론산과 pH 조절제를 먼저 혼합한 후 b) 단계에서 제공된 용액에 혼합될 수 있다.

- [49] 본 발명의 실시예들에 따르면, c) 단계에서 히알루론산 및 pH 조절제가 단계적으로 혼합되는 경우, c-1) b) 단계에서 제조된 제공된 용액에 히알루론산을 혼합하는 단계; 및 c-2) 상기 제조된 혼합물에 pH 조절제를 혼합하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [50] 본 발명의 c) 단계에서 pH 조절제가 혼합되는 경우, pH 조절제는 제조되는 필터의 pH가 6.0 내지 8.0이 되도록 하는 양으로 혼합될 수 있다.
- [51] 본 발명은 상기 a) 내지 c) 단계를 순서대로 수행함으로써, 종래 제공된 용액을 건조하고 재용해하여 분획물을 제조하는 방법 대비 건조 단계가 요구되지 않아 제조공정상의 효율 극대화가 가능하며, 단계 감소에 따른 외부로부터의 오염 가능성을 최소화하여 무균상태를 유지할 수 있다.
- [52] 본 발명의 제조방법은 마취제를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 마취제는 c) 단계 이후에 혼합되는 것이 바람직할 수 있다.
- [53] 본 발명에서 사용되는 용어 "마취제"는 가려움증, 피부 염증으로 인한 통증을 완화하기 위해 사용되는 성분을 의미한다. 마취제의 예로서는 프로카인, 클로로프로카인, 테트라카인, 프릴로카인, 리도카인, 메피바카인, 부피바카인, 로피바카인, 에티도카인, 염산리도카인, 벤조카인, 옥세타진 등이 있으며, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 마취제는 리도카인 또는 이의 염(예를 들어, 리도카인염산염일수화물)인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 본 발명에서 리도카인은 국소 마취는 물론, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 히알루론산과 함께 섬유조직의 탄력을 개선하는 효과를 가질 수 있다.
- [55] 본 발명에서 상기 마취제는 최종 필터 전체 부피 대비 0.2 내지 0.4%(w/v)로 포함되도록 혼합되는 것일 수 있으며, 본 발명의 실시예들에 따르면, 0.3 %(w/v)로 포함되도록 혼합되는 것일 수 있다. 상기 범위 미만으로 포함되는 경우, 마취 효과가 저하될 수 있고, 상기 범위를 초과하여 포함되는 경우, 마취 시간이 길어져 신속하고 간편한 시술로 빠른 일상생활로의 복귀가 힘들 수 있고, 독성으로 인한 부작용이 발생할 수 있다.
- [56] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 필터를 제공한다.
- [57] 본 발명에서 상기 필터는 최종 필터의 전체 부피 대비 DNA 분획물을 0.5 %(w/v) 내지 2%(w/v), 히알루론산을 0.1 %(w/v) 내지 1 %(w/v)의 농도로 포함하는 것일 수 있다.
- [58] 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 필터에서 DNA 분획물 및 히알루론산이 상기 범위 미만인 경우, 최종적으로 제조된 필터의 점도가 너무 낮아 물리적 지지체로서 적합하지 않을 수 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 최종적으로 제조된 필터의 점도가 너무 높아져 피부에 주사시 통증을 유발할 수 있고, 본 발명이 의도하고 있는 용도, 예를 들면, 얇은 주름을 개선하기 위한 용도에

적합하지 않을 수 있다.

- [59] 본 발명에서 상기 필러는 레오미터로 측정 시 25°C에서 복소점도가 0.3 내지 3.0 Pa·s일 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 3.0 Pa·s일 수 있다. 본 발명의 실시예들에 따르면, 1 내지 1.5 Pa·s일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 본 발명에서 상기 필러는 레오미터로 측정 시 25°C에서 저장탄성계수 G'가 5 Pa 이상일 수 있다.
- [61] 본 발명에서 "복소점도(Complex viscosity, η^*)"는 점성 및 탄성의 복합작용의 결과로, 실수부와 허수부의 합으로 나타낸 수학적 표현을 의미한다.
- [62] 본 발명에서 "저장탄성계수"는 탄성에 관한 것으로 저장된 에너지의 척도를 의미하며, 높을수록 원래대로 돌아오려는 힘이 크다는 것을 나타낸다.
- [63] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 필러는, 낮은 함량의 DNA 분획물 및 히알루론산을 사용하면서도 본 발명이 의도하는 용도에 적절한 복소점도 및 저장탄성계수를 확보할 수 있다.
- [64] 본 발명에서 상기 필러는 조직수복용으로 사용될 수 있으며, 구체적으로 상기 필러는 얇은(mild) 주름 개선 또는 윤곽 교정용으로 사용될 수 있으며, 더욱 구체적으로 얇은(mild) 주름 개선용으로 사용될 수 있다.
- [65] 임상시험에서 평가되는 주름의 평가척도(WSRS)에 따르면 주름은 5단계로 나누어질 수 있으며, 얇은(mild), 중간(moderate), 깊은(severe), 아주 깊은(extreme) 주름으로 나누어질 수 있다.
- [66] 얇은 주름(mild)은 종래의 보툴리눔 독신만으로는 치료적 한계가 있고, 종전의 필러 제품의 점성도 때문에 콜라겐 생성의 핵심이 되는 진피층에 직접 투여하기에는 제한이 있었다. 즉, 피부에 주입하기 위한 필러로 사용하기 위해서는 적절한 복소점도 및 저장탄성계수를 확보하는 것이 중요하다. 특히, 주름에 적용하기 위한 필러는 얇은 주름부터 깊은 주름까지 주름의 상태에 따른 적절한 복소점도를 가지는 필러를 사용하는 것이 요구된다.
- [67] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 필러는 복소점도가 0.3 내지 3.0 Pa·s의 범위를 나타내는 것으로 얇은 주름의 개선에 효과적으로 사용될 수 있으며, 얼굴 전체에 주사되는 필러 대비 낮은 주사압을 나타내므로 눈가와 같은 얇은 피부에 사용하는 경우에도 통증이 낮다. 후술하는 실험예에 따르면, 종래 사용되어 오던 필러 제품보다 낮은 DNA 분획물 함량에도 불구하고 피부 재생, 콜라겐 형성능 등이 높으며, 종래 필러 제품 대비 시각적인 자연스러움을 확보할 수 있다는 점을 확인하였다.
- [68] 본 발명에서 상기 필러는 눈가주름(crow's feet) 개선용일 수 있다. 눈가는 피부조직이 매우 얇아 미세한 자극에도 민감하게 반응하고, 주름이 잘 생기는 부위에 해당하며, 상기 눈가주름은 눈 바깥쪽의 까마귀 발 모양의 주름 및 눈 밑에 처지는 주름이 대표적이다. 본 발명의 필러는 점성도가 상대적으로 낮아 피부조직이 얇은 눈가 등에 생기는 얇은 주름에 유용하게 사용될 수 있다.
- [69] 본 발명의 필러는 피하 또는 피부내 주입 등에 의해 대상체에 유효량으로

투여될 수 있다.

- [70] 본 발명에서 "유효량"은 필러 주입으로 인한 유익한 성형 또는 치료 효과를 나타내기에는 충분한 필러의 양을 의미하며, 유효량의 수준은 대상체의 연령, 성별, 민감도, 주입 시간, 주름의 상태 등을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소 등에 따라 시술자에 의해 결정될 수 있다.
- [71] 또한, 필러의 주입 횟수는 예를 들어 1회, 복수 회, 및/또는 하나 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.
- [72] 본 발명에서 "대상체"는 특정한 병태 또는 질환 치료를 필요로 하는 개체 또는 환자를 의미하며, 상기 대상체는 포유류이며 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [73] 본 발명에서 필러는 메조페라피(mesotherapy) 요법으로 주사되는 메조필러(mesofiller)일 수 있다.
- [74] 본 발명에서 "메조테라피(mesotherapy)"는 필러를 목표하는 부위에 직접적으로 주입하는 주사요법으로, 피부의 중간층(피부 진피층)에 미세한 주사기로 아주 소량의 필러를 주입함으로써 부작용은 최소화하고 효과를 높이고 지속기간을 늘리는 것을 목표로 하는 주사요법을 의미한다.
- [75] 본 발명에서 "메조필러(mesofiller)"는 메조테라피와 필러의 합성어로 피부 진피층의 섬유 조직 사이에 필러를 주입하여 주름을 펴는 용도로 사용되며, 피부를 재생시키고 탄력과 잔주름을 개선하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [76] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 필러가 충전된 프리실드시린지를 제공한다.
- [77] 본 명세서에서 필러 및 프리실드시린지와 관련된 구체적인 내용은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 필러 제조방법에서 언급한 바와 같으며, 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 별도의 서술을 생략한다.

발명의 효과

- [78] 본 발명의 필러 제조방법은 낮은 함량의 DNA 분획물 및 히알루론산을 사용함에도 불구하고 제조된 필러의 물리적 지지체로서 점탄성을 확보할 수 있게 한다.
- [79] 또한, 본 발명의 필러 제조방법은 제균단계에서 DNA 분획물 함량의 변화를 막을 수 있으므로, 제조된 필러는 종래 제품 대비 낮은 함량의 DNA 분획물을 사용하여 제조된 것임에도 불구하고 피부의 두께 및 피부 주름 개선 효과, 콜라겐 형성능 등이 우수하다.
- [80] 또한, 본 발명의 필러 제조방법은 낮은 함량의 DNA 분획물을 사용하므로, 제조된 필러는 종래 사용되어 오던 필러 대비 통증이 낮아 환자의 시술 만족도가 높고 시술자의 편의성 또한 높다.
- [81] 또한, 본 발명의 필러 제조방법은 미가교 히알루론산을 사용하므로 가교제 제거를 위한 세척, 가교제 잔류량 확인 등의 단계가 요구되지 않아 제조공정상 효율이 우수하며, 제조된 필러는 가교제 사용에 따른 염증반응이 없어 안전성이

우수하다.

도면의 간단한 설명

[82] 도 1은 실험예 7에서 실시예 3의 필러 샘플과 타사 제품의 생체 내 분해 속도를 비교한 그래프이다.

[83] 도 2는 실험예 8에서 실시예 2 및 비교예 4 내지 6의 필러 샘플의 (a) 제조 직후 모습과, (b) 35°C에서 2주 동안 방치한 후 모습을 나타낸 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

[84] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서에서 특별히 정의되지 않은 용어들에 대해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것으로 이해되어야 할 것이다.

[85]

[86] 실시예 1 및 비교예 1-3

[87] 폴리뉴클레오타이드 나트륨(제조사: HTL, 분자량: 1,800 내지 2,300 kDa) 6.25 g을 주사용수 또는 인산완충수용액에 각각 용해시켜 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 농도가 1.25%(w/v)이며, 용액의 부피는 500 mL, pH는 6.0 내지 8.0이 되도록 하였다. 이후 용해가 완료된 용액을 미처리, 습윤멸균(121°C 20분) 또는 제균필터(0.2 μ m, PES)를 이용하여 각각 전처리 하였다.

[88] 각 실시예 및 비교예에서 사용된 용매 및 처리방법은 하기 표와 같다.

[89]

[90] [표1]

	용매	처리방법
실시예 1	주사용수	제균필터
비교예 1	주사용수	미처리
비교예 2	주사용수	습윤멸균
비교예 3	인산완충수용액	제균필터

[91]

[92] 실험예 1. 유변학적 특성 분석

[93] 상기 제조된 필러에 대해 용매 및 처리방법에 따른 유변학적 특성을 분석하기 위해 Rheometer (KNX2210, MALVERN, U.K.)를 사용하였으며, 결과는 하기 표에 나타내었다.

[94] 조직수복용 필러는 피부주입 후 물리적 지지체 역할을 하므로, G' (Storage modulus, 저장탄성률)과 η^* (Complex viscosity, 복소점도)의 값을 가장 중요한 인자로 보았다.

[95]

[96] [표2]

	G*(Pa)	G'(Pa)	G''(Pa)	η^*(Pa·s)	$\delta(^{\circ})$
실시예 1	3.39305	1.3815	3.099	0.54005	65.975
비교예 2	0.08717	0.086865	0.0071915	0.01387	-4.805
비교예 3	7.8095	6.3585	4.5345	1.243	35.49

[97]

[98] 상기 표에서 나타낸 바와 같이, 제조방법에서 제균필터를 적용한 실시예 1의 필터 대비 습윤멸균 방식을 적용한 비교예 2는 매우 낮은 복소점도를 나타내어 피부주입 후 물리적 지지체 역할을 해야하는 조직수복용 필터로서 적합하지 않음을 확인하였다.

[99] 또한, 용매로서 인산완충수용액을 사용한 비교예 3의 경우, 매우 높은 저장탄성을 및 복소점도를 나타냈으며, 특히, 제균과정에서 필터링 속도가 매우 느리고 빠르게 막히는 현상이 발생하여 본 발명의 필터 제조방법에 적용하기에 적합하지 않았다.

[100]

[101] **실험예 2. 폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량 측정**

[102] 상기 제조된 필터에 대해 처리방법에 따른 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 함량 변화를 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 함량을 측정하였으며, 결과는 하기 표에 나타내었다.

[103]

[104] [표3]

	폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량(%)
실시예 1	107.72
비교예 1	106.73
비교예 2	94.87

[105]

[106] 상기 표에 나타낸 바와 같이, 제조방법에서 제균필터를 적용한 실시예 1의 필터는 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 함량이 미처리군과 유사하여 제균필터 방식은 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 함량에 영향을 주지 않았으나, 습윤멸균 방식을 적용한 비교예 2는 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 함량이 크게 감소함을 확인하였다.

[107]

[108] **실시예 2 및 비교예 4-6**[109] **(1) 실시예 2의 제조**

[110] 폴리뉴클레오타이드 나트륨(제조사: HTL, 분자량: 1,800 내지 2,300 kDa) 6.25

g을 주사용수에 용해시킨 후, 용해가 완료된 용액을 제균필터(0.2 μ m, PES)를 이용하여 전처리 하였다.

[111] 이후, 상기 용액에 미가교 히알루론산 나트륨(분자량: 700 내지 1,200 kDa)을 완전히 용해시킨 후, 농축된 인산완충수용액을 첨가하여 용액의 부피는 500 mL, pH는 6.0 내지 8.0이 되게 하였으며, 최종 폴리뉴클레오타이드 나트륨 및 미가교 히알루론산 나트륨 농도가 각각 10 mg/ml 및 3 mg/ml인 실시예 2의 필터를 제조하였다.

[112]

[113] (2) 비교예 4-6의 제조

[114] 폴리뉴클레오타이드 나트륨(제조사: HTL, 분자량: 1,800 내지 2,300 kDa) 및 미가교 히알루론산 나트륨(분자량: 700 내지 1,200 kDa)을 함께 인산완충수용액에 혼합하여 용해시켜 비교예 4의 필터를 제조하였다.

[115] 또한, 폴리뉴클레오타이드 나트륨 및 미가교 히알루론산 나트륨을 함께 인산완충수용액에 혼합하여 용해시킨 후, 습윤멸균(121°C 20분) 또는 제균필터(0.2 μ m, PES)를 이용한 제균을 통해 각각 비교예 5(습윤멸균) 및 비교예 6(제균필터)의 필터를 각각 제조하였다.

[116] 상기 비교예의 최종 폴리뉴클레오타이드 나트륨 및 미가교 히알루론산 나트륨 농도는 각각 10 mg/ml 및 3 mg/ml가 되도록 하였다.

[117]

[118] 실험예 3. 유변학적 특성 분석

[119] 상기 제조된 필터의 제조방법에 따른 유변학적 특성 분석을 위해 Rheometer (KNX2210, MALVERN, U.K.)를 사용하였으며, 결과는 하기 표에 나타내었다.

[120]

[121] [표4]

	G*(Pa)	G'(Pa)	G''(Pa)	η^* (Pa·s)	$\delta(^{\circ})$
실시예 2	8.094	5.712	5.734	1.288	45.11
비교예 5	0.1084	0.07653	0.07679	0.01725	45.1
비교예 6	6.682	4.365	5.0585	1.0635	49.22

[122]

[123] 상기 표에 나타난 바와 같이, 폴리뉴클레오타이드 나트륨을 주사용수에 용해한 후 단계별로 처리하여 제조한 실시예 2 대비 폴리뉴클레오타이드 나트륨 및 히알루론산 나트륨을 동시에 용해시킨 후, 각각 습윤멸균과 제균필터를 이용하여 처리한 비교예 5 및 6의 경우에는 점탄성적 특징이 감소하였으며, 특히, 멸균 처리하여 제조한 비교예 5의 경우 매우 낮은 복소점도를 나타내어 피부주입 후 물리적 지지체 역할을 해야하는 조직수복용 필터로서 적합하지 않음을 확인하였다.

[124] 또한, 비교예 6의 경우, 제균과정에서 필터링 속도가 매우 느리고 필터가 빠르게 막히는 현상이 발생하여 제조효율상 문제점이 있음을 확인하였다.

[125]

[126] **실험예 4. 폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량 확인**

[127] 상기 제조된 필터의 제조방법에 따른 주성분의 함량 변화를 확인하기 위해 HPLC를 사용하여 폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량을 측정하였으며, 결과는 하기 표에 나타내었다.

[128]

[129] [표5]

	폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량(%)
실시예 2	106.92
비교예 4	107.02
비교예 5	101.23
비교예 6	104.04

[130]

[131] 상기 표에 나타난 바와 같이, 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 실시예 2의 필터는 단순 혼합 후 별도의 제균을 하지 않은 비교예 4와 유사한 폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량을 나타내어 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 함량의 영향을 주지 않았으나, 폴리뉴클레오타이드 나트륨과 미가교 히알루론산 나트륨을 함께 혼합한 후 멸균 또는 제균 처리한 비교예 5 및 6의 경우, 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 함량이 감소함을 확인하였다.

[132] 이는 필터 제조에 있어 공정의 순서에 따라 최종 필터에 포함된 유효성분인 폴리뉴클레오타이드 나트륨의 함량이 달라질 수 있음을 의미한다.

[133]

[134] **실험예 5. 주사압 측정**

[135] 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 필터가 주사용으로 사용 시 환자에 대한 적응도가 높을지 여부에 대해서는 주사압(주입력)의 분석을 통해 확인하였으며, 결과는 하기 표에 나타내었다.

[136] 주사압의 측정에는 인장강도계(JSV H1000, JISC, JAPAN)를 사용하였으며, 주사침은 33G이며, 시험속도는 5 mm/min과 30 mm/min이었다.

[137]

[138] [표6]

	5 mm/min	30 mm/min
실시예 2	4.19 N	10.38 N

[139]

- [140] 상기 표에 나타난 바와 같이, 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 필러는 낮은 주사압을 가진다는 것을 확인하였으며, 이는 환자에게 주사 시 통증이 덜하고 시술자의 편의성이 증대될 수 있음을 확인한 것이다.
- [141]
- [142] **실시예 3**
- [143] 폴리뉴클레오타이드 나트륨(제조사: HTL, 분자량: 1,800 내지 2,300 kDa) 6.25 g을 주사용수에 완전히 용해시킨 후 제균필터하고, 미가교 히알루론산 나트륨(분자량: 700 내지 1,200 kDa)과 농축된 인산완충수용액을 첨가하여 용액의 부피는 500 mL, pH는 6.0 내지 8.0가 되게 하였으며, 최종 폴리뉴클레오타이드 나트륨 및 미가교 히알루론산 나트륨 농도가 각각 10 mg/ml 및 3 mg/ml인 실시예 3의 필러를 제조하였다.
- [144]
- [145] **실험예 6. 주름 개선 및 콜라겐 생성능 평가**
- [146] 본 실험에서는 동물 효능평가를 통해 주름 개선 및 콜라겐 생성능을 비교평가하고자 하였다.
- [147] 구체적으로 SKH-1-Hairless 마우스를 사용하여 상기 제조한 실시예 3의 필러를 주입 후 1개월 동안 투여 부위의 부피 측정 및 조직병리 평가를 진행하였으며, 대조군으로는 기존에 판매중인 폴리뉴클레오타이드 필러 제품(폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량 2%)을 사용하였다.
- [148] 결과는 하기 표에 나타내었다.
- [149]
- [150] [표7]

	Total Skin Thickness* (μm)	Epidermal Thickness (μm)	Epidermal Microfolds (microfold/mm)	Collagen Fibers (%/mm ²)
실시예 3	4.93	24.89	15.6	10.80
타사제품	4.76	21.55	17.55	6.81

- [151] (* Total Skin Thickness는 1/100의 값으로 표시)
- [152]
- [153] 상기 표에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 필러는 피부의 두께, 피부 주름 개선 효과 및 콜라겐 형성 효과가 타사제품 대비 모두 우수한 것으로 확인되었다.
- [154] 한편, 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 실시예 3의 필러는 주사 후 남아있는 물질(Remnant Materials)은 확인되지 않았으며, 실시예 3의 주사에 의한 이물/이상반응도 시험기간(1개월)동안에 관찰되지 않아 안전성 역시 높다는 점을 확인하였다.

[155]

[156] 실험예 7. 생체 내 분해 속도 및 부피 변화 평가

[157] 본 실험에서는 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 필러의 생체 내 분해되는 속도를 종래 필러와 비교평가하고자 하였다.

[158] 구체적으로 SKH-1-Hairless 마우스를 사용하여 상기 제조한 실시예 3의 필러를 주입한 후, 주입액의 부피 변화를 30 시간 동안 관찰하였으며, 대조군으로는 기존에 판매중인 폴리뉴클레오타이드 필러 제품(폴리뉴클레오타이드 나트륨 함량 2%)을 사용하였다. 결과는 도 1에 나타내었다.

[159] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 30 시간 동안 관찰 후, 추세선을 사용하여 완전히 분해될때까지의 시간을 예측한 결과, 실시예 3는 완전 분해되는 시간이 약 34시간으로, 기존에 판매중인 타사제품보다 낮은 농도의 폴리뉴클레오타이드 사용했음에도 체내 분해 속도에 있어서 완전 분해 예측 시간인 약 37시간인 타사제품과 큰 차이가 나지 않았다.

[160] 또한, 필러의 볼륨 변화를 Folliscope와 PRIMOS를 이용하여 육안적으로 관찰하였을 때, 타사제품은 주입형태가 그대로 유지한 채 작아진 반면, 실시예 3는 더 자연스럽게 옆으로 퍼지면서 줄어들어 피부주입용 필러로서 심미적인 안정성도 갖춘 것으로 확인되었다.

[161]

[162] 실험예 8. 폴리뉴클레오타이드와 미가교 히알루론산의 혼합 및 멸균 단계 차이에 따른 효과 확인

[163] 본 실험에서는 실시예 2의 필러와 비교예 4 내지 6의 필러를 이용하여, 폴리뉴클레오타이드와 미가교 히알루론산의 혼합 및 멸균 단계 순서의 차이에 따른 효과를 비교평가하고자 하였다.

[164] 구체적으로 실시예 2의 필러와 비교예 4 내지 6의 필러 샘플을 제조한 직후와, 각 필러 샘플들을 35°C에서 2주 동안 방치한 뒤 모습을 비교하여 변질 여부를 확인하였다. 결과는 도 2에 나타내었다.

[165] 도 2의 (b)에서 확인할 수 있는 바와 같이, 2주 경과 후 비교예 4의 필러 샘플은 변질되었으며, 실시예 2와 비교예 5 및 6의 필러 샘플은 변질되지 않았다.

[166] 그러나, 제조 과정을 비교하면 비교예 6의 필러 샘플은 폴리뉴클레오타이드와 미가교 히알루론산 용액을 제균 필터링 하였는데, 실시예 2의 필러 대비 필터링이 지연되어 제조 시간이 더 오래 소요되었다. 비교예 5의 필러 샘플은 121°C에서 20분 동안 습윤멸균이 필요하여, 실시예 2의 필러 대비 제조 시간이 더 오래 소요되었다.

[167] 따라서, 실시예 2의 필러 샘플은 폴리뉴클레오타이드 용액만을 빠르게 제균 필터링하고 미가교 히알루론산과 혼합함으로써, 비교예 5 및 6의 필러 샘플 대비 제조 시간을 단축함과 동시에 우수한 보존성을 갖춘 것으로 확인되었다.

청구범위

- [청구항 1] a) DNA 분획물을 용매에 혼합하여 용액을 제조하는 단계;
b) 상기 제조된 용액을 제균필터로 제균하는 단계; 및
c) 상기 제균된 용액에 히알루론산 및 pH 조절제를 혼합하는 단계;를 포함하는 필터 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 DNA 분획물은 폴리뉴클레오타이드(Polynucleotide, PN),
폴리데옥시리보뉴클레오타이드(Polydeoxyribonucleotide, PDRN) 또는
이들의 혼합물인 필터 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 DNA 분획물은 분자량이 1,800 내지 6,000 kDa인 필터 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 DNA 분획물은 최종 필터의 전체 부피 대비 0.5 %(w/v) 내지
2%(w/v)의 농도로 포함되도록 혼합되는 것인 필터 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 용매는 주사용수인 필터 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 a) 단계는 DNA 분획물을 용매에 혼합 후 교반하는 것을 더 포함하는
것인 필터 제조방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 DNA 분획물은 용매에 균일하게 분포된 것인 필터 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 제균필터는 공극 크기(pore size)가 0.2 μm 인 필터 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 히알루론산은 미가교된 것인 필터 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 히알루론산은 분자량이 100 내지 5,000 kDa인 필터 제조방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 히알루론산은 최종 필터 전체 부피 대비 0.1 %(w/v) 내지 1 %(w/v)의
농도로 포함되도록 혼합되는 것인 필터 제조방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 c) 단계는
c-1) b) 단계에서 제조된 제균된 용액에 히알루론산을 혼합하는 단계; 및
c-2) 상기 제조된 혼합물에 pH 조절제를 혼합하는 단계;를 포함하는 것인
필터 제조방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 제조방법은 c) 단계 이후 마취제를 혼합하는 단계를 더 포함하는

- 것인 필터 제조방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 마취제는 리도카인 또는 이의 염인 필터 제조방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 마취제는 최종 필터의 전체 부피 대비 0.3 %(w/v)로 혼합되는 것인
필터 제조방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제15항의 제조방법에 의해 제조된 필터.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 필터는 레오미터로 측정 시 복소점도가 0.3 내지 3 Pa·s인 필터.
- [청구항 18] 제16항에 있어서,
상기 필터는 조직수복용인 필터.
- [청구항 19] 제16항에 있어서,
상기 필터는 얇은(mild) 주름 개선 또는 윤곽 교정용인 필터.
- [청구항 20] 제16항의 필터가 충전된 프리필드시린지.