



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월20일

(11) 등록번호 10-2731879

(24) 등록일자 2024년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)  
A61K 9/19 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 9/0051 (2013.01)  
A61K 9/146 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7013253

(22) 출원일자(국제) 2016년10월14일

심사청구일자 2021년10월13일

(85) 번역문제출일자 2018년05월10일

(65) 공개번호 10-2018-0063311

(43) 공개일자 2018년06월11일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/057019

(87) 국제공개번호 WO 2017/066554

국제공개일자 2017년04월20일

(30) 우선권주장

62/242,412 2015년10월16일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Pharmaceutical research, 24(8), 1527-1537

쪽(2007.) 1부.\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드

미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

(72) 발명자

첸 헌터

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

술래진저 에리카

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

(74) 대리인

특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 14 항

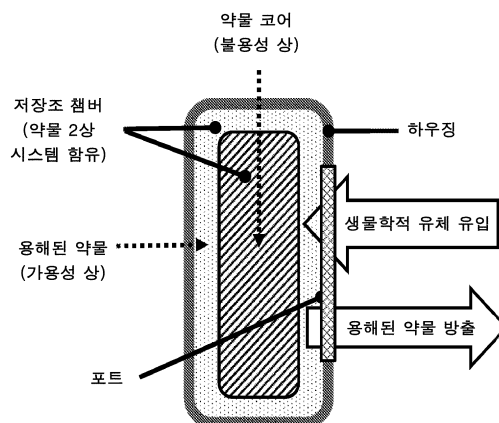
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **안정한 단백질 조성물**

## (57) 요약

안정한 약학적 제형 및 약물 전달 장치가 개시된다. 특정 구현예에서, 약물 전달 장치는 환자에게 이식될 때 조직 환경과 부분적으로 접촉하는 저장조를 함유한다. 저장조는 전달 장치의 하우징 내의 다공성 구조를 통해 환경과 접촉 상태를 유지한다. 저장조는 치료용 생체 분자와 치료용 생체 분자의 용해도를 안정화시키고 제한하는 역할을 하는 제2 분자의 조합을 함유함으로써 용액으로 존재하는 치료용 생체분자의 양을 제어한다. 가용성 치료용 생체분자의 농도 또는 다공성 구조의 표면적의 크기는 치료용 생체 분자의 표적 조직으로의 전달 속도를 제어한다.

**대표도** - 도9



(52) CPC특허분류  
**A61K 9/19** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

2상 약학적 제형으로서,

- a. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 25 mg/mL 이상의 침전제 부형제;
- b. 100 mg/mL 이상의 단백질로서, 2상 약학적 제형 내의 단백질의 총량의 50% 미만은 PEG를 함유하는 액상 중에 존재하고, 나머지 단백질은 고상 중에 존재하는, 단백질; 및
- c. 반투막으로서, 반투막은 나노다공성 또는 마이크로다공성 폴리머 필름이고, 반투막은 액상 중의 단백질을 둘러싸고, 막을 통한 액상 중의 단백질의 확산을 허용하면서 PEG를 보유하며, 액상 중의 단백질이 반투막을 통해 외부 수성 환경으로 확산되면서 고상 중의 단백질이 가용화되는, 반투막을 포함하고,

여기서 단백질은 생리학적 온도에서 30일 이상 동안 안정하며, 단백질은 애플리머셉트인, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 단백질이 100 mg/mL 내지 1400 mg/mL의 단백질인, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 PEG의 농도가 25 mg/mL 내지 150 mg/mL인, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 단백질의 농도가 100 mg/mL 내지 500 mg/mL인, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 5

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 액상 중의 단백질이 0.05 mg/mL 내지 50 mg/mL의 단백질을 포함하는, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 6

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 단백질이 25 kD 내지 160 kD의 분자량을 갖는, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 7

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 액상 중의 단백질이 생리학적 온도에서 60일 이상 동안 안정한, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 8

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 액상 중의 상기 단백질의 85% 이상이 크기-배제 크로마토그래피에 의해 결정시 생리학적 온도에서 60일째 본래 분자량을 갖는, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 9

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, PEG를 함유한 액상 중의 단백질이, PEG를 함유하지 않는 또는 폐쇄형 2상 시스템 중의 액상의 등가 농도보다 안정한, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 환경은 생리학적 환경인, 2상 약학적 제형.

#### 청구항 11

2상 약학적 제형으로서,

- a. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 침전제 부형제로서, PEG는 단백질 용해도를 50 mg/mL 미만 0.5 mg/mL 초과로 제한하는 농도에서 액상 중에 존재하는 침전제 부형제;
  - b. 100 mg/mL 내지 1400 mg/mL의 단백질로서, 단백질의 총량의 70% 미만은 PEG를 함유하는 액상 중에 존재하고, 나머지 단백질은 고상 중에 존재하는 단백질; 및
  - c. 반투막으로서, 반투막은 나노다공성 또는 마이크로다공성 폴리머 필름이고, 반투막은 액상 중의 단백질을 둘러싸고, 막을 통한 액상 중의 단백질의 확산을 허용하면서 PEG를 보유하며, 액상 중의 단백질이 반투막을 통해 외부 수성 환경으로 확산되면서 고상 중의 단백질이 가용화되는, 반투막을 포함하고,
- 여기서 상기 단백질은 생리학적 온도에서 30일 이상 동안 상기 2상 제형으로부터 방출시 안정하며, 단백질은 애플리머셉트인, 2상 약학적 제형.

## 청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 PEG는 완전히 가용성이고, 상기 고상 중에 존재하는 단백질보다 낮은 농도에서는 PEG가 액상으로만 존재하는, 2상 약학적 제형.

## 청구항 13

구성 약물을 필요로 하는 환자의 치료에 사용하기 위한 2상 약학적 제형으로서, 상기 2상 약학적 제형은,

- a. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 25 mg/mL 이상의 침전제 부형제;
- b. 100 mg/mL 이상의 단백질로서, 2상 약학적 제형 내의 단백질의 총량의 50% 미만은 PEG를 함유하는 액상으로 존재하고, 나머지 단백질은 고상으로 존재하는, 단백질; 및
- c. 반투막으로서, 반투막은 나노다공성 또는 마이크로다공성 폴리머 필름이고, 반투막은 액상 중의 단백질을 둘러싸고, 막을 통한 액상 중의 단백질의 확산을 허용하면서 PEG를 보유하며, 액상 중의 단백질이 반투막을 통해 외부 수성 환경으로 확산되면서 고상 중의 단백질이 가용화되는, 반투막을 포함하고,

여기서 상기 구성 약물은 단백질이고, 단백질은 애플리머셉트이며, 상기 액상은 생리학적 온도에서 30일 이상 동안 안정한, 2상 약학적 제형.

## 청구항 14

청구항 1, 11 또는 13에 있어서, 상기 생리학적 온도는 25℃ 내지 45℃의 범위인, 2상 약학적 제형.

## 청구항 15

삭제

## 청구항 16

삭제

## 청구항 17

삭제

## 청구항 18

삭제

## 청구항 19

삭제

## 청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 장시간 동안 안정한 단백질을 제조하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 치료용 단백질의 장시간 방출을 위해 생리학적 온도에서 안정한 상태로 유지되는 치료용 단백질 제형을 제조하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 생물학적으로 관련된 표적을 향한 치료용 단백질의 장시간 방출 전달은 의학적 상태 예를 들어 암, 심혈관 질환, 혈관 상태, 정형외과 장애, 치아 장애, 상처, 자가면역 질환, 위장 장애 및 안구 질환의 치료에 바람직하다. 생체적합성 및 생체분해성 폴리머 및 약물의 제어되고 장기간 전달을 위한 다른 이식가능한 전달 장치는 수십 년 동안 사용되어왔다. 예를 들어, 일부 폴리머-계 전달 장치에서, 폴리머가 시간 경과에 따라 분해됨에 따라, 치료용 약물은 서서히 방출된다.

[0003] 장기간 방출은 환자의 순응을 위해 바람직할 수 있다. 특히, 안구내 치료제의 경우와 같이 구체적으로 의사가

주사해야 하는 경우 주사 횟수를 줄이는 것이 효과적일 수 있다. 가능한 한 적은 주사로 시간이 지남에 따라 효과적으로 약물을 전달할 수 있는 장기간 방출 제형에 대한 의학적 요구가 충족되지 않고 있다. 예를 들어, 암 및 염증 질환과 같은 다른 질환의 경우, 안정하고 효과적인 단백질 치료제를 함유하는 개선된 이식가능한 장기간 방출 제형이 필요하다.

[0004] 항체 및 수용체 Fc-융합 단백질과 같은 치료용 거대분자는 분자를 환자에게 투여하기에 적합할 뿐만 아니라 저장 동안 및 투여 현장에서 안정성을 유지하는 방식으로 제형화되어야 한다. 예를 들어, 용액이 적절하게 제형화되지 않는 한, 액체 용액 중의 치료용 단백질(예컨대 항체)은 분해, 응집 및/또는 바람직하지 않은 화학적 변형을 일으키기 쉽다. 액체 제형에서 단백질 치료제의 안정성은 제형에 사용된 부형제의 종류 및 상기 부형제들의 서로에 대한 양 및 비율뿐만 아니라 가용성 단백질의 농도에 의존한다. 치료용 단백질 제형을 제조하는 경우 안정성 이외의 고려사항도 고려해야 한다. 이러한 추가적인 고려사항의 예로는 주어진 제형에 의해 수용될 수 있는 용액의 점도 및 항체의 농도가 포함된다. 따라서, 장기간 방출을 위한 치료용 단백질을 제형화하는 경우, 시간이 지나면서 저장 및 생리학적 온도에서 안정하게 유지되고 적절한 농도의 항체를 함유하며 제형이 환자에게 편리하게 투여될 수 있는 다른 특성을 보유하는 제형에 도달하도록 세심한 주의를 기울여야만 한다.

[0005] 소분자 제형은 PEG를 사용할 수 있지만, 보다 큰 단백질의 경우 PEG는 침전을 일으키는 것으로 알려져 있다. PEG는 단백질을 침전시켜 완충제의 정화, 농축 및 교환을 용이하게 하는 데 사용된다. PEG는 또한 생체물리학적 분석을 위해 단백질을 결정화하는 데 사용된다. PEG는 또한 교반 스트레스로부터 단백질을 보호하기 위한 부형제로서 소량(예컨대, 일반적으로 3% w/v 이하)으로 사용된다. PEG에 의한 단백질 침전은 또한 단백질을 응집시키고 단백질 기능에 유해한 것으로 알려져 있다.

### 발명의 내용

[0006] 일 측면에서, 본 발명은 적어도 25 mg/mL의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 적어도 100 mg/mL의 단백질을 함유하는 2상 약학적 제형을 제공하며, 여기서 50 mg/mL 미만의 단백질은 가용성 상으로 존재하고, 나머지 단백질은 불용성 상으로 존재한다. 가용성 상과 불용성 상 모두에서의 단백질은 생리학적 온도에서 적어도 30일 동안 안정하고 가용성 상 단백질은 단백질의 농도가 보다 낮은 환경에 접근할 수 있다. 일 구현예에서, 반투막 또는 다른 다공성 구조는 상기 환경에 대한 단백질의 접근을 제공한다.

[0007] 일 측면에서, 본 발명은 적어도 25 mg/mL의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 0.1 mg/mL 내지 1400 mg/mL의 단백질을 함유하는 2상 약학적 제형을 제공하며, 여기서 단백질의 총량의 50% 미만은 가용성 상으로 존재하고 나머지 단백질은 불용성 상으로 존재한다. 가용성 상과 불용성 상 모두에서의 단백질은 생리학적 온도에서 적어도 30일 동안 안정하고 가용성 상 단백질은 단백질의 농도가 보다 낮은 환경에 접근할 수 있다. 일 구현예에서, 반투막 또는 다른 다공성 구조는 상기 환경에 대한 단백질의 접근을 제공한다.

[0008] 일 측면에서, 본 발명은 생리학적 온도에서 장시간에 걸쳐 안정하게 유지되는 약물의 장기간 전달을 위한 약물 전달 장치를 제공한다. 본 발명의 약물 전달 장치는 안정한 2상 약학적 제형, 상기 안정한 2상 약학적 제형을 함유하는 저장조 챔버, 상기 저장조 챔버를 둘러싸는 하우징, 및 상기 저장조 챔버로부터 외부 수성 환경으로 약물을 확산시킬 수 있는 상기 하우징 내의 반투막 또는 다른 다공성 구조를 포함한다. 상기 측면에서, 안정한 2상 약학적 제형은 약 25 mg/mL의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 약물인 0.1 mg/mL 내지 1,400 mg/mL 이상의 단백질, 50% 미만의 단백질 및 소정 양의 상기 PEG를 함유하는 가용성 상, 및 상기 가용성 상으로 존재하지 않는 나머지 양의 단백질을 함유하는 불용성 상을 함유한다. 본 발명의 상기 양태에서, 가용성 상 및 불용성 상 중의 단백질은 생리학적 온도에서 적어도 30일 동안 안정하다.

[0009] 일 측면에서, 본 발명은 약학적 단백질에 대해 장기간 방출을 제공하는 방법을 제공한다. 이러한 측면에 따르면, 단백질은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 적어도 100 mg/mL 단백질 및 적어도 50 mg/mL PEG의 최종 농도로 혼합되어 2상 혼합물을 형성한다. 일 구현예에서, 상기 단백질은 고체 상태의 PEG와 조합되어 상기 단백질의 최종 농도가 총 부피당 단백질의 질량을 나타내도록 한다. 상기 2상 혼합물은 단백질을 불용성 형태 및 가용성 형태로 함유한다. 일 구현예에서, 총 단백질 양의 50% 미만이 소정 양의 PEG와 함께 가용성 형태이다. 상기 측면에 따르면, 가용성 단백질은 단백질 농도가 낮은 외부 환경에 접근할 수 있다. 일 구현예에서, 반투막 또는 다른 다공성 구조는 외부 환경에 대한 단백질의 접근을 제공한다. 시간이 지남에 따라 단백질은 반투막 또는 다른 다공성 구조를 통해 주변 수성 환경으로 확산되며 2상 혼합물 중의 전체 단백질 농도는 결국 100 mg/mL 미만으로 감소한다. 그러나, 가용성 상은 불용성 상이 고갈되고 가용성 상 중의 단백질 농도가 용해도 한계 밑으로 떨어질 때까지 일정한 소정의 단백질 농도를 가질 것이다. 가용성 상 중의 소정의 단백질 농도는 PEG의 존재 하에

서의 단백질의 용해도 및 저장조 내의 PEG 농도에 기초한다.

[0010]

일 측면에서, 본 발명은 구성 약물을 필요로 하는 환자의 치료에 사용하기 위한 2상 약학적 제형을 제공한다. 본 발명은 또한 2상 약학적 제형을 환자에게 투여함으로써 구성 약물을 필요로 하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 2상 약학적 제형은 환자에게 이식되는 저장조 장치에 함유된다. 일 구현예에서, 2상 약학적 제형은 적어도 25 mg/mL의 PEG 및 적어도 100 mg/mL의 구성 약물(이는 단백질임)을 함유한다. 소정 양의 PEG와 함께 50% 미만의 약물이 가용성 상으로 존재한다. 나머지 약물은 불용성 상으로 존재한다. 가용성 약물은 다른 다공성 구조의 반투막을 통해 보다 낮은 농도의 약물(예컨대, 장치 외부의 환자 조직 또는 수성 유체)을 갖는 환경에 접근하여 환자의 표적으로 확산한다. 저장조 장치에 함유된 2상 약학적 제형의 일부 구현예에서, 가용성 약물은 반투막과 같은 포트를 통해 환경에 접근할 수 있다. 이러한 측면에 따르면, 약물은 생리학적 조건 하에서 적어도 30일 동안 안정하고, 약물이 2상 약학적 제형으로부터 확산됨에 따라 제형 내의 약물의 양은 초기 농도 밑으로 감소한다.

### 도면의 간단한 설명

[0011]

도 1은 가용성 단백질 농도에 대한 다양한 부형제의 영향을 나타낸 선 그래프이다. X-축은 밀리리터 당 밀리그램(mg/mL) 단위의 부형제 농도를 나타낸다. 백색 사각형(□)은 텍스트란 6000 부형제를 나타내고; 백색 다이아몬드(◇)는 텍스트란 40000 부형제를 나타내고; 흑색 다이아몬드(◆)는 폴리에틸렌 글리콜 3,350 MW(PEG3350) 부형제를 나타내고; 흑색 사각형(■)은 PEG8000 부형제를 나타내고; 흑색 삼각형(▲)은 PEG20000 부형제를 나타낸다. Y-축은 mg/mL 단위의 단백질 농도 로그를 나타낸다.

도 2는 mg/mL(X-축)의 폴리에틸렌 글리콜 농도가 mg/mL(Y-축)로 표시된 단백질 용해도에 미치는 영향을 나타낸 선 그래프이다.

도 3은 다양한 분자량 형태의 PEG 부형제가 가용성 단백질 농도에 미치는 영향을 나타낸 선 그래프이다. X-축은 밀리리터 당 밀리그램(mg/mL) 단위의 부형제 농도를 나타낸다. 실선은 PEG3350 부형제를 나타내고; 점선은 PEG8000 부형제를 나타내고; 파선은 PEG20000 부형제를 나타낸다. Y-축은 mg/mL 단위의 단백질 농도 로그를 나타낸다.

도 4는 인산-완충 식염수(pH 7.2)에서 37°C에서 상이한 분자량 형태의 PEG 80 mg/mL의 존재하에 4.5 mg/mL 수성 농도(30 mg/mL의 총 농도)의 2상 단백질의 안정성을 배양 시간의 함수로서 나타낸 선 그래프이다. 실선은 PEG3350 부형제를 나타내고; 파선은 PEG8000 부형제를 나타내고; 점선은 PEG20000 부형제를 나타낸다. X-축은 주간 단위의 배양 시간을 나타낸다. Y-축은 본래의 입체구조(예상된 유체역학 반경)를 갖는 단백질의 상대적 비율을 나타낸다.

도 5는 37°C에서 상이한 양의 PEG3350의 존재하에 가용성 단백질의 안정성을 배양 시간의 함수로서 나타낸 선 그래프이다. 실선 및 흑색 사각형(■)은 4.5 mg/mL 단백질을 함유하고 PEG를 함유하지 않은 대조군을 나타내고; 실선 및 흑색 원(●)은 10 mg/mL 단백질을 함유하고 PEG를 함유하지 않은 대조군을 나타내고; 파선 및 흑색 삼각형(▲)은 80 mg/mL PEG3350 및 4.5 mg/mL 가용성 단백질을 나타내고; 파선 및 흑색 사각형(■)은 65 mg/mL PEG3350 및 10 mg/mL 가용성 단백질을 나타낸다. X-축은 주간 단위의 배양 시간을 나타낸다. Y-축은 본래의 입체구조(예상된 유체역학 반경)를 갖는 단백질의 상대적 비율을 나타낸다.

도 6a는 37°C에서 PEG3350의 존재하에 1상 가용성 단백질과 2상 가용성 단백질의 안정성을 배양 시간의 함수로서 나타낸 선 그래프이다. 흑색 사각형(■)의 데이터 점은 4.5 mg/mL 단백질을 함유하고 PEG를 함유하지 않은 대조군 샘플을 나타내고; 흑색 삼각형(▲)의 데이터 점은 4.5 mg/mL의 농도의 1상 가용성 단백질 및 약 80 mg/mL의 PEG3350을 나타내고; 흑색 원(●)의 데이터 점은 4.5 mg/mL의 농도의 2상 가용성 단백질, 약 80 mg/mL의 PEG3350 및 25.5 mg/mL의 2상 불용성 단백질을 나타낸다. X-축은 주간 단위의 배양 시간을 나타낸다. Y-축은 본래의 입체구조(예상된 유체역학 반경)를 갖는 단백질의 상대적 비율을 나타낸다.

도 6b는 37°C에서 PEG3350의 존재하에 1상 가용성 단백질과 2상 가용성 단백질의 안정성을 배양 시간의 함수로서 나타낸 선 그래프이다. 흑색 원(●)의 데이터 점은 10 mg/mL 단백질을 함유하고 PEG를 함유하지 않은 대조군 샘플을 나타내고; 흑색 사각형(■)의 데이터 점은 10 mg/mL의 농도의 단상 가용성 단백질 및 약 65 mg/mL의 PEG3350을 나타내고; 흑색 다이아몬드(◆)의 데이터 점은 10 mg/mL의 농도의 2상 가용성 단백질, 약 65 mg/mL의 PEG3350 및 20 mg/mL의 2상 불용성 단백질을 나타낸다. X-축은 주간 단위의 배양 시간을 나타낸다. Y-축은 본래의 입체구조(예상된 유체역학 반경)를 갖는 단백질의 상대적 백분율을 나타낸다.

도 7은 37℃에서 150 mg/mL의 PEG3350의 존재하에 불용성 단백질의 안정성을 배양 시간의 함수로서 나타낸 선 그래프이다. 150 mg/mL PEG3350의 존재하에 30 mg/mL의 불용성 단백질은 흑색 다이아몬드(◆)의 짧은 점선으로 표시된다. 150 mg/mL PEG3350의 존재하에 60 mg/mL의 불용성 단백질은 흑색 사각형(■)의 실선으로 표시된다. 150 mg/mL PEG3350의 존재하에 120 mg/mL의 불용성 단백질은 흑색 삼각형(▲)의 점선으로 표시된다. X-축은 주간 단위의 배양 시간을 나타낸다. Y-축은 전체 단백질에 비해 고분자량을 갖는 단백질의 비율을 나타낸다. 37℃에서 2주간 배양한 후, 불용성 단백질은 완전히 회수되지 않았고 정확한 수준의 응집체를 결정할 수 없었다.

도 8은 단백질 농도가 단백질 응집 속도 및 고분자량 종의 형성에 미치는 영향 및 예상되는 영향을 나타낸 선 그래프이다. X-축은 단백질 농도(mg/mL)를 나타낸다. Y-축은 주간에 따른 고분자량 종 형성의 변화율을 나타낸다.

도 9는 2상 제형을 함유하는 저장조 챔버를 둘러싸는(포함하는) 외부 하우징을 포함하는 저장조 장치의 개략도를 도시한다. 하우징에는 저장조로부터 약물을 내보내는 포트가 있다.

도 10은 mg/mL 단위로 표시된 애플리버셉트(aflibercept)(VEGF 트랩)의 용해도를 PEG 3350 농도의 함수로서 도시한다. 백색 원(○)은 재구성된 고체(건조) 애플리버셉트(수크로오스 포함)와 이후 수화된 건조 PEG의 용해도를 나타낸다. 흑색 원(●)은 수크로오스가 없는 PEG 및 애플리버셉트의 액체 제형의 용해도를 나타낸다.

도 11은 로그(mg/mL) 단위로 표시된 애플리버셉트의 용해도를 PEG 3350 농도의 함수로서 도시한다. 백색 사각형(□)은 건조 애플리버셉트(수크로오스 포함)와 이후 수화된 건조 PEG의 조합을 나타낸다. 다이아몬드(◇)는 수크로오스가 없는 PEG 용액과 애플리버셉트 용액의 조합을 나타낸다.

도 12는 다공성 구조 표면적의 제곱 밀리미터 당 하루에 방출된 밀리그램 단위로 표현된 애플리버셉트의 방출 속도를 가용성 애플리버셉트의 농도의 함수로서 나타낸다.

도 13은 가용성 애플리버셉트의 mg/mL 당 하루에 방출된 밀리그램 단위로 표현된 애플리버셉트의 방출 속도를 다공성 구조의 표면적의 함수로서 나타낸다.

도 14는 생리학적 온도 및 pH에서 밀리그램(다이아몬드[◇])으로 표현된 애플리버셉트의 누적 방출 및 크기-배제 크로마토그래피(사각형[□])로 결정시 본래 입체형태로 표현된 애플리버셉트의 안정성을 시간의 함수로서 나타낸다. 도 14a는 100(±3) mg/mL PEG 3350(n = 2)에 대한 결과를 나타낸다. 도 14b는 70(±3) mg/mL PEG 3350(n = 4)에 대한 결과를 나타낸다.

도 15는 방출된 애플리버셉트의 안정성을 시간의 함수로서 도시한다. X-축은 생리학적 온도에서의 시간을 일 수로 도시한다. Y-축은 샘플에 남아있는 본래 애플리버셉트의 상대적 양을 도시한다(%순도). 흑색 삼각형(▲)은 80 mg/mL ± 20 mg/mL PEG3350을 함유하는 제형으로부터 방출된 애플리버셉트를 나타낸다. 흑색 원(●)은 수크로오스만을 함유하는 제형(PEG 없음)으로부터 방출된 애플리버셉트를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 기재된 특정 방법 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 이러한 방법 및 조건은 다양할 수 있다. 또한, 본 발명의 범주는 청구범위에 의해 한정되는 것으로, 본원에 사용된 용어는 특정 구현예만을 기술하기 위한 것이고 제한적인 의도는 아님을 이해해야 한다.
- [0013] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 균등한 어떠한 방법 및 물질이라도 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 이하에서는 특정 방법 및 물질이 기재된다. 언급된 모든 간행물이 본원에 참고로 인용된다.
- [0014] **2상 시스템**
- [0015] 단백질 생물치료제를 고 농도로 제형화하면 생물약학적 산업에 심각한 도전이 된다. 고 농도(예컨대 50 mg/mL 초과)의 단백질은 불안정하고 응집 속도가 증가하는 경향이 있다. 이것은 특히 높은 수준의 약물이 요구되는 장기간 방출 제형에 문제가 된다. 장기간 방출 제형은 생리학적 환경에서 장시간 약물을 방출하도록 고안되었기 때문에, 이러한 약물은 장기간 동안 안정적이고 생물학적으로 활성이어야 한다.
- [0016] 본 발명은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 단백질을 결합시켜 액체 포화된 가용성 형태의 단백질과 평형을 이룬 고체

침전물 형태의 안정한 단백질을 제공하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 가용성 상은 보다 낮은 농도의 단백질을 갖는 환경에 접근할 수 있으며, 즉 이 시스템은 개방형이며 폐쇄형이 아니다. 어떤 메커니즘에 의해서도 제한을 받지는 않지만, 이론적으로, 상기 단백질은 두 상 모두에서 안정적이며 불용성 상의 단백질은 가용성 상을 공급하고 차례로 반투막을 통해 단백질의 확산을 유도한다. 단백질 안정성은 저장조로부터 확산되는 단백질을 의미한다. 일 측면에서, 개방형 2상 시스템은 반투막 또는 다른 다공성 구조가 단백질의 확산을 허용하면서 PEG를 우선적으로 보유하도록 허용한다.

[0017] 개방형 시스템의 한 예는 가용성 형태의 단백질이 외부 환경에 접근할 수 있게 하고 가용성 형태의 단백질이 시간이 지남에 따라 방출되도록 하는 다공성 벽을 갖는 장치이다. 일부 구현예에서, 가용성 상은 반투막 또는 다른 다공성 구조와 같은 포트를 통해 환경에 접근한다. 본 발명의 반투막은 물과 단백질의 자유로운 통과를 허용한다. 일부 구현예에서, 반투막은 나노기공 및/또는 마이크로기공을 포함한다. 일부 구현예에서, 반투막은 나노 다공성 및/또는 마이크로다공성 폴리머 필름이다.

[0018] 일부 구현예에서, PEG의 최종 농도는 25 mg/mL 이상이다. 일부 구현예에서, 비용해된 및 용해된 형태의 단백질 농도는 100 mg/mL 이상이다. 일부 구현예에서, 단백질은 동결 건조된 단백질 또는 분무-건조된 단백질과 같은 고체 형태의 PEG와 조합된다.

[0019] 본 발명은 안정한 약물의 장기간 전달을 위한 2상 시스템을 포함한다. 2상(biphasic)이란 약물이 두 가지 상: 불용성(침전된) 또는 고상, 및 가용성 또는 액상으로 존재한다는 것을 의미한다. 불용성 상은 약물 저장조로서 작용하고, 가용성 상은 생리학적 시스템 내로 확산되어 생리학적 표적과 접촉하는 약물의 활성 형태로서 작용한다. 바이알에서와 같이 폐쇄형 2상 시스템에서, 가용성 상은 침전물과 평형 상태에 있는 약물의 포화 용액이다. 그러나, 개방형 2상 시스템에서, 외부 수성 환경에 접근할 수 있는 가용성 약물이 포화된 가용성 상으로부터 확산함에 따라, 침전된 약물의 일부가 가용화되고 포화된 가용성 상으로 유입되어 환경으로 확산된 가용성 약물을 대체한다. 침전된 상 중의 단백질은 서서히 가용화되어 포화된 상과 평형을 유지하고, 즉 침전된 상은 가용성 상을 보충하고, 가용성 상은 생리학적 시스템 내로 확산되어 약물 표적과 결합한다(식 1). 침전제 부형제(즉, PEG)의 농도를 조절함으로써, 포화된 가용성 상 중의 약물의 가용성 농도가 조절된다.

[0020] 식 1: 침전물  $\rightleftharpoons$  포화 용액  $\longrightarrow$  생리학적 환경

[0021] (불용성 상) (가용성 상) (희석된 상)

[0022] 일 구현예에서, 2상 시스템은 표적 생리학적 환경에 이식된다. 예를 들어, 2상 시스템은 약물 표적 조직이 망막, 황반 또는 다른 안구 구조인 경우에 유리질 유머(humor) 내로 전달될 수 있다. 다른 표적의 경우, 상기 시스템은 피하, 경피 또는 복강내로 이식될 수 있다.

[0023] 2상 시스템은 부분적으로 장벽(barrier) 안에 둘러싸여 있다. 부분적으로 둘러싸여 있다는 것은 상기 장벽이 2상 시스템으로부터 용해된 약물의 확산을 허용한다는 것을 의미한다. 상기 장벽은 약물이 2상 시스템으로부터 확산되어 표적과 접촉할 수 있게 하지만, 증발제 부형제가 빠르게 확산되어버리는 것을 방지한다. 장벽은 특정 속도의 약물 방출을 허용하도록 설계되고 조정될 수 있다. 예를 들어, 장벽은 약물의 통과를 허용하는 기공을 함유하는 멤브레인일 수 있다. 반투막 또는 다른 다공성 구조의 전체 면적뿐만 아니라 기공의 수 및/또는 크기 또는 구조는 약물의 방출 속도를 조절하도록 설계될 수 있다.

[0024] 침전제 부형제는 약물 용출 장치의 사양에 기초하여 공지된 단백질 침전제로부터 선택될 수 있다. 통상적인 침전제는 리오토로픽(lyotropic) 염 예를 들어 황산 암모늄, 혼화성 용매 예를 들어 아세톤, 및 비-이온성 거대분자 예를 들어 텍스트란 및 PEG를 포함한다. 인클로저(enclosure) 장벽의 경우에서와 같이, 침전제의 선택은 약물의 용해도 및 가용성 상 중에 원하는 농도의 약물에 의존한다. 예를 들어, 텍스트란은 단백질을 침전시키는 데 사용되는 반면, PEG와 동일한 부형제 농도 범위에서 단백질의 용해도를 제한하지는 않는다. 도 1은 PEG 3350(흑색 다이아몬드[◆]), PEG 8000(흑색 사각형[■]), PEG 20000(흑색 삼각형[▲]), 텍스트란 6000(백색 사각형[□]) 및 텍스트란 40000(백색 다이아몬드[◇])이 단백질 용해도에 미치는 영향을 비교한 것을 도시한다. 두 분자량 형태의 텍스트란은 유사한 부형제 농도에서 PEG보다 가용성 상에서 더 많은 단백질을 남긴다는 점에 유의한다. 낮은 농도의 PEG와 동일한 수준의 단백질 침전을 달성하기 위해서는 텍스트란 농도가 더 높아야 한다. 일 구현예에서, PEG는 장기간에 걸쳐 더 적은 양의 약물을 장기간 방출하기 위해 큰 저장조를 갖는 2상 제형을 형성하는 것이 바람직하다.

[0025] 일 구현예에서, PEG는 장기간 이식가능한 개방형 2상 치료용 단백질 제형을 위한 침전제 부형제로서 선택된다.

2상 시스템의 가용성 상 내의 단백질의 농도는 PEG의 농도를 조절함으로써 제어될 수 있다. 예를 들어, 약 16 mg/mL의 150 kDa 단백질을 약 25 mg/mL 내지 약 150 mg/mL의 PEG와 조합시키면 약 14 mg/mL의 가용성 분획 내지 1 mg/mL 미만의 단백질의 농도 범위가 제공된다(도 2). 단백질 용해도에 대한 PEG의 이러한 효과는 PEG의 몰 농도에 의존하지 않고 PEG의 질량 농도에 의존한다. 다시 말해, 동일한 질량의 PEG 3350, PEG 8000 및 PEG 20000에 대해 단백질 용해도(즉, 포화된 가용성 상 중의 단백질의 농도)에 대해 동일한 효과가 관찰되었다(도 3). 즉, 80 mg/mL의 PEG 20000은 같은 단백질에서 80 mg/mL의 PEG 3350과 동일한 효과를 나타낸다.

[0026] 가용성 상 중의 약물 농도는 부형제 농도에 의존하고 전체 약물 함량과 독립적이지만, 불용성 상 중의 약물의 양은 포화된 가용성 상 중의 과잉의 약물로 존재하는 모든 약물을 포함한다. 따라서, 불용성 상 중의 약물의 양은 PEG 농도 및 약물의 총량 또는 최종 농도 둘 다에 의존한다.

[0027] PEG는 단백질 용해도뿐만 아니라 단백질 안정성에도 영향을 줄 것으로 예상된다. PEG의 특정 분자량 종은 단상(monophasic) 시스템에서는 완전히 용해된 단백질의 안정성에 거의 또는 전혀 영향을 주지 않지만, 2상 시스템에서는 완전히 용해된 단백질의 안정성에 영향을 미친다. 저 분자량 PEG 예를 들어 PEG 3350은 고 분자량 종의 PEG 예를 들어 PEG 8000 또는 PEG 20000보다 2상 시스템의 가용성 상 중의 100 kDa 내지 150 kDa 단백질의 안정성에 덜 부정적인 영향을 준다(도 4).

[0028] PEG 3350이 고 분자량 형태보다 가용성 상의 단백질 안정성에 덜 부정적인 영향을 미치지만, 이는 여전히 폐쇄형 시스템의 단백질을 불안정화시킨다. 도 5에 도시된 바와 같이, 단백질 안정성은 완전히 용해된 단상 시스템에서 PEG가 없는 경우에 비해 PEG3350의 존재하에서 감소한다. PEG의 단백질 불안정화 효과는 폐쇄형 2상 시스템에서 더 현저한데(도 6a 및 6b), 이는 폐쇄형 시스템에서 용해된 상보다는 불용성 상으로 유지되는 경우에 단백질 안정성은 감소되지만, 제시된 농도에서, 완전히 용해되거나 또는 2상 시스템에서는 이점이 없음을 나타낸다.

[0029] 폐쇄형 시스템에서 PEG 농도가 증가하는 경우, 응집 속도의 증가로 측정시 불용성 상 중의 단백질의 안정성은 감소한다(도 4 내지 7 참조). PEG가 단백질 용해도를 0.1 mg/mL 미만으로 제한하는 농도로 존재하는 경우, 비가역적 단백질 침전이 관찰된다. 본 발명의 일 측면에서, 상기 시스템에서의 불용성 상 중의 응집은 폐쇄형 시스템에서의 용액 상보다 크다.

[0030] 폐쇄형 시스템의 가용성 상 중의 높은 단백질 농도는 PEG-부재 제형과 PEG-함유 제형 둘 다에서 단백질 안정성을 감소시킨다(도 6a 및 6b). 예를 들어, 균일한 조건하에서 단상 시스템의 수크로오스만(PEG 없음)이 있는 경우, 약 4.5 mg/mL에서 100 kDa 내지 150 kDa 단백질은 약 0.35% HMW/wk의 응집 속도, 약 120 mg/mL에서 약 2.7% HMW/wk의 응집 속도 및 예상된 500 mg/mL 농도에서 약 10.2% HMW/wk의 외삽된 응집 속도를 갖는다(도 8). 이러한 높은 응집 속도는 고농도 단백질 제형의 약학적 적용례에서는 용납될 수 없다.

[0031] 폐쇄형 시스템과 달리, PEG를 추가하면 개방형 2상 시스템에서의 고농축 단백질의 안정성이 향상된다. 예를 들어, 65 mg/mL PEG를 함유한 10 mg/mL의 폐쇄형 단상 시스템에서의 포화된 가용성 단백질의 응집 속도는 약 1.3% HMW/wk일 수 있다. 10 mg/mL의 가용성 상 단백질 및 65 mg/mL PEG를 함유하는 20 mg/mL 불용성 상 단백질을 함유하는 폐쇄형 2상 시스템에서, 응집 속도는 약 2.5% HMW/wk일 수 있고, 10 mg/mL의 가용성 상 단백질 및 65 mg/mL PEG를 함유하는 110 mg/mL 불용성 상 단백질을 함유하는 폐쇄형 2상 시스템에서, 응집 속도는 약 10% HMW/wk일 수 있지만, 75 mg/mL PEG 및 100 mg/mL 초과인 총 단백질을 함유하는 개방형 2상 시스템에서, 응집 속도는 약 0.8% HMW/wk일 수 있다.

[0032] 바이알과 같은 폐쇄형 시스템에서, 단백질은 방출되지 않고 단백질 질량은 불용성 상으로부터 가용성 상으로 전달되지 않는다. 개방형 시스템에서, 예를 들어, 생체 시스템에 2상 시스템을 이식하는 경우, 불용성 상 중의 단백질의 농도(즉, 침전물 중의 단백질의 총 질량)는 단백질이 상기 상으로부터 포화된 가용성 상으로 전달되고 포화된 상으로부터의 단백질이 생리학적 환경으로 확산되기 때문에 감소한다. 불용성 상으로부터 가용성 상으로의 단백질의 계속적인 이동을 감안할 때, 가용성 단백질이 2상 저장조 밖으로 이동하는 동적 개방형 2상 시스템의 단백질은 폐쇄형 시스템 또는 단상 용액보다 더 안정적이다.

[0033] 2상 시스템을 만들기 위해 조합되는 PEG 및 단백질의 양 이외에, 단백질 용해도 및 상 분리에 대한 PEG의 영향은 예를 들어 단백질 크기 및/또는 등전점(isoelectric point)과 같은 특정 단백질 속성에 부분적으로 의존한다. 하기 표 1은 수용체 Fc-융합 단백질(트랩), 면역 글로불린 단백질(IgG), 인간 혈청 알부민(HSA) 및 피브리노겐의 용해도에 대한 다양한 양의 PEG의 예상되거나 실제적인 효과를 나타낸다. 문헌[Atha et al., "Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols," J. of Bio. Chem. 256(23):12108-12117

(1981)]은 IgG#2, HSA 및 피브리노겐의 용해도에 대한 PEG의 영향에 대한 기술에 대해 본원에 참고로 인용된다.

[표 1]

| 단백질   | % w/v PEG | 단백질 용해도<br>(mg/mL) | % w/v PEG | 단백질 용해도<br>(mg/mL) |
|-------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| 트랩    | 3.0       | 47                 | 10        | 1.6                |
| IgG#1 | 3.0       | 98                 | 12        | 0.2                |
| IgG#2 | 8.0       | 8                  | 18        | 0.1                |
| HSA   | 28        | 11                 | 35        | 0.8                |
| 피브리노겐 | 2.5       | 10                 | 7.5       | 0.1                |

## 저장조 장치

일부 구현예에서, 생체분자, 치료용 생체분자 또는 다른 약물을 환자에게 전달하기 위한 개방형 2상 시스템이 저장조 장치 내에 수용된다. 본 발명의 저장조 장치는 부분적으로 환경에 개방되어 있으며 2상 시스템으로부터 가용성 상 약물의 확산 또는 이동 속도가 조절될 수 있다. 일부 구현예에서, 2상 약물-충전된 저장조 장치 시스템이 예를 들어 피하 전달에 의해 환자에게 이식된다. 본 발명의 장치는 생리학적 미세환경과 접촉할 수 있고, 가용화된 약물은 장치로부터 나와 소정의 속도로 생리학적 미세환경으로 확산한다. 용액 중의 단백질의 농도 이외에, 이러한 방출 속도는 전달 속도를 변경하기 위해 조정될 수 있는 장치의 특성에 의해 결정된다. 이러한 조정가능한 특성은 크기, 저장조 장치의 구조, 다공성, 필터 크기 등이다. 참조: 문헌[*Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy* by W. Mark Saltzman, in Topics in Chemical Engineering, 1st Edition, Oxford University Press, New York, 2001]; 국제특허출원 공개 제W02008109886A1호, 문헌[Desai *et al.*, published September 12, 2008]; 국제특허출원 공개 제W02012142318A1호, 문헌[Desai *et al.*, published October 18, 2012]; 미국 특허출원 공개 제20140170204A1호(Desai *et al.*, 공개일: 2014.06.06); 및 미국 특허출원 공개 제US20150216829A1호(Desai *et al.*, 공개일: 2015.08.06), 이들 문헌은 약물 전달을 달성하기 위한 전달 속도 및 장치 특성의 설명에 대해 본원에 참고로 인용된다.

전달 미세환경은 저장조 장치의 크기, 형상 및 구성 물질에 영향을 준다. 예를 들어, 내막으로 전달하기 위한 저장조 장치는 카테터를 통해 전달되는 스텐트의 벽 내에 끼워맞춰지도록 크기 및 형상이 결정될 수 있다. 2상 약물-충전된 장치는 국소적으로, 예를 들어, 피부 패치형 장치, 장내, 예를 들어, 캡슐 또는 좌제, 또는 비경구로 예를 들어 이식된 장치로 환자에게 전달될 수 있다. 예시적인 미세환경에는 위장계, 중추 신경계(예컨대 경막외, 뇌내, 뇌실내, 척수강내), 양수-태아 시스템(예컨대 과다양수), 황반, 망막 또는 다른 안구 구조(예컨대 유리체강내, 안구내), 정맥-동맥 시스템(예컨대 동맥내), 뼈 및 관절 시스템(예컨대 골내, 관절내), 근육, 피하, 피부, 복막, 점막 등이 포함된다.

본 발명의 일 구현예에서, 저장조 장치는 "챔버"("저장조 챔버") 및 챔버를 둘러싸는 "하우징"을 포함한다. 상기 하우징은 하나 이상의 개구, 포트, 창, 기공, 다공성 구조 또는 투과성 또는 반투과성 물질(통칭 "다공성 구조")을 포함한다. "다공성 구조"는 저장조 장치로부터 약물의 통과를 허용하고, 일부 구현예에서는 생리학적 용매 및 용질의 유입을 허용한다. 일부 구현예에서, 전체 하우징은 다공성 구조를 포함한다. 다른 구현예에서, 다공성 구조는 다르게는 불침투성 하우징에서 창-유사 구조로서 제공되는 하우징의 일부분만을 포함한다. 약물 2상 시스템은 저장조 챔버 내에 보관된다. 일부 구현예에서, 불용성 상은 약물 코어를 제공하고 가용성 상은 약물 외피를 제공한다. 도 9는 예시적인 저장조 장치의 개략도를 도시한다.

본 발명의 저장조 장치는 임의의 물질로 제조될 수 있고 특정 표적을 수용하기 위한 임의의 크기일 수 있다. 예를 들어, 상기 장치는 일부 경우에는 인슐린 펌프와 같이 신체 외부에 착용할 수 있으므로 비교적 클 수 있다. 상기 장치는 신체에 예를 들어 피하 또는 유리체강 내에 이식될 수 있으며, 이 때문에 장치가 작을 필요가 있다. 예를 들어, 유리체강내 장치는 1 내지 50  $\mu$ L 정도의 부피를 가질 수 있다.

본 발명의 일 구현예에서, 생리학적 시스템에 이식되는 저장조 장치는 생체적합성 물질로 제조될 수 있으며, 그 예로는 금속 예를 들어 규소, 티탄, 스테인리스 스틸 및 니켈-티타늄 합금 및 폴리머 예를 들어 폴리락트산(PLA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리오르토에스테르, 폴리무수물, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시발러레이트, 폴리(아미노산), 콜라겐, 아세트산 셀룰로오스, 나일론, 폴리카보네이트, 폴리(테트라플루오로에틸렌)(PTFE), 폴리에테르 술폰, 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF), 아크릴레이트, 폴리(아크릴레이트), 메틸메타크릴레이트, 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리시아노아크릴레이트, 실록산, 폴리카보네이트, 폴

리에테르에테르케톤(PEEK), 폴리에틸렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET), 폴리이미드, 폴리아미드이미드, 폴리프로필렌, 폴리술폰, 폴리우레탄 및 폴리비닐리덴을 포함한다.

[0042] 본 발명의 저장조 장치는 강성 또는 가요성, 일회용 또는 재충전가능할 수 있다. 미국 특허출원 제2015/0250647호, 제2011/046870호, 제2013/0324942호 및 미국 특허 제9,033,911호 및 제8,623,395호는 안과 약물을 눈에 전달하기 위한 강성이면서 재충전가능한 생체적합성 유리체강내 저장조 장치에 대해 본원에 참고로 인용된다(예컨대 포사이트(FORSIGHT(등록상표)) Vision4 device). 일 구현예에서, 본 발명의 장치는 티탄으로 제조되고 재충전가능하다. 재충전가능한 장치로서, 이는 저장조 장치의 근접 단부에 또는 그 근처에 위치하는 침투가능한 장벽을 함유할 수 있으며, 이를 통해 약물이 캐놀라(cannula)를 통해 침착된다. 이러한 구현예에서, 다공성 구조는 소결된 금속을 포함한다.

[0043] 본 발명의 가요성 장치의 하우징 물질은 폴리머일 수 있고, 반투막 또는 다른 다공성 구조는 마이크로기공, 나노기공 또는 다른 채널을 함유하는 폴리머성 필름일 수 있다. 가요성이고 일회용인 폴리머 장치 및 그 제조 방법은 버나드(Bernards)(2012), 미국 특허출원 공개 제2014/0170204호 및 제2015/0119807호, 및 EP 특허출원 제EP2164425A1호에 개시되어 있다. US 2015/0119807 A1은 본 발명의 장치에 사용될 수 있는 나노다공성 폴리카프로락톤(PCL) 필름, 또는 마이크로다공성 PCL과 비-다공성 백킹(backing)의 조합을 포함하는 박막 샌드위치 구조의 설명을 위해 본원에 참고로 인용된다. 이러한 구현예에서, 약물 물질은 2개의 폴리머 필름 층들 사이에 장입되고, 이어서 열 밀봉된다. 반투막 또는 다른 다공성 구조의 표면적뿐만 아니라 기공의 크기 및 구조는 장치로부터 약물의 용출 속도를 제어한다. 펴링된(furled) 약물-로딩된 장치는 바늘 캐놀라를 통해 예를 들어 유리체 내에 주입될 수 있다.

[0044] 용어 "나노기공"은 기공의 한쪽면(예컨대 내부 환경)의 물질이 기공의 다른면(예컨대 외부 또는 외부 환경)의 물질에 접근할 수 있는 장벽의 기공 또는 채널 개구의 일반적인 직경을 나타낸다. 약 100 nm 이하의 직경을 갖는 기공은 일반적으로 나노기공으로 간주된다.

[0045] 본 발명의 저장조 장치의 나노기공은 약 0.2 nm 내지 약 100 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 나노기공은 약 0.2 nm 내지 약 2 nm, 약 2 nm 내지 약 50 nm, 또는 약 50 nm 내지 약 100 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 저장조 장치의 나노기공은 약 10 nm, 약 11 nm, 약 12 nm, 약 13 nm, 약 14 nm, 약 15 nm, 약 16 nm, 약 17 nm, 약 18 nm, 약 20 nm, 약 21 nm, 약 22 nm, 약 23 nm, 약 24 nm, 약 25 nm, 약 26 nm, 약 27 nm, 약 28 nm, 약 29 nm 또는 약 30 nm의 직경을 갖는다.

[0046] 본 발명의 마이크로다공성 필름은 마이크로기공을 함유한다. 본 발명의 마이크로기공은 약 1 미크론 내지 약 2 미크론, 약 2 미크론 내지 약 5 미크론, 약 1 미크론, 약 1.1 미크론, 약 1.2 미크론, 약 1.3 미크론, 약 1.4 미크론, 약 1.5 미크론, 약 1.6 미크론, 약 1.7 미크론, 약 1.8 미크론, 약 1.9 미크론 또는 약 2 미크론의 단면 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 마이크로기공은 약 10 미크론 미만의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 마이크로기공은 약 1 미크론보다 작은 상호연결성 기공 크기를 갖는다.

[0047] 본 발명의 저장조 장치는 이식가능한 자체-조절되는 기계화학적 펌프일 수 있다. 이러한 장치는 미세환경의 변화에 반응하는 효소가 내장된 가요성 멤브레인을 사용한다. 이러한 변화는 멤브레인을 팽윤시켜 결과적으로 기공을 개방시킴으로써 가용성 단백질의 외부 환경 접근을 허용하고 가용성 약물의 후속 유출을 허용한다. 예를 들어, 폴리머 측쇄의 아민기가 양성자화되는 경우, 가교결합된 하이드로겔 멤브레인이 팽윤되도록 설계되어, 미세환경의 pH 변화에 반응하여 장치가 개방될 수 있게 한다. 약물은 후속적으로 저장조 챔버로부터 생리학적 시스템 내로 "펌핑"된다. 특정 화학물질을 환원시키거나 산화시키는 효소가 양성자의 공급원 또는 싱크(sink) 역할을 하기 위해 멤브레인 내로 삽입될 수 있다. 기계화학적 장치의 예에 대해서는 문헌[Kost, et al. J. Biomed. Mater. Res. 19, 1117-1133 (1985)], [Albin et al., J. Controlled Release 6, 267-291 (1987)], [Ishihara et al., Polymer J. 16, 625-631 (1984)], 및 [데 주앙(De Juan) 등, 미국 특허 제9,033,911호 (2015.05.19)] 참조.

[0048] 정의

[0049] 본 발명은 단상 용액에 비해 장시간에 걸쳐 단백질의 용해도를 개선시키기 위한 제형을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 생리학적 온도에서 장시간에 걸쳐 안정하게 유지되는 약물의 장기간 전달을 위한 약물 전달 장치를 제공한다. 또한, 이러한 전달 장치용 약물 제형의 제조 방법 및 (iii) 상기 구성 약물을 필요로 하는 환자를 치료하기 위한 상기 제형 또는 장치의 용도가 제공된다. 본 발명의 약물 제형은 가용성 상 및 불용성 상으로 존재하는 "제1 분자" 및 제1 분자의 유효 용해도를 감소시키는 부형제인 "제2 분자"를 함유하는 2상 시스템

템을 포함한다. 일부 구현예에서, 2상 시스템은 저장조 챔버 내에 함유되며, 이는 저장조 장치를 형성하도록 하우징에 의해 한정될 수 있다. "제1 분자"는 일반적으로 치료 효용 또는 다른 약물 또는 약물 물질을 갖는 생물학적 분자이다.

[0050] 용어 "2상"은 고체 침전된 상 및 포화된 가용성 상으로 공존하는 분자의 상태를 나타낸다. 분자의 2상 혼합물은 평형 상태에 있다. 폐쇄형 시스템(예컨대, 생리학적 시스템과 접촉하지 않는 바이알 또는 다른 용기에서와 같이)에서의 2상 혼합물에서, 각 상 중의 분자의 총량은 비교적 일정하게 유지된다. 가용성 형태의 분자가 2상 혼합물로부터 확산될 수 있는 개방형 시스템의 2상 혼합물에서(예를 들어, 이식되거나 그렇지 않으면 생리학적 또는 다른 시스템과 연통되는 경우), 2상 시스템 내의 분자의 양은 시간이 지남에 따라 감소할 것이다. 개방형 시스템에서, 분자의 불용성 분획은 분자의 예비 형태로서 작용한다. 예를 들어, 동일한 단백질의 포화 용액으로 둘러싸인 침전된 단백질은 "2상 시스템"이며 단백질은 "2상"이다.

[0051] 용어 "생체분자"는 단백질, 탄수화물, 지질, 핵산 및 합성 복합 분자 예컨대 아타머(aptamer)와 같은 거대분자 뿐만 아니라 1차 대사산물, 2차 대사산물 및 생물학적 시스템에서 생성된 생성물과 같은 소분자를 포함하는 생물학적 분자를 나타낸다. 생물학적 분자는 특히 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 및 아미노산, 아타머, 지질, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 및 핵산 및 탄수화물을 포함한다. 생체분자는 자연 발생적인 것, 즉 자연 발생 유기체, 바이러스 및 환경에서 생성되거나 또는 인공적, 즉 합성 화학적 수단에 의해 또는 재조합 또는 이소성(ectopic) 핵산을 함유하는 생물학적 시스템에서 생산될 수 있다. 일부 특정 구현예에서, 생체분자는 치료용 생체분자이다. 치료용 생체분자는 "약물" 또는 "약물 물질"이다. 일부 구현예에서, 상기 장치의 "제1 분자"는 단백질이다.

[0052] 용어 "단백질"은 아마이드 결합을 통해 공유 결합된 약 50개 초과 아미노산을 갖는 임의의 아미노산 폴리머를 의미한다. 단백질은, 당업계에서 "폴리펩타이드"로 일반적으로 알려져 있는 하나 이상의 아미노산 폴리머 쇄를 함유한다. 단백질은 하나 또는 다수의 폴리펩타이드를 함유하여 단일 작용성 생체분자를 형성할 수 있다. "폴리펩타이드"는 일반적으로 50개 초과 아미노산을 함유하는 반면, "펩타이드"는 일반적으로 50개 이하의 아미노산을 함유한다.

[0053] 본원에 사용된 "단백질"은 생체치료용 단백질, 연구 또는 치료에 사용되는 재조합 단백질, 트랩 단백질 및 기타 키메라 수용체 Fc-융합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 인간 항체 및 이중특이적 항체 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 단백질은 항체 단편, 나노바디, 재조합 항체 키메라, 사이토카인, 케모카인, 펩타이드 호르몬 등을 포함할 수 있다. 단백질은 곤충 바쿨로바이러스 시스템, 효모 시스템(예컨대 피키아(예컨대 피키아 속(*Pichia* sp.))), 포유동물 시스템(예컨대 CHO 세포 및 CHO 유도체 예컨대 CHO-K1 세포)과 같은 재조합 세포-기반 생산 시스템을 사용하여 생산될 수 있다. 생체치료용 단백질과 그 생산에 관한 최근의 검토는 문헌[Ghaderi et al., "platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012)] 참조. 일부 구현예에서, 단백질은 변형, 부가물 및 다른 공유 결합된 잔기를 함유한다. 이러한 변형, 부가물 및 잔기는 예를 들어 아비딘, 스트렙타비딘, 비오틴, 글리칸(예를 들어, N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스, 뉴라민 산, N-아세틸글루코사민, 푸코스, 만노오스 및 기타 모노사카라이드), PEG, 폴리히스티딘, FLAG-태그, 말토스 결합 단백질(MBP), 키틴 결합 단백질(CBP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) myc-에피토프, 형광 라벨 및 기타 염료 등을 포함한다.

[0054] 항체는 종종 치료용 생체분자로 사용된다. 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 4개의 폴리펩타이드 쇄, 2개의 중쇄(H) 쇄 및 2개의 경쇄(L) 쇄가 디설파이드 결합에 의해 상호연결된 면역글로불린 분자를 포함한다.

[0055] 문구 "Fc-함유 단백질"은 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역의 적어도 기능적 부분을 포함하는 항체, 이중특이적 항체, 면역접합체 및 기타 결합 단백질을 포함한다. "기능적 부분"은 Fc 수용체(예를 들어, Fcγ 또는 FcRn, 즉 신생아 Fc 수용체)에 결합할 수 있고/있거나 보체의 활성화에 참여할 수 있는 CH2 및 CH3 영역을 의미한다. CH2 및 CH3 영역이 임의의 Fc 수용체에 결합할 수 없게 하고 또한 보체를 활성화시킬 수 없게 하는 결실, 치환 및/또는 삽입 또는 다른 변형을 함유하는 경우, CH2 및 CH3 영역은 기능적이지 않다.

[0056] Fc-함유 단백질은 변형이 결합 단백질의 하나 이상의 이펙터(effector) 기능에 영향을 주는 경우(예를 들어, Fcγ 결합, FcRn 결합, 따라서 반감기 및/또는 CDC 활성화에 영향을 주는 변형)를 비롯한 면역글로불린 도메인에서의 변형을 포함할 수 있다.

[0057] VEGF 길항제는 예를 들어 라파티닙, 수니티닙, 소라페닙, 엑시티닙 및 파속파 닙(Yadav, 2015)을 포함하는,

VEGF-자극된 티로신 키나아제를 저해하는 작은 분자를 포함한다. VEGF의 거대분자 억제제는 모노클로날 항체 베바시주맵, Fab 단편 라니비주맵, 트랩 애플리버셉트, 트랩 콘버셉트 및 폐길화된 압타머 페가프타닙을 포함한다.

[0058] 일부 구현예에 따르면, 제2 분자 (2상 시스템의 "용해도를 감소시키는 분자" 라고도 함)는 제1 분자(즉, 생물학적 치료제 또는 다른 약물 또는 생체분자)의 용해도를 감소시킨다. "용해도"는 일반적으로 온도, 압력 및 pH와 같은 변수에 따라 주어진 용매 중의 용질의 고유한 물리적 특성을 의미하지만 본원에서 "용해도"는 더 넓은 의미를 가진다. 본원에서 사용된 "용해도"는 용매 중의 용질의 농도를 나타낸다. 이와 같이, 용해도는 특히 염, 추가 용매 및/또는 비-이온성 거대분자 또는 용매를 배제하고 용질을 용해시키는 데 사용되는 용매의 양을 효과적으로 감소시키는 다른 거대분자와 같은 다른 시약의 가감에 의해 영향을 받는다.

[0059] 본 발명의 구현예에서, "용해도를 감소시키는 분자"는 "비-이온성 거대분자"("수용성 비-이온성 폴리머"라고도 함)를 포함한다. 이들 분자는 용매를 배제하고 단백질 용매화에 사용할 수 있는 물의 전체 양을 줄임으로써 부분적으로 작용한다. 비-이온성 거대분자는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 텍스트란, 알기네이트, 펙티네이트, 카복시메틸 셀룰로오스 또는 전분, 하이드록시에틸 셀룰로오스 또는 전분, 하이드록시프로필 셀룰로오스 또는 전분, 메틸 셀룰로오스 또는 전분, 폴리아크릴산 및 폴리메타크릴산, 폴리에틸렌이민, 폴리아크릴아미드, 폴리옥시에틸렌, 폴리비닐피롤리돈(PVP), FICOLL(등록상표), PERCOLL(등록상표) 등을 포함한다.

[0060] "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 생체분자의 용해도를 감소시키는 분자로서 유용한 비이온성 거대분자의 한 예를 나타낸다. PEG는 식품, 의약품 및 화장품에 일반적으로 사용되는 에틸렌 옥사이드의 폴리에테르 폴리머이다. PEG는 300 g/mol 내지 10,000,000 g/mol 범위의 상이한 분자량으로 상업적으로 입수가능하다. 본 발명의 한 측면에서, PEG 20000, PEG 8000 및 PEG 3350이 유용하다. 3350 그램/몰(PEG3350)의 분자량을 갖는 PEG가 본 발명에 사용하기에 바람직하다. PEG는 선형, 분지형(3 내지 10개 쇠가 중심 코어에 연결된 것), 별-형(10 내지 100개 쇠가 중심 코어에 부착된 것) 및 빗-형(여러 개 쇠가 폴리머 백본에 부착된 것)과 같은 다양한 형태로 제공된다.

[0061] "텍스트란"은 생체분자의 용해도를 감소시키는 분자로서 유용할 수 있는 또 다른 비이온성 거대분자 표본이다. 텍스트란은 특히 뱀 팽창제로서 종종 사용되는 분지형 쇠 글루칸이다. 이는 일반적으로 안전하다고 인정되고 단백질을 안정화시키기 위해 다른 적용례에 사용되어왔다.

[0062] 일부 구현예에서, 제1 분자는, 제2 분자와 조합되는 경우, (1) 용액 중에 및 (2) 용액 중에 존재하지 않는 두 가지 용해도 상태로 존재한다. "용해된", "용질", "가용성", "가용화된", "가용성 분획", "가용성 부분", "가용성 상", "포화 용액"이라는 용어들은 각각 용액 중에 존재하는 제1 분자의 전체 중의 일부를 의미한다. "고체", "침전물", "비-가용성 분획", "비-가용성 부분", "불용성 분획", "불용성", "불용성 상"이라는 용어들은 각각 용액 중에 존재하지 않는 제1 분자의 전체 중의 일부를 의미한다.

[0063] 개방형 2상 시스템의 한 측면에서, 약물의 PEG에 의한 용해도를 감소시키면 제1 분자의 전반적인 장기 안정성을 향상시킨다. 용어 "안정성"은 저장조 챔버의 가용성 분획과 같은 생리학적으로 적절한 환경으로의 침착 후 시간에 따라 제1 분자의 수용가능한 정도의 물리적 구조(콜로이드성, 특성), 화학적 구조 또는 생물학적 기능을 유지하는 것을 의미한다. 제1 분자는 소정의 시간 동안 저장 또는 침착 후에 구조 또는 기능의 100%를 유지하지 않더라도 안정적일 수 있다. 특정 환경 하에서, 제1 분자의 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%가 본래의 형태, 구조 또는 기능을 가지는 경우, 가용성 분획의 단백질 및 제형은 "안정한" 것으로 간주될 수 있다.

[0064] 안정성은 특히 소정의 온도에서 소정의 시간 동안 저장 또는 침착 후에 제형에 남아있는 고유 분자의 비율을 결정함으로써 측정될 수 있다. 고유 분자의 비율은 특히 크기 배제 크로마토그래피(예를 들어, 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피[SE-HPLC])에 의해 결정되어, 고유 분자가 비-응집성이고 비-분해성임을 의미할 수 있다. 특정 구현예에서, 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 고유 형태의 제1 분자는 침착(예를 들어, 이식) 후 소정의 온도에서 또는 생리학적 조건하에 소정의 시간 후에 제형 내에서 검출될 수 있다. 안정성을 측정할 후 소정의 시간량은 약 14 일, 약 28 일, 약 1 개월, 약 2 개월, 약 3 개월, 약 4 개월, 약 5 개월, 약 6 개월, 약 7 개월, 약 8 개월, 약 9 개월, 약 10 개월, 약 11 개월, 약 12 개월, 약 18 개월, 약 24 개월 또는 그 이상일 수 있다. 안정성을 평가할 때 제1 및 제2 분자를 함유하는 장치가 유지될 수 있는 온도는 약 -80℃ 내지 약 45℃의 임의의 온도, 예를 들어, 약 -80℃, 약 -30℃, 약 -20℃, 약 0℃, 약 4 내지 8℃, 약 5℃, 약 25℃, 약 35℃, 약 37℃ 또는 다른 생리학적 온도, 또는 약 45℃ 일 수 있다. 예를 들어, 생리학적 조건 하에서 3 개월 후, SE-HPLC 또는 다른 크기 배제 또는 크기 결정 방법에 의해

가용성 분획에서 고유 분자의 약 75%, 80%, 85% 또는 90% 이상이 검출되는 경우, 제1 분자는 안정한 것으로 간주될 수 있다. "생리학적 온도"는 임의의 척추 동물의 체온을 포함한다. 예를 들어, 인간의 생리학적 온도는 약 37℃이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 생리학적 온도는 약 25℃ 내지 약 45℃이다. 일부 구현예에서, 생리학적 온도는 약 25℃, 약 26℃, 약 27℃, 약 28℃, 약 29℃, 약 30℃, 약 31℃, 약 32℃, 약 33℃, 약 34℃, 약 35℃, 약 36℃, 약 37℃, 약 38℃, 약 39℃, 약 40℃, 약 41℃, 약 42℃, 약 43℃, 약 44℃, 및 약 45℃이다.

[0065] 안정성은 특히 소정의 온도에서 소정의 시간 후에 PEG와 같은 제2 분자의 존재하에 저장조 장치 내에서 응집체(즉, 고 분자량 중)를 형성하는 단백질과 같은 제1 분자의 비율을 결정함으로써 측정될 수 있으며, 여기서 안정성은 가용성 분획에서 형성된 고 분자량(HMW) 종의 비율에 반비례한다. 단백질의 안정성은 단백질이 PEG와 같은 제2 분자의 존재하에 개방형 2상 시스템으로부터 방출된 후에 측정될 수 있다. 가용성 분획 중의 제1 분자의 HMW 종의 비율은, 상기 한 바와 같이, 특히 크기 배제 크로마토그래피에 의해 결정될 수 있다. 약학적 제형은 또한 생리학적 조건에서 3개월 후 제1 분자의 약 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1%가 HMW 형태로 검출된다.

[0066] 안정성은 특히 소정의 온도에서 소정의 시간 후에 제2 분자인 PEG의 존재하에 개방형 2상 시스템으로부터 방출된 후 저 분자량(LMW) 종으로서 분해되거나 그렇지 않으면 발견되는 단백질과 같은 제1 분자의 비율을 결정함으로써 측정될 수 있다. 안정성은 가용성 분획에서 형성된 LMW 종의 비율에 반비례한다. 가용성 분획 중의 제1 분자의 LMW 종의 비율은, 상기한 바와 같이, 특히 크기 배제 크로마토그래피에 의해 결정될 수 있다. 약학적 제형은 또한 생리학적 조건에서 3개월 후 제1 분자의 약 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1%가 LMW 형태로 검출된다.

[0067] 일부 구현예에서, 개방형 2상 약물 시스템은 "저장조 장치" 내에 함유된다. 용어 "저장조 장치"는 2상 약물을 함유하고 주위 환경으로부터 2상 약물을 부분적으로 격리하며 소정의 속도로 포트를 통해 가용성 약물의 유출을 허용하는 임의의 용기를 포함한다. 저장조 장치는 2상 시스템을 포함하는 개방형이고 조절형인 시스템을 나타낸다. 폐쇄형 2상 시스템은 저장조 장치가 아닌 다른 용기에 함유될 수 있다. 예를 들어, 다른 용액과 접촉하지 않는 바이알의 2상 시스템은 가용성 분자가 확산되지 않기 때문에 폐쇄형 시스템이다. 폐쇄형 시스템보다 개방형 시스템에서 시간이 지남에 따른 2상 약물의 안정성은 커질 수 있다.

[0068] 본 발명의 일부 구현예에서, 2상 시스템은 추가의 성분 또는 부형제를 함유한다. "부형제"는 약물의 완충, 가용화, 안정화 및/또는 보호, 및 제형의 유지 또는 조절을 포함하는 여러 가지 목적으로 사용되는 다양한 물질을 포함한다. 보호제는 열 스트레스 및/또는 교반과 같은 물리적 스트레스로부터 보호한다. 완충제는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0069] 일부 구현예에서, 완충제는 본 발명의 2상 제형에 포함된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 2상 제형은 약 1 mM 내지 약 100 mM, 약 5 mM 내지 약 50 mM, 또는 약 10 mM 내지 약 20 mM의 농도의 완충제를 함유한다. 일부 구현예에서, 완충제는 5 mM  $\pm$  0.75 mM 내지 15 mM  $\pm$  2.25 mM; 6 mM  $\pm$  0.9 mM 내지 14 mM  $\pm$  2.1 mM; 7 mM  $\pm$  1.05 mM 내지 13 mM  $\pm$  1.95 mM; 8 mM  $\pm$  1.2 mM 내지 12 mM  $\pm$  1.8 mM; 9 mM  $\pm$  1.35 mM 내지 11 mM  $\pm$  1.65 mM; 10 mM  $\pm$  1.5 mM; 또는 약 10 mM의 농도로 본 발명의 2상 제형에 포함된다. 일부 구현예에서, 완충제는 히스티딘, 포스페이트, 카보네이트, 숙시네이트 및/또는 아세테이트이다.

[0070] 일부 구현예에서, 완충제는 약 3 내지 약 9의 pH 범위 또는 약 3.7 내지 약 8.0의 pH 범위 내에서 완충될 수 있는 화합물로부터 선택된다. 예를 들어, 2상 제형은 약 3.4, 약 3.6, 약 3.8, 약 4.0, 약 4.2, 약 4.4, 약 4.6, 약 4.8, 약 5.0, 약 5.2, 약 5.4, 약 5.6, 약 5.8, 약 6.0, 약 6.2, 약 6.4, 약 6.6, 약 6.8, 약 7.0, 약 7.2, 약 7.4, 약 7.6, 약 7.8 또는 약 8.0의 pH를 가질 수 있다.

[0071] 완충제는 예를 들어 히스티딘과 아세테이트의 조합(히스-아세테이트 완충제)과 같은 개별 완충제의 조합일 수 있다. 일 구현예에서, 완충제는 약 3.5 내지 약 6, 또는 약 3.7 내지 약 5.6 예를 들어 아세테이트에 의해 완충되는 범위의 완충 범위를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 포스페이트에 의해 완충되는 범위와 같이 약 5.5 내지 약 8.5, 또는 약 5.8 내지 약 8.0의 완충 범위를 갖는다. 일 구현예에서, 완충제는 히스티딘에 의해 완충되는 범위와 같이 약 5.0 내지 약 8.0, 또는 약 5.5 내지 약 7.4의 완충 범위를 갖는다.

[0072] 부형제에는 안정화제가 포함된다. 본원에서 사용된 안정화제는 응집 또는 다른 분해에 대해 단백질을 안정화시키기 위해 본 발명의 2상 제형에 첨가될 수 있다. 본 발명의 2상 제형에 포함될 수 있는 안정화제는 폴리올, 당, 염(예컨대, 염화나트륨), 아미노산 등을 포함한다. 일부 경우에, 안정화제는 또한 2상 제형이 침착되는 생리학적 환경의 삼투압과 일치하도록 2상 제형의 삼투압을 조절하는 강장제로서 작용할 수 있다. 예를 들어, 염

화나트륨과 수크로오스는 각각 강장제로서 작용한다. 최적의 안정화 또는 강장 효과를 위해 다양한 개별적인 안정화제를 단독으로 또는 하나 이상의 다른 안정화제와 함께 사용할 수 있다. 예를 들어, 폴리올은 당, 아미노산을 갖는 당, 아미노산을 갖는 폴리올, 당을 갖는 염, 아미노산을 갖는 염, 폴리올을 갖는 염 등과 조합될 수 있다.

[0073] 폴리올은 하나 이상의 하이드록실 기(-OH)를 갖는 유기 분자이다. 폴리올은 모노머뿐만 아니라 폴리머를 포함한다. 당 알코올은 유용한 안정화제로 제공될 수 있는 폴리올 당 알코올의 하위 그룹으로서, 만니톨, 자일리톨, 솔비톨, 이소말트, 에리트리톨, 말티톨 및 글리세롤을 포함한다. 다른 모노머성 폴리올은 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 및 펜타에리트리톨을 포함한다. 폴리머성 폴리올은 폴리올 서브유닛의 폴리에스테르 또는 폴리에테르일 수 있다. 유용한 예시적인 폴리머성 폴리올은 폴리프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리(테트라메틸렌 에테르) 글리콜을 포함한다.

[0074] 트레할로오스 및 수크로오스와 같은 당류가 본 발명의 2상 제형에서 안정화제로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 수크로오스는 약 0.5%(w/v) 내지 약 25%(w/v)의 농도로 본 발명의 2상 제형에 포함된다. 일 구현예에서, 수크로오스는 약 0.5%(w/v), 약 1%(w/v), 약 1.5%(w/v), 약 2%(w/v), 약 2.5%(w/v), 약 3%(w/v), 약 3.5%(w/v), 약 4%(w/v), 약 4.5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 약 10%(w/v), 약 11%(w/v), 약 12%(w/v), 약 13%(w/v), 약 14%(w/v), 약 15%(w/v), 약 16%(w/v), 약 17%(w/v), 약 18%(w/v), 약 19%(w/v), 약 20%(w/v), 약 21%(w/v), 약 22%(w/v), 약 23%(w/v), 약 24%(w/v) 또는 약 25%(w/v)의 농도로 본 발명의 2상 제형에 포함된다.

[0075] 아미노산이 또한 본 발명의 2상 제형에 안정화제 또는 강장제로서 포함될 수 있다. 유용한 아미노산에는 글리신, 아르기닌, 알라닌 및 프롤린이 포함된다. 일부 구현예에서, 아르기닌은 안정화제 및 점도 저하제로서 사용된다.

[0076] 일부 경우, 하나 이상의 계면활성제가 본 발명의 2상 제형에서 부형제로서 사용될 수 있다. 계면활성제는 단백질-단백질 소수성 상호작용 및 결과적으로 고 분자량 종(즉, 응집체)의 형성을 감소시킴으로써 추가적인 안정성을 제공한다. 본 발명의 2상 제형에 포함될 수 있는 예시적인 비-이온성 계면활성제는 예를 들어 알킬 폴리(에틸렌 옥사이드), 알킬 폴리글루코시드(예컨대 옥틸 글루코 시드 및 데실 말토시드), 지방 알코올 예컨대 세틸 알코올 및 올레일 알코올, 코카미드 MEA, 코카미드 DEA 및 코카미드 TEA를 포함한다. 예비-동결건조된 수용액(또는 재생 후 용액)에 포함될 수 있는 특정 비-이온성 계면활성제는 예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(폴리소르베이트라고도 함) 예를 들어 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 28, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81 및 폴리소르베이트 85; 폴록사머 예를 들어 폴록사머 188, 폴록사머 407; 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜; 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 폴리소르베이트 20은 또한 TWEEN 20, 소르비탄 모노라우레이트 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레이트로도 알려져 있다. 폴리소르베이트 80은 또한 TWEEN 80, 소르비탄 모노올레이트 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레이트로도 알려져 있다.

[0077] 일부 구현예에서, 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80은 약 0.001%(w/v) 내지 약 0.5%(w/v)의 농도로 본 발명의 2상 제형에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 2상 제형은 약 0.001%; 약 0.0015%; 약 0.002%; 약 0.0025%; 약 0.003%; 약 0.0035%; 약 0.004%; 약 0.0045%; 약 0.005%; 약 0.0055%; 약 0.006%; 약 0.0065%; 약 0.007%; 약 0.0075%; 약 0.008%; 약 0.0085%; 약 0.009%; 약 0.0095%; 약 0.01%; 약 0.015%; 약 0.016%; 약 0.017%; 약 0.018%; 약 0.019%; 약 0.02%; 약 0.021%; 약 0.022%; 약 0.023%; 약 0.024%; 약 0.025%; 약 0.026%; 약 0.027%; 약 0.028%; 약 0.029%; 약 0.03%; 약 0.031%; 약 0.032%; 약 0.033%; 약 0.034%; 약 0.035%; 약 0.036%; 약 0.037%; 약 0.038%; 약 0.039%; 약 0.04%; 약 0.041%; 약 0.042%; 약 0.043%; 약 0.044%; 약 0.045%; 약 0.046%; 약 0.047%; 약 0.048%; 약 0.049%; 약 0.05%; 약 0.051%; 약 0.052%; 약 0.053%; 약 0.054%; 약 0.055%; 약 0.056%; 약 0.057%; 약 0.058%; 약 0.059%; 약 0.06%; 약 0.061%; 약 0.062%; 약 0.063%; 약 0.064%; 약 0.065%; 약 0.066%; 약 0.067%; 약 0.068%; 약 0.069%; 약 0.07%; 약 0.071%; 약 0.072%; 약 0.073%; 약 0.074%; 약 0.075%; 약 0.076%; 약 0.077%; 약 0.078%; 약 0.079%; 약 0.08%; 약 0.081%; 약 0.082%; 약 0.083%; 약 0.084%; 약 0.085%; 약 0.086%; 약 0.087%; 약 0.088%; 약 0.089%; 약 0.09%; 약 0.091%; 약 0.092%; 약 0.093%; 약 0.094%; 약 0.095%; 약 0.096%; 약 0.097%; 약 0.098%; 약 0.099%; 약 0.10%; 약 0.15%; 약 0.20%; 약 0.25%; 약 0.30%; 약 0.35%; 약 0.40%; 약 0.45%; 또는 약 0.50% 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80을 함유한다.

[0078] 구현예

- [0079] 일 측면에서, 본 발명은 생체분자 및 생체분자의 용해도를 제한하는 분자를 함유하는 안정한 2상 약학적 제형을 제공한다. 생체분자는 생체분자의 일부가 가용성 형태(용해된)이고 일부가 불용성 형태(침전물)인 제형에서 2상 시스템으로 존재한다. 일 구현예에서, 제형은 가용성 생체분자가 외부 수성 환경에 접근하지 못하는 폐쇄형 시스템이거나 또는 가용성 생체분자가 보다 낮은 농도의 생체분자를 갖는 환경에 접근할 수 있는 개방형 시스템일 수 있다. 개방형 시스템의 일부 구현예에서, 조성물은, 저장조 장치 내에 수용되고 다공성 구조에 의해 함유된 저장조 챔버 내에 함유된다. 저장조 장치는 반투막 또는 다른 다공성 구조를 통해 환경에 개방되어 있고 환자에게 이식되어 치료적 유효량의 생체분자를 환자의 치료 표적에 전달할 수 있다.
- [0080] 한 측면에서, 본 발명은 적어도 25 mg/mL의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 적어도 100 mg/mL의 단백질, 50% 미만의 단백질 총량 및 소정량의 PEG를 함유하는 가용성 상, 및 불용성 단백질을 포함하는 불용성 상을 제공한다. 가용성 상 단백질은 생리학적 온도에서 적어도 30일 동안 안정하고, 반투막 또는 다른 다공성 구조를 통해 단백질 농도가 낮은 환경으로 접근할 수 있다(즉, 개방형 시스템).
- [0081] 일부 구현예에서, 2상 약학적 제형은 환자에게 투여되거나 그렇지 않으면 외부 환경에 놓여지며, 여기서 시간이 지나면 가용성 단백질은 다공성 구조를 통해 환경으로 농도 구배를 따라 확산한다. 따라서, 본 발명의 2상 약학적 제형의 단백질 총량은 시간이 지나면서 감소하고 결국 고갈된다. 따라서, 일부 구현예에서, 제형이 단백질 농도가 낮은 환경에 얼마나 오랫동안 접근했는지에 따라, 제형 내의 단백질의 양은 초기 100 mg/mL 또는 그 이상의 양보다 적다. 일부 구현예에서, 본 발명의 2상 약학적 제형에서 단백질의 총량은 본 발명의 장치가 환자에서 사용되는 수명 동안 0.1 mg/mL 내지 500 mg/mL의 단백질일 것이다.
- [0082] 일부 구현예에서, 본 발명의 2상 약학적 제형의 단백질은 약 10 kD(즉, 10,000 달톤 또는 10,000 g/몰) 내지 약 200 kD, 약 25 kD 내지 약 160 kDa, 약 10 kD 내지 약 15 kD, 약 15 kD 내지 약 20 kDa, 약 20 kD 내지 약 25 kDa, 약 25 kD 내지 약 30 kDa, 약 30 kD 내지 약 35 kDa, 약 35 kD 내지 약 40 kDa, 약 40 kD 내지 약 45 kDa, 약 45 kD 내지 약 50 kDa, 약 50 kD 내지 약 55 kDa, 약 55 kD 내지 약 60 kDa, 약 60 kD 내지 약 65 kDa, 약 65 kD 내지 약 70 kDa, 약 75 kD 내지 약 80 kDa, 약 80 kD 내지 약 85 kDa, 약 85 kD 내지 약 90 kDa, 약 90 kD 내지 약 95 kDa, 약 95 kD 내지 약 100 kDa, 약 100 kD 내지 약 105 kDa, 약 105 kD 내지 약 110 kDa, 약 110 kD 내지 약 115 kDa, 약 115 kD 내지 약 120 kDa, 약 120 kD 내지 약 125 kDa, 약 125 kD 내지 약 130 kDa, 약 130 kD 내지 약 135 kDa, 약 135 kD 내지 약 140 kDa, 약 140 kD 내지 약 145 kDa, 약 145 kD 내지 약 150 kDa, 약 150 kD 내지 약 155 kDa, 약 155 kD 내지 약 160 kDa, 약 160 kD 내지 약 165 kDa, 약 165 kD 내지 약 170 kDa, 약 170 kD 내지 약 175 kDa, 약 175 kD 내지 약 180 kDa, 약 180 kD 내지 약 185 kDa, 약 185 kD 내지 약 190 kDa, 약 190 kD 내지 약 195 kD, 또는 약 195 kD 내지 약 200 kD의 분자량을 갖는다. 일부 구현예에서, 단백질은 나노바디(nanobody) 또는 약 12 내지 15 kD의 분자량을 갖는 유사한 크기의 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 Fab 또는 약 50 kD의 분자량을 갖는 유사한 크기의 단백질과 같은 항체 단편이다. 일부 구현예에서, 단백질은 단일-쇄 가변 단편(scFv) 또는 약 25 kD의 분자량을 갖는 유사한 크기의 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 수용체-Fc 융합 단백질 또는 약 90 kD 내지 110 kD의 분자량을 갖는 유사한 크기의 단백질이다. 일부 구현예에서, 단백질은 항체 또는 약 150 kD 내지 약 160 kD 사이의 분자량을 갖는 유사한 크기의 단백질이다.
- [0083] 일부 구현예에서, 단백질은 VEGF 길항제 예를 들어 애플리버셉트인데, 이는 트랩 분자, 라니비주맙 및 베바시주맙이며, 이들은 항체이다. 일부 구현예에서, 생체분자는 예를 들어 소분자 억제제, 가용성 수용체, 트랩 분자 또는 다른 융합 단백질, 항-PDGF 항체, RNA 또는 압타머일 수 있는 PDGF 길항제이다. 일부 구현예에서, 생체분자는 예를 들어 소분자 억제제, 가용성 수용체, 트랩 분자 또는 다른 융합 단백질, 항-Ang2 항체, RNA 또는 압타머일 수 있는 Ang2 길항제이다.
- [0084] 일부 구현예에서, 본 발명의 2상 약학적 제형 중의 단백질의 총 농도는 약 25 mg/mL 내지 1,400 mg/mL 또는 그 이상이다. 일부 구현예에서, 건조 단백질(예컨대 동결건조되거나 또는 분무건조된)은 PEG와 조합된다. 주어진 부피에 적합할 수 있는 단백질의 총량은 고체 단백질의 밀도와 혼합물 중에 단백질과 함께 포함된 PEG 및 기타 부형제의 양에 따라 달라진다. 미국 특허출원 제2013/0324942호는 장치 내의 약물의 투여량 및 농도에 대해 참고로 인용된다. 장치에 사용될 수 있는 부피는 장치에 넣을 수 있는 단백질 농도를 어느 정도 제한한다. 상한 경계치는 단백질 분말의 밀도에 의해 한정되며 많은 것에 대한 제한이 저장조 부피(이는 단백질 제형에 따라 다름)로 채워질 수 있다. 미국 특허 제8,623,395호는 애플리버셉트를 포함하는 VEGF 길항제와 같은 장치 부피 및 단백질 함량에 대해 본원에 참고로 인용된다.
- [0085] 일부 구현예에서, 단백질의 총 농도는 1,400 mg/mL를 초과할 수 있다. 일부 구현예에서, 총 단백질 또는 다른

생체분자 농도는 약 25 mg/mL, 약 26 mg/mL, 약 27 mg/mL, 약 28 mg/mL, 약 27 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 50 mg/mL, 약 55 mg/mL, 60 mg/mL, 약 65 mg/mL, 70 mg/mL, 약 75 mg/mL, 약 80 mg/mL, 약 85 mg/mL, 90 mg/mL, 약 95 mg/mL, 100 mg/mL, 110 mg/mL, 약 120 mg/mL, 약 130 mg/mL, 약 140 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 160 mg/mL, 약 170 mg/mL, 약 180 mg/mL, 약 190 mg/mL, 약 200 mg/mL, 약 210 mg/mL, 약 220 mg/mL, 약 230 mg/mL, 약 240 mg/mL, 약 250 mg/mL, 약 260 mg/mL, 약 270 mg/mL, 약 280 mg/mL, 약 290 mg/mL, 약 300 mg/mL, 약 310 mg/mL, 약 320 mg/mL, 약 330 mg/mL, 약 340 mg/mL, 약 350 mg/mL, 약 360 mg/mL, 약 370 mg/mL, 약 380 mg/mL, 약 390 mg/mL, 약 400 mg/mL, 약 410 mg/mL, 약 420 mg/mL, 약 430 mg/mL, 약 440 mg/mL, 약 450 mg/mL, 약 460 mg/mL, 약 470 mg/mL, 약 480 mg/mL, 약 490 mg/mL, , 약 500 mg/mL, 약 510 mg/mL, 약 520 mg/mL, 약 530 mg/mL, 약 540 mg/mL, 약 550 mg/mL, 약 560 mg/mL, 약 570 mg/mL, 약 580 mg/mL, 약 590 mg/mL, 약 600 mg/mL, 약 610 mg/mL, 약 620 mg/mL, 약 630 mg/mL, 약 640 mg/mL, 약 650 mg/mL, 약 660 mg/mL, 약 670 mg/mL, 약 680 mg/mL, 약 690 mg/mL, 약 700 mg/mL, 약 710 mg/mL, 약 720 mg/mL, 약 730 mg/mL, 약 740 mg/mL, 약 750 mg/mL, 약 760 mg/mL, 약 770 mg/mL, 약 780 mg/mL, 약 790 mg/mL, 약 800 mg/mL, 약 810 mg/mL, 약 820 mg/mL, 약 830 mg/mL, 약 840 mg/mL, 약 850 mg/mL, 약 860 mg/mL, 약 870 mg/mL, 약 880 mg/mL, 약 890 mg/mL, 약 900 mg/mL, 약 910 mg/mL, 약 920 mg/mL, 약 930 mg/mL, 약 940 mg/mL, 약 950 mg/mL, 약 960 mg/mL, 약 970 mg/mL, 약 980 mg/mL, 약 990 mg/mL, 약 1000 mg/mL, 약 1025 mg/mL, 약 1050 mg/mL, 약 1075 mg/mL, 약 1100 mg/mL, 약 1125 mg/mL, 약 1150 mg/mL, 약 1175 mg/mL, 약 1200 mg/mL, 약 1225 mg/mL, 약 1250 mg/mL, 약 1275 mg/mL, 약 1300 mg/mL, 약 1325 mg/mL, 약 1350 mg/mL, 약 1375 mg/mL, 약 1400 mg/mL, 또는 약 1425 mg/mL이다. 일부 구현예에서, 총 단백질 농도는 1400 mg/mL 초과이다.

[0086] 일부 구현예에서, 본 발명의 2상 약학적 제형의 가용성 상 중의 단백질의 농도는 약 0.05 mg/mL 내지 약 100 mg/mL이다. 일부 구현예에서, 가용성 상 중의 단백질 또는 다른 생체분자의 농도는 약 0.05 mg/mL, 약 0.06 mg/mL, 약 0.07 mg/mL, 약 0.08 mg/mL, 약 0.09 mg/mL, 약 0.1 mg/mL, 약 0.5 mg/mL, 약 1 mg/mL, 약 1.5 mg/mL, 약 2 mg/mL, 약 2.5 mg/mL, 약 3 mg/mL, 약 3.5 mg/mL, 약 4 mg/mL, 약 4.5 mg/mL, 약 5 mg/mL, 약 5.5 mg/mL, 약 6 mg/mL, 약 6.5 mg/mL, 약 7 mg/mL, 약 7.5 mg/mL, 약 8 mg/mL, 약 8.5 mg/mL, 약 9 mg/mL, 약 9.5 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 11 mg/mL, 약 12 mg/mL, 약 13 mg/mL, 약 14 mg/mL, 약 15 mg/mL, 약 16 mg/mL, 약 17 mg/mL, 약 18 mg/mL, 약 19 mg/mL, 약 20 mg/mL, 약 21 mg/mL, 약 22 mg/mL, 약 23 mg/mL, 약 24 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 26 mg/mL, 약 27 mg/mL, 약 28 mg/mL, 약 29 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 31 mg/mL, 약 32 mg/mL, 약 33 mg/mL, 약 34 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 36 mg/mL, 약 37 mg/mL, 약 38 mg/mL, 약 39 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 41 mg/mL, 약 42 mg/mL, 약 43 mg/mL, 약 44 mg/mL, 약 45 mg/mL, 약 46 mg/mL, 약 47 mg/mL, 약 48 mg/mL, 약 49 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 51 mg/mL, 약 52 mg/mL, 약 53 mg/mL, 약 54 mg/mL, 약 55 mg/mL, 약 56 mg/mL, 약 57 mg/mL, 약 58 mg/mL, 약 59 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 61 mg/mL, 약 62 mg/mL, 약 63 mg/mL, 약 64 mg/mL, 약 65 mg/mL, 약 66 mg/mL, 약 67 mg/mL, 약 68 mg/mL, 약 69 mg/mL, 약 70 mg/mL, 약 71 mg/mL, 약 72 mg/mL, 약 73 mg/mL, 약 74 mg/mL, 약 75 mg/mL, 약 76 mg/mL, 약 77 mg/mL, 약 78 mg/mL, 약 79 mg/mL, 약 80 mg/mL, 약 81 mg/mL, 약 82 mg/mL, 약 83 mg/mL, 약 84 mg/mL, 약 85 mg/mL, 약 86 mg/mL, 약 87 mg/mL, 약 88 mg/mL, 약 89 mg/mL, 약 90 mg/mL, 약 91 mg/mL, 약 92 mg/mL, 약 93 mg/mL, 약 94 mg/mL, 약 95 mg/mL, 약 96 mg/mL, 약 97 mg/mL, 약 98 mg/mL, 약 99 mg/mL, 또는 약 100 mg/mL이다. 일부 구현예에서, 가용성 상 중의 단백질 또는 다른 생체분자는 100 mg/mL 초과일 수 있다.

[0087] 2상 제형의 일부 구현예에서, 2상 제형(가용성 및 불용성 상 둘 다)에서 단백질의 총량에 대한 가용성 상 중의 단백질의 비율은 50% 미만이다. 일부 구현예에서, 2상 제형 내의 단백질 총량에 대한 가용성 상 중의 단백질의 비율은 약 50%, 약 49%, 약 48%, 약 47%, 약 46%, 약 45%, 약 44%, 약 43%, 약 42%, 약 41%, 약 40%, 약 39%, 약 38%, 약 37%, 약 36%, 약 35%, 약 34%, 약 33%, 약 32%, 약 31%, 약 30%, 약 29%, 약 28%, 약 27%, 약 26%, 약 25%, 약 24%, 약 23%, 약 22%, 약 21%, 약 20%, 약 19%, 약 18%, 약 17%, 약 16%, 약 15%, 약 14%, 약 13%, 약 12%, 약 11%, 약 10%, 약 9%, 약 8%, 약 7%, 약 6%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 약 1%, 약 0.1% 내지 약 1%, 또는 0.1% 미만이다.

[0088] 일부 구현예에서, PEG는 약 25 mg/mL 내지 약 150 mg/mL의 농도로 조성물 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 조성물 중의 PEG의 농도는 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 65 mg/mL, 약 70 mg/mL, 약 75 mg/mL, 약 80 mg/mL, 약 85 mg/mL, 약 90 mg/mL, 약 95 mg/mL, 약 100 mg/mL, 약 105 mg/mL, 약 110 mg/mL, 약 115 mg/mL, 약 120 mg/mL, 약 125 mg/mL, 약 130 mg/mL, 약 135 mg/mL, 약 140 mg/mL, 약 145 mg/mL, 또는 약 150 mg/mL이다.

- [0089] 일부 구현예에서, 수크로오스는 약 0.5%(w/v) 내지 약 25%(w/v)의 농도로 본 발명의 2상 제형에 포함된다. 일 구현예에서, 수크로오스는 약 0.5%(w/v), 약 1%(w/v), 약 1.5%(w/v), 약 2%(w/v), 약 2.5%(w/v), 약 3%(w/v), 약 3.5%(w/v), 약 4%(w/v), 약 4.5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 약 10%(w/v), 약 11%(w/v), 약 12%(w/v), 약 13%(w/v), 약 14%(w/v), 약 15%(w/v), 약 16%(w/v), 약 17%(w/v), 약 18%(w/v), 약 19%(w/v), 약 20%(w/v), 약 21%(w/v), 약 22%(w/v), 약 23%(w/v), 약 24%(w/v) 또는 약 25%(w/v)의 농도로 본 발명의 2상 제형에 포함된다.
- [0090] 또 다른 측면에서, 본 발명은 생리학적 온도에서 장시간에 걸쳐 안정하게 유지되는 약물의 장기간 전달을 위한 약물 전달 장치를 제공한다. 본 발명의 약물 전달 장치는 본 발명의 안정한 2상 약학적 제형, 안정한 2상 약학적 제형을 함유하는 저장조 챔버, 저장조 챔버를 둘러싸는 하우징 및 단백질의 농도가 더 낮은 환경에 가용성 상 단백질의 접근을 허용하는 하우징 내의 반투막 또는 다른 다공성 구조를 함유한다.
- [0091] 일 구현예에서, 본 발명의 약물 전달 장치는 약 5  $\mu$ l 내지 약 50  $\mu$ l, 약 10  $\mu$ l 내지 약 25  $\mu$ l, 약 5  $\mu$ l, 약 6  $\mu$ l, 약 7  $\mu$ l, 약 8  $\mu$ l, 약 9  $\mu$ l, 약 10  $\mu$ l, 약 11  $\mu$ l, 약 12  $\mu$ l, 약 13  $\mu$ l, 약 14  $\mu$ l, 약 15  $\mu$ l, 약 16  $\mu$ l, 약 17  $\mu$ l, 약 18  $\mu$ l, 약 19  $\mu$ l, 약 20  $\mu$ l, 약 21  $\mu$ l, 약 22  $\mu$ l, 약 23  $\mu$ l, 약 24  $\mu$ l, 약 25  $\mu$ l, 약 26  $\mu$ l, 약 27  $\mu$ l, 약 28  $\mu$ l, 약 29  $\mu$ l, 약 30  $\mu$ l, 약 31  $\mu$ l, 약 32  $\mu$ l, 약 33  $\mu$ l, 약 34  $\mu$ l, 약 35  $\mu$ l, 약 36  $\mu$ l, 약 37  $\mu$ l, 약 38  $\mu$ l, 약 39  $\mu$ l, 약 40  $\mu$ l, 약 41  $\mu$ l, 약 42  $\mu$ l, 약 43  $\mu$ l, 약 44  $\mu$ l, 약 45  $\mu$ l, 약 46  $\mu$ l, 약 47  $\mu$ l, 약 48  $\mu$ l, 약 49  $\mu$ l, 또는 약 50  $\mu$ l의 부피를 갖는다.
- [0092] 일 구현예에서, 본 발명의 저장조 챔버는 약 0.1 mg 내지 약 10 mg의 본 발명의 단백질을 함유한다. 일부 구현예에서, 저장조 챔버는 약 0.1 mg, 약 0.2 mg, 약 0.3 mg, 약 0.4 mg, 약 0.5 mg, 약 0.6 mg, 약 0.7 mg, 약 0.8 mg, 약 0.9 mg, 약 1 mg, 약 2mg, 약 3mg, 약 4mg, 약 5mg, 약 6mg, 약 7mg, 약 8mg, 약 9mg 또는 약 10mg의 단백질의 총량을 함유한다.
- [0093] 일부 구현예에서, 본 발명의 저장조 챔버는 눈의 유리체 또는 다른 수용 조직 내로 장치의 삽입을 허용하는 크기를 갖는다.
- [0094] 일부 구현예에서, 본 발명의 저장조 챔버는 장치의 환자 피하 배치를 허용하는 크기를 갖는다.
- [0095] 일 구현예에서, 본 발명의 약물 전달 장치는 약 25  $\mu$ l 내지 약 150  $\mu$ l, 약 25  $\mu$ l, 약 30  $\mu$ l, 약 35  $\mu$ l, 약 40  $\mu$ l, 약 45  $\mu$ l, 약 50  $\mu$ l, 약 55  $\mu$ l, 약 60  $\mu$ l, 약 65  $\mu$ l, 약 70  $\mu$ l, 약 75  $\mu$ l, 약 80  $\mu$ l, 약 85  $\mu$ l, 약 90  $\mu$ l, 약 95  $\mu$ l, 약 100  $\mu$ l, 약 105  $\mu$ l, 약 110  $\mu$ l, 약 115  $\mu$ l, 약 120  $\mu$ l, 약 125  $\mu$ l, 약 130  $\mu$ l, 약 135  $\mu$ l, 약 140  $\mu$ l, 약 145  $\mu$ l, 또는 약 150  $\mu$ l의 부피를 갖는다.
- [0096] 일 구현예에서, 본 발명의 저장조 챔버는 약 25 mg 내지 약 180 mg의 본 발명의 단백질을 함유한다. 일부 구현예에서, 저장조 챔버는 약 25 mg, 약 30 mg, 약 35 mg, 약 40 mg, 약 45 mg, 약 50 mg, 약 55 mg, 약 60 mg, 약 65 mg, 약 70 mg, 약 75 mg, 약 80 mg, 약 85 mg, 약 90 mg, 약 95 mg, 약 100 mg, 약 105 mg, 약 110 mg, 약 115 mg, 약 120 mg, 약 125 mg, 약 130 mg, 약 135 mg, 약 140 mg, 약 145 mg, 약 150 mg, 약 155 mg, 약 160 mg, 약 165 mg, 약 170 mg, 약 175 mg, 또는 약 180 mg의 단백질 총량을 함유한다.
- [0097] **실시예**
- [0098] 본 발명은 하기 실시예에 의해 예시된다. 본 발명은 이들 실시예의 특정 세부사항으로 한정되지 않는다.
- [0099] 실시예 1: 단백질 및 PEG(2상) 혼합물 중의 단백질의 방출 및 안정성
- [0100] 3개월 초과 동안 37°C에서 안정하게 유지되는 100 mg/ml 내지 300 mg/ml의 단백질을 함유하는 애플리버셉트 제형을 개발하였다. 수용액 중의 다양한 총 농도의 애플리버셉트 단백질을 용액 중의 다양한 농도의 3,350 g/mol (PEG3350)의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜과 조합하였다. 한 실험에서, 5 mg/ml 내지 50 mg/ml의 애플리버셉트를 45 mg/ml 내지 150 mg/ml의 PEG3350과 조합하였다. 액체 애플리버셉트 조합물(흑색 원)의 용해도를 PEG3350 농도에 대해 플롯했다(도 10). 액체 애플리버셉트의 log 용해도는 PEG3350 농도에 대해 플롯했다(흑색 다이아몬드, 도 11). 모든 농도의 애플리버셉트는 도 10에 도시된 바와 같이 본질적으로 동일한 용해도 곡선을 생성했다.
- [0101] 또 다른 실험에서, 동결-건조된 애플리버셉트를 건조한 PEG3350(수크로오스 포함)과 조합한 다음 실험용 PEG3350 농도를 얻기 위해 재구성하였다. PEG 농도가 증가함에 따라 애플리버셉트 용해도가 감소함을 보여주는 결과가 도 10(백색 원) 및 도 11(흑색 사각형)에 도시되어 있다. 재구성된 고체 단백질(도 11의 흑색 사각형)

과 초기 액체 단백질(도 11의 흑색 다이아몬드) 사이의 기울기(즉, 용해도)의 차이는 수크로오스 함량의 차이 때문일 가능성이 높으며 고체 또는 액체로서의 출발 단백질의 물리적 상태 때문은 아니다. 고체 애플리머셉트에는 수 크로스가 포함되어 있지만 액체 애플리머셉트에는 포함되지 않았다. 30 mg/ml PEG3350에서, 애플리머셉트의 용해도는 영향을 받지 않는다(예를 들어, 이는 적어도 45 mg/ml이다). 가용성 애플리머셉트의 농도뿐만 아니라 본래의 형태를 유지하는 총 애플리머셉트의 일부를 결정하였다. 초 고성능 크기 배제 크로마토그래피(UPSEC)에 의해 결정시, 애플리머셉트 순도는 30 내지 150 mg/ml의 PEG3350을 갖는 모든 용액(액체 및 고체 재구성된)에서 95% 초과로 유지되었다.

[0102] 용액으로부터 침전된(액체 제형 실험) 또는 배제된(재구성된 실험) 애플리머셉트가 순차적으로 가용화되어 원래의 형태를 유지하는지 여부를 테스트하기 위해, 애플리머셉트/PEG 혼합물을 150 mg/ml PEG 내지 30 mg/ml PEG로 희석했고, 이는 앞서 애플리머셉트 용해도를 한정하지 않는 것으로 결정되었다. 여기에서 본질적으로 모든 애플리머셉트가 회수되었으며, 98% 이상이 본래의 형태를 가졌다(표 2).

[0103] [표 2]

| 요약  | % HMW | % 비변성 | %LMW | % 회수율 |
|-----|-------|-------|------|-------|
| 액체  | 1.14  | 98.86 | 0    | 103   |
| 재구성 | 1.34  | 98.66 | 0    | 109   |

[0104]

[0105] 실시예 2: 제어된 방출 저장조 장치

[0106] 단백질의 제어된 방출을 위한 저장조 장치는 투과성 박막 폴리카프로락톤(PCL)으로 제조되었다. 장치의 하우징은 항체 또는 수용체-Fc-융합 다이머인 비-다공성 PCL 및 나노-채널 또는 마이크로기공을 포함하는 다공성 PCL의 스트립을 함유하였다. 다공성 멤브레인은 채널을 형성하기 위한 템플레이팅(templating)에 의해 또는 구불구불한 기공을 형성하기 위한 포로젠으로서 PEG를 사용함으로써 제조되었다.

[0107] 멤브레인 내의 기공의 제조 방법은 문헌[Bernards et al., "thin film polymer devices for constant-rate protein delivery," 12 NanoLett 5355-61 (2012)]; [He et al., "Use of a nanoporous biodegradable miniature device to regulate cytokine release for cancer treatment," 151(3) J. Control Release 239-45 (2011)]; [Gin and Noble, "Designing the Next Generation of Chemical Separation Membranes," 332 Science 674-676 (2011)]; [Wirtz et al., "Transport properties of template synthesized gold and carbon nanotube membranes," 1(3,4) Int. J. Nanoscience 255 (2002)]; 및 [Li et al., "Preparation and characterization of chitosan nanopores membranes for the transport of drugs," 420(2) Int. J. Pharm. 371-7 (2011)]에 기재되어 있다.

[0108] 나노채널 다공성 PCL 멤브레인("나노PCL")은 약 20 nm 직경의 기공을 포함하고 약 500 nm의 두께로 캐스팅되었다. 나노PCL 멤브레인은 구조적 완전성을 위해 마이크로다공성 백킹 층에 적용되었다. 마이크로다공성 멤브레인("mpPCL")은 약 1 내지 2 미크론의 단면 직경을 갖는 기공을 포함하고, 1 미크론 미만으로 추정되는 상호연결 기공 크기를 갖는다. 문헌[Bernards, 2012] 참조.

[0109] mpPCL 박막 저장조 장치는 비-다공성 PCL 필름과 다공성 PCL 필름을 캐스팅하여 제조되었다. 이어서, 다공성 필름의 스트립을 접합부를 가열 밀봉함으로써 다공성 필름의 두 섹션 사이에서 접합시켰다. 생성된 복합체 필름(즉, 다공성 스트립을 함유하는 비-다공성 필름)을 로드-형 템플릿을 사용하여 실린더(튜브) 내로 롤링하고 한쪽 단부를 가열 밀봉하고 다른 단부를 개방한 채로 남겨두었다. 약물 물질(아래)을 개방 단부에 로딩하고, 이어서 개방 단부를 가열 밀봉시켰다. PCL 멤브레인은 폴리디메틸실록산 내부 또는 폴리디메틸실록산 사이에 내장된 전원에 의해 제어되는 전기적으로 가열된 니켈-크롬 와이어를 사용하여 가열 밀봉되었다.

[0110] 하나의 장치에서, 3 내지 4 mg의 애플리머셉트 단백질을 약 1 내지 1.5 mm의 직경 및 약 8 내지 10 mm의 길이를 갖는 PCL 튜브에 로딩하였다.

[0111] 장치로부터의 단백질 방출 속도에 영향을 미치는 파라미터를 시험하였다. 이들 파라미터는 멤브레인 디자인(즉, 나노PCL 대 mpPCL), 멤브레인 두께(28  $\mu\text{m}$ , 63  $\mu\text{m}$  및 106  $\mu\text{m}$ ) 및 다공성 표면적(23  $\text{mm}^2$  대 60  $\text{mm}^2$ )을 포함한다. 50일 동안의 방출 속도는 나노PCL 디자인에 비해 mpPCL 디자인에서 대략 소정의 배수로 더 빨랐다. 또한, 다공

성 "창"의 표면적은 방출 속도에 유의한 영향을 미쳤다.  $60\text{ mm}^2$  면적의 다공성 구조를 가지며 3 mg의 애플리버셉트가 로딩된 장치는 하루 약 105  $\mu\text{g}$ 의 애플리버셉트를 방출했다.  $23\text{ mm}^2$  면적의 다공성 구조를 가지며 3 mg의 애플리버셉트 단백질이 로딩된 장치는 하루에 약 42  $\mu\text{g}$ 의 애플리버셉트를 방출했다.

[0112] 창 표면적은 방출 속도에 영향을 미치지 않지만 멤브레인 두께는 영향을 미치지 않았다. 따라서, 다공성 구조의 표면적을 변화시킴으로써, 단백질의 방출 속도는 장치 크기와 무관하게 제어될 수 있다. 이 실시예에서, 애플리버셉트의 용해도를 10 mg/mL로 제한하면 저장조 농도가 일정하게 유지되어 단백질 방출 속도를 다공성 면적의 조절에 의해 제어할 수 있다.

[0113] 실시예 3: 저장조 장치로부터 단백질의 방출

[0114] PCL 저장조 장치로부터 단백질의 방출 속도는 가용성 단백질의 농도 및 다공성 구조의 표면적에 의존한다. PEG3350/애플리버셉트 2상 조합물로 로딩된 PCL 장치를 수성 환경에 노출시켰다. 장치로부터 방출되는 애플리버셉트는 시간에 따라 측정되었다.

[0115] 하나의 실험에서, 가용성 상 중의 애플리버셉트의 농도는 PEG3350의 농도에 따라 약 5 mg/ml 내지 약 45 mg/ml로 다양하였다. 다공성 구조의 표면적은 약  $23\text{ mm}^2$ 로 일정하게 유지되었다. 여기서, 애플리버셉트의 가용성 상 농도가 약 6 mg/ml인 경우, 방출 속도는 약  $0.32\text{ }\mu\text{g/일-mm}^2$ 이었다. 애플리버셉트의 가용성 상 농도가 약 46 mg/ml인 경우, 방출 속도는 약  $3.3\text{ }\mu\text{g/일-mm}^2$ 이었다(도 12).

[0116] 또 다른 실험에서, 가용성 상 애플리버셉트의 농도는 약 70 mg/ml의 PEG3350의 농도와 함께 7 mg/ml로 일정하게 유지되었으며; 다공성 구조의 표면적은 약  $13\text{ mm}^2$  내지 약  $45\text{ mm}^2$ 로 변했다. 여기서, 다공성 창 표면적이 약  $13\text{ mm}^2$ 인 경우, 단백질은 mg/ml 당 약  $0.49\text{ }\mu\text{g/일}$ 의 속도로 방출되었다. 다공성 창 표면적이 약  $45\text{ mm}^2$ 인 경우, 단백질은 약  $4.9\mu\text{g/mg/ml}$ 의 속도로 방출되었다(도 13).

[0117] PCL 장치에서 2상 애플리버셉트 혼합물로부터 가용성 애플리버셉트의 안정성과 방출 속도는 완충된 생리학적 등온 용액에서 37°C에서 일정 기간 동안 평가되었다. PCL 장치는 약 30 내지  $45\text{ mm}^2$ 의 다공성 구조 면적을 가졌다. 각 장치에는 약 2.7 mg 내지 3.7 mg의 애플리버셉트가 로딩되어 있다. 하나의 실험에서, PEG3350의 농도는 약 100 mg/ml이었고 가용성 상 애플리버셉트의 농도는 약 2 mg/ml이었다(도 14a).

[0118] 또 다른 실험에서, PEG3350의 농도는 약 70 mg/ml이었고 가용성 상 애플리버셉트의 농도는 약 7 mg/ml이었다(도 14b). 모델 생리학적 조건하에서 35일 후에 70 mg/ml PEG 및 100 mg/ml PEG 저장조의 방출 속도들 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 평균 방출 속도는 두 세트의 실험에 걸쳐 약  $40\text{ }\mu\text{g/일} \pm 10\text{ }\mu\text{g/일}$ 이었다(도 15a 및 15b).

[0119] 또 다른 실험에서, PEG3350의 농도는  $80\text{ mg/mL} \pm 20\text{ mg/mL}$ 이고 애플리버셉트의 총 농도(가용성 + 불용성)는 약 60 mg/mL 내지 약 210 mg/mL이었다. 장치로부터의 가용성 애플리버셉트의 방출 속도는 약 0.03 mg 내지 약 0.055 mg/일의 범위였다(표 3). 시간 경과에 따라 장치로부터 방출된 가용성 애플리버셉트의 안정성은 각 시점에서의 샘플에 남아있는 애플리버셉트 모노머의 상대적 양을 정량화하여 평가했다. 모노머 애플리버셉트의 상대적 양은 도 15에서 퍼센트(%) 순도로 표시된다. 모노머를 고성능 크기-배제 크로마토그래피로 정량화하였다. PEG3350( $80\text{ mg/mL} \pm 20\text{ mg/mL}$ )을 함유하는 장치로부터 방출된 애플리버셉트의 %순도를 수크로오스만을 함유하고 PEG를 함유하지 않은 장치로부터 방출된 애플리버셉트의 %순도와 비교하였다. 61일에 장치로부터 방출된 애플리버셉트의 약 85%가 모노머성으로 남아있었다. 그 결과를 도 15에 도시하였다.

[0120] [표 3]

| PEG<br>로드(mg) | 약물<br>로드(mg) | 장치<br>면적(mm <sup>2</sup> ) | 수화량(ml) | 다공성<br>면적(mm <sup>2</sup> ) | mg/ml<br>PEG | mg/ml<br>약물 | 약물의<br>mg/일<br>방출 |
|---------------|--------------|----------------------------|---------|-----------------------------|--------------|-------------|-------------------|
| 1.2           | 3.7          | 66                         | 0.018   | 33                          | 67           | 206         | 0.032             |
| 2.9           | 3.2          | 90                         | 0.042   | 45                          | 69           | 76          | 0.045             |
| 2.9           | 2.8          | 80                         | 0.046   | 40                          | 63           | 61          | 0.031             |
| 4             | 3.0          | 75                         | 0.040   | 38                          | 99           | 74          | 0.055             |
| 3.3           | 2.9          | 82                         | 0.032   | 41                          | 104          | 91          | 0.038             |

[0121]

[0122]

실시예 4: 2상 제형-함유 나노/마이크로다공성 장치

[0123]

마이크로다공성 또는 나노다공성 PCL 필름 조각을 가열 밀봉을 사용하여 두 조각의 비-다공성 PCL 필름 사이에 접합시켰다. 가열 밀봉은 폴리디메틸실록산(PDMS)의 두 슬래브(slab) 사이에 매설된 니켈-크롬 와이어 위에 필름을 정렬시킴으로써 이루어졌다. 와이어는 와이어를 통해 전류를 통과시킴으로써 가열되었다. 그 다음, 필름을 표적 장치 치수에 기초하여 직경이 선택되는 실린더형 몰드 주위로 롤링하였다. 그 다음, 필름을 실린더의 길이 방향 축을 따라 그리고 실린더의 한 단부 상에 가열 밀봉하여 하나의 개방 단부를 갖는 중공 실린더를 생성하였다. 동결건조된 단백질을 실린더형 펠렛으로 압축하고 개방 단부를 통해 저장조로 로딩하였다. PEG3350을 마찬가지로 펠렛 처리하고 실린더의 개방 단부를 통해 로딩하였다.

[0124]

각 로딩 단계 전후에, 장치를 칭량하여 로딩된 질량을 결정하였다. 이어서, 장치를 동일한 가열 밀봉 방법을 사용하여 개방 단부를 따라 밀봉하였다. PEG3350 로딩은 수화 전후의 장치 중량의 차이를 계산하여 결정된 로딩된 질량 및 수화 부피에 기초하여 계산되었다.

[0125]

로딩된 장치를 37°C에서 pH 7.2의 평형 염 용액-유사(BSS-유사)에서 배양하였다. 각 시점에서, 장치를 BSS-유사 배지로부터 제거하고 BSS-유사 배지의 신선한 분취액에 넣고 다시 배양시켰다. 장치를 제거한 방출 배지는 분석을 위해 보관하였다. 각 시점에서, 샘플을 UP-SEC로 분석하여 단백질 방출량 및 단백질 %순도를 정량화하였다. 방출된 단백질의 %순도는 도 15에 도시하였다. 단백질 방출 속도는 가용성 단백질 농도와 직접적으로 관련이 있다(도 12).

[0126]

PEG 농도가 증가하면서, 단백질의 용해도는 감소하였고 단백질의 안정성은 약 0.05 mg/mL의 최소 가용성 농도로 증가하였다. 장치 저장조 중의 단백질의 용해도를 제한함으로써, PEG는 확산의 구동력을 제한하며, 즉, 저장조 중의 가용성 상 단백질 농도를 낮추면 생리학적 환경과 제형 사이의 단백질 농도 차이가 감소하고 장치 저장조로부터의 단백질의 방출 속도가 감소하였다. 용해도를 제한함으로써, PEG는 또한 잔여 단백질의 총량이 단백질에 대한 용해도 한계 미만이 될 때까지 장치 저장조에서 일정한 단백질 농도를 유지하였다.

[0127]

실시예 5: 수용체-Fc-융합 단백질의 생체내 방출

[0128]

PEG가 로딩된 마이크로다공성 PCL 장치와 약 1.6 mg의 2상 애플리버셉트를 아프리카 녹색 원숭이(그룹 2)에 유리체강내로 이식하였다. 대조군 원숭이는 애플리버셉트를 함유하지 않는 마이크로다공성 PCL 장치를 받았다(그룹 1). 조직 샘플을 이식 후 다른 날에 대조군(그룹 1) 및 실험군(그룹 2)으로부터 수집하였다. 각각의 샘플에서 애플리버셉트의 양을 VEGF를 포획 분자로 하는 ELISA를 사용하여 결정하였다.

[0129]

약물-부재 장치를 받은 동물(그룹 1)로부터 수집한 혈장 샘플 또는 이후에 애플리버셉트가 로딩된 장치를 받은 동물(그룹 2)로부터의 기저 혈장 샘플에서 유리 또는 결합된 애플리버셉트가 검출되지 않았다. 그룹 2 동물로부터 수집한 적어도 하나의 혈장 샘플에서 유리 애플리버셉트가 검출되었다. 활성 단백질이 장치로부터 방출되고 표적 조직에서 내인성 VEGF에 결합할 수 있음을 나타내는 네 그룹 2 동물들 중 세 그룹으로부터 수집된 혈장 샘플에서 결합된 애플리버셉트가 검출되었다.

[0130]

그룹 2의 4마리 동물 모두로부터 수집한 수성 유머 샘플에서 유리 애플리버셉트가 검출되었다. 유리체에서, 결합된 애플리버셉트가 그룹 2 동물 중 적어도 하나에서 검출되었고, 유리 애플리버셉트는 적어도 하나의 그룹 2 동물의 맥락막 및 망막 샘플에서 검출되었다. 유리 애플리버셉트는 그룹 1 동물로부터 수집한 유머, 맥락막, 망막 또는 유리질 샘플에서 검출되지 않았다.

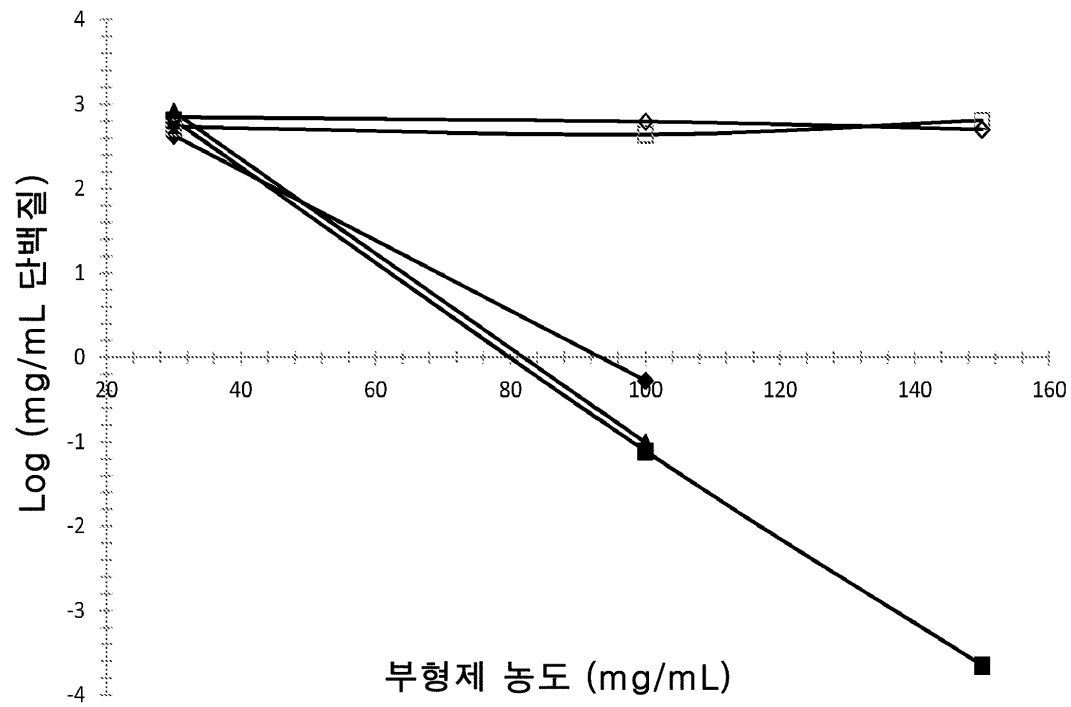
[0131]

이러한 결과는 애플리버셉트가 안구 내에서 생체내 방출되고 2상 애플리버셉트로 충전된 마이크로다공성 장치로

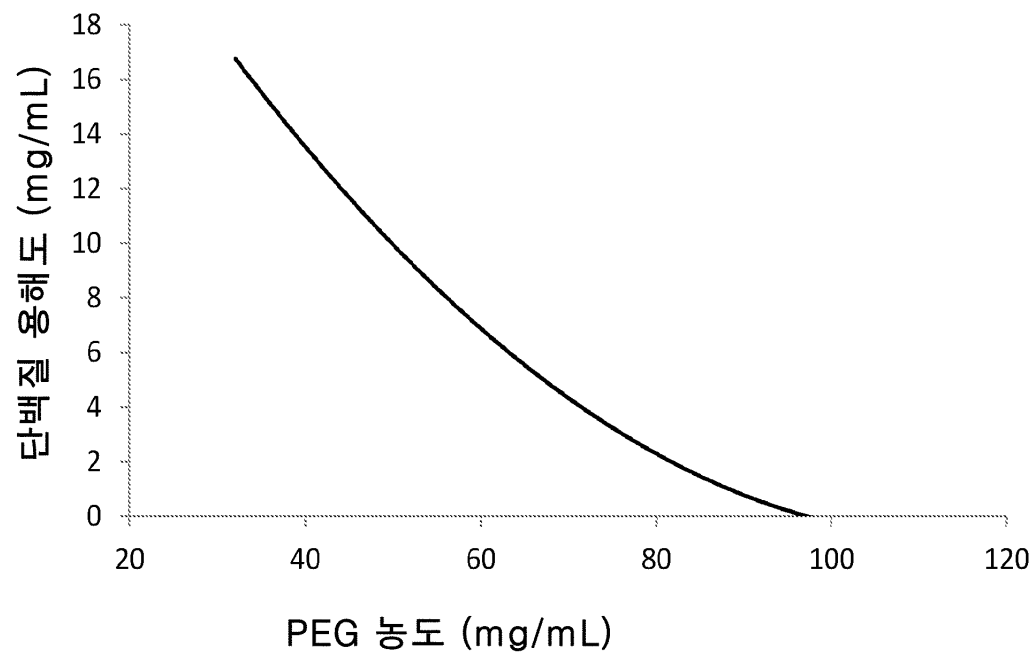
부터 표적 환경으로 이동한다는 것을 보여준다.

도면

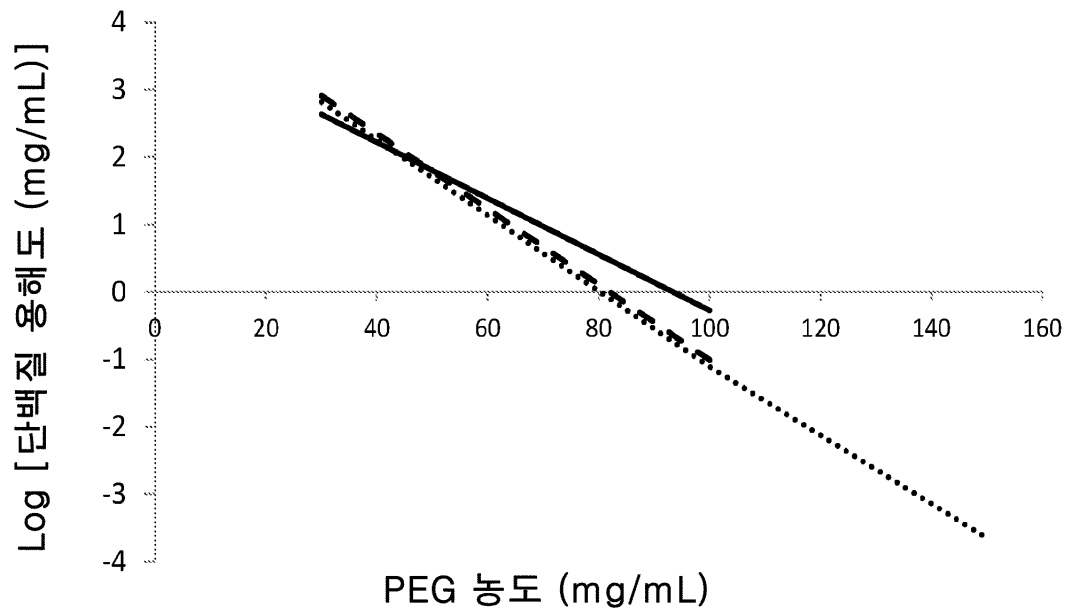
도면1



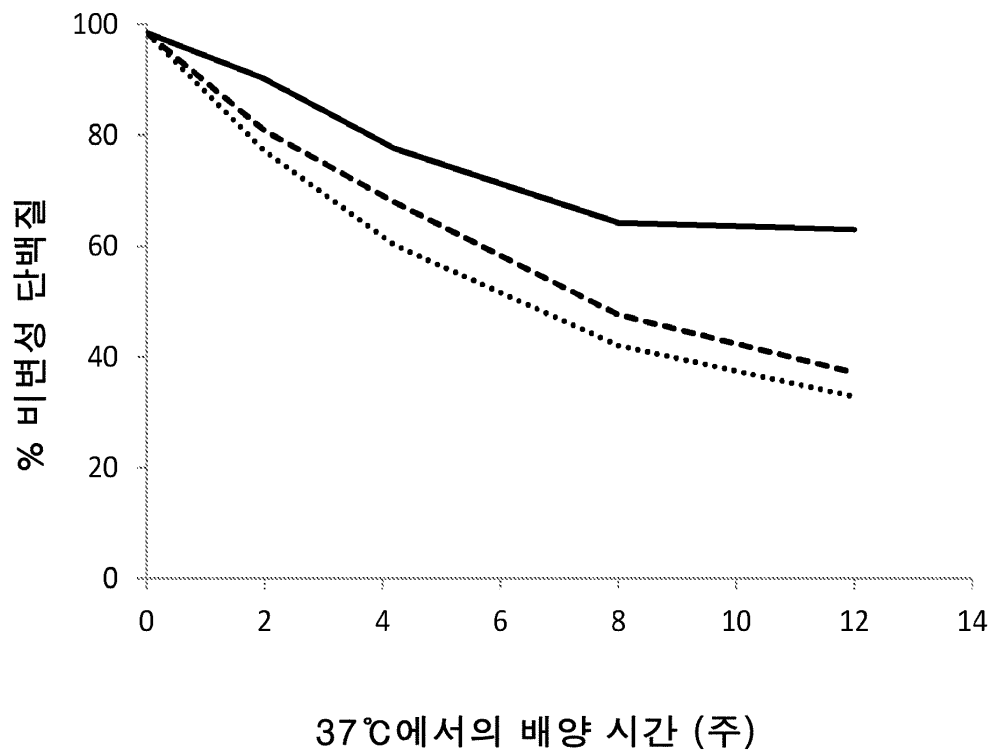
도면2



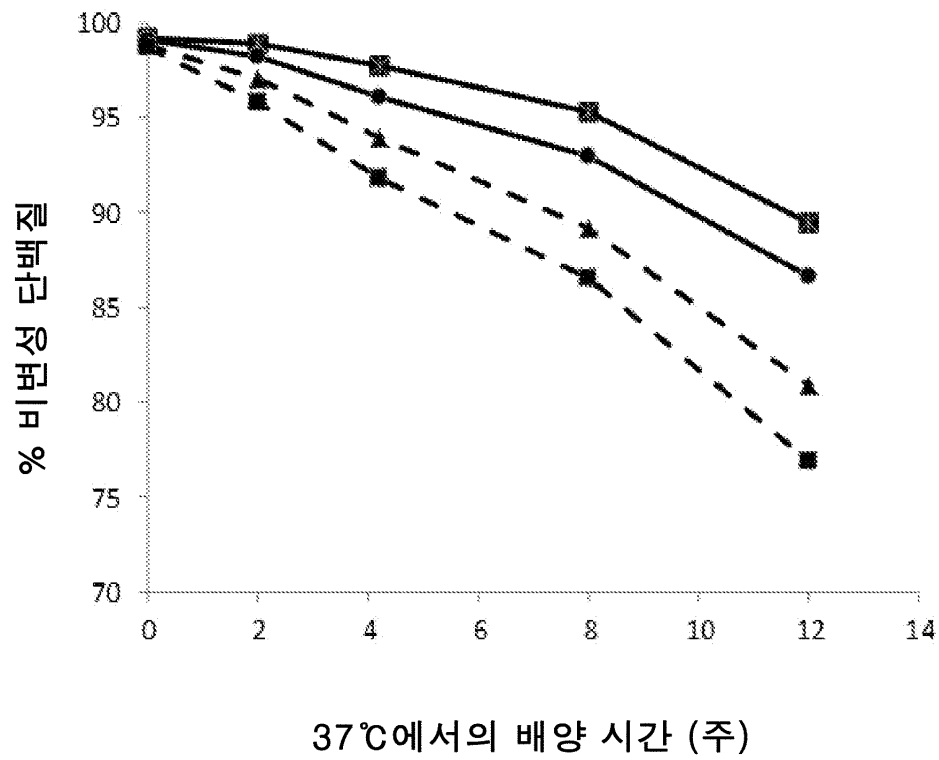
도면3



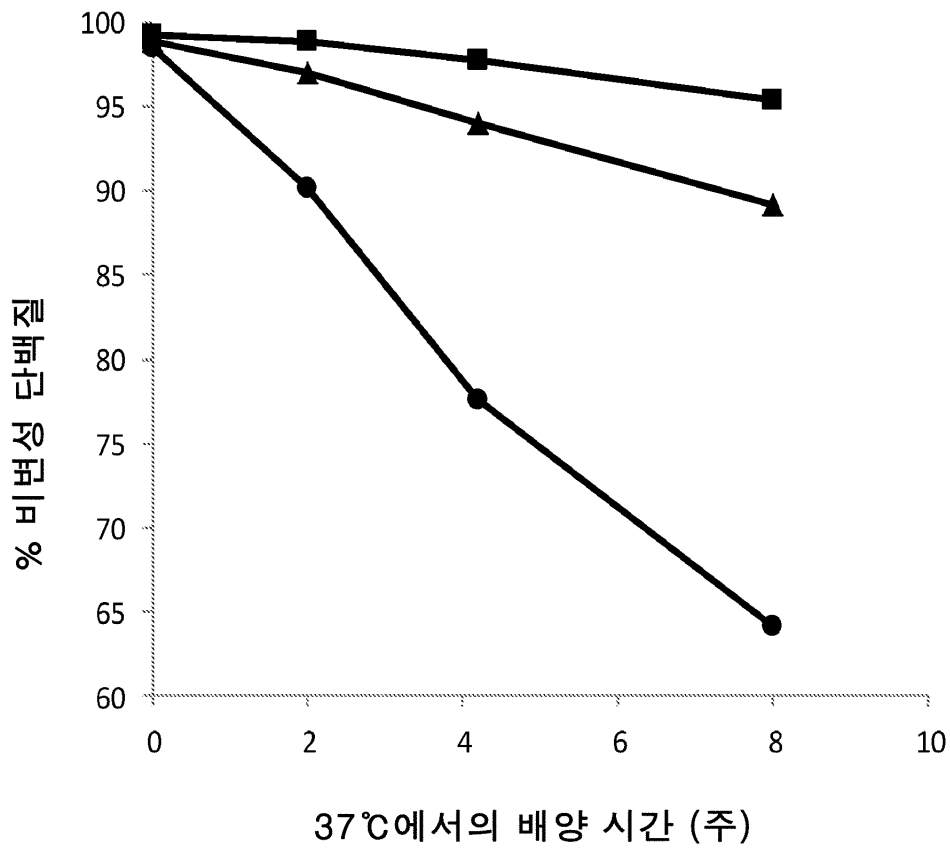
도면4



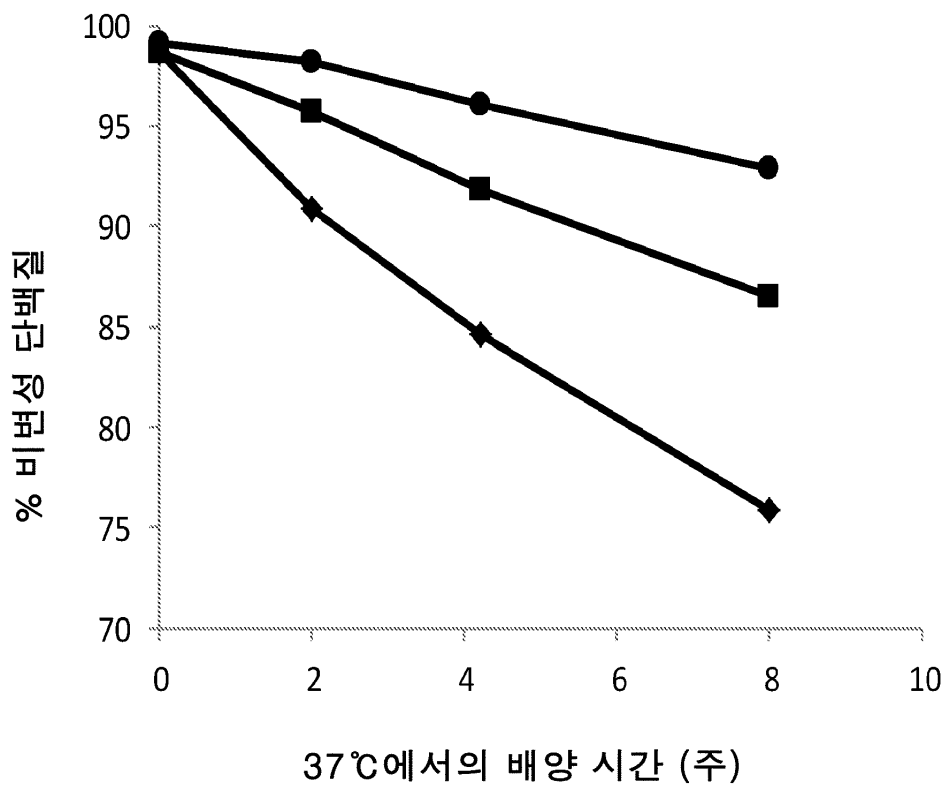
도면5



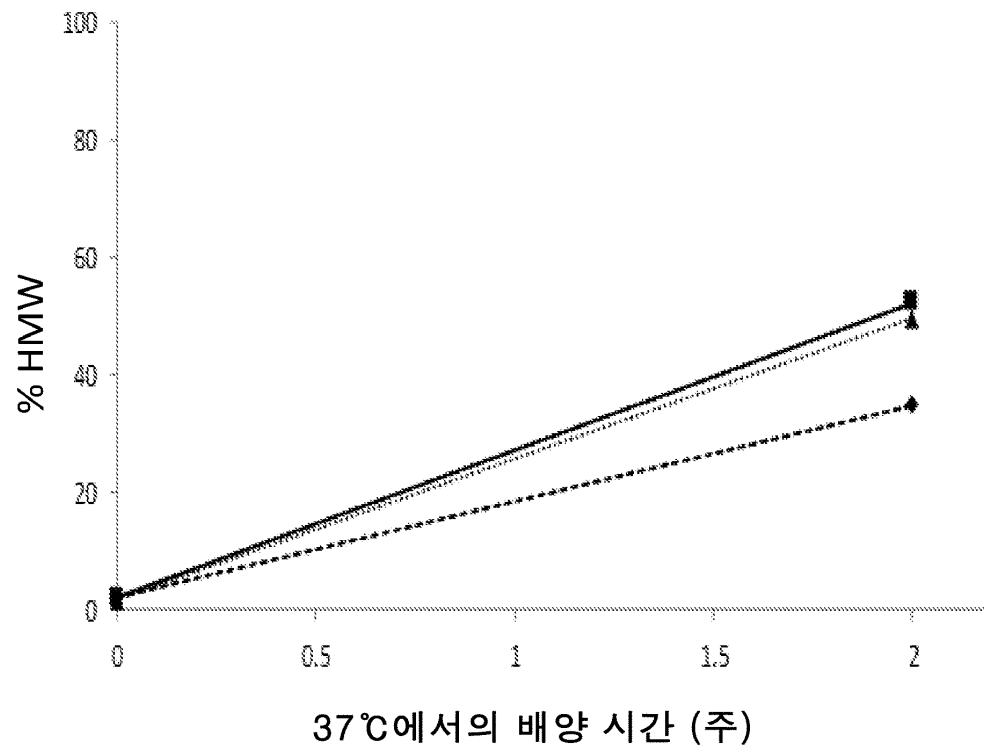
도면6a



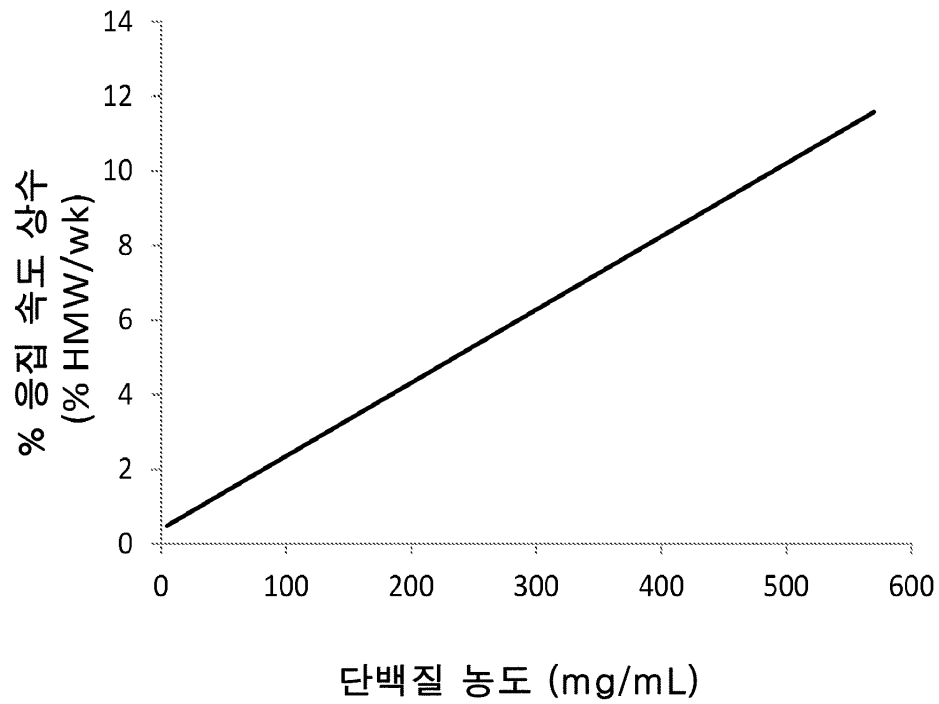
도면6b



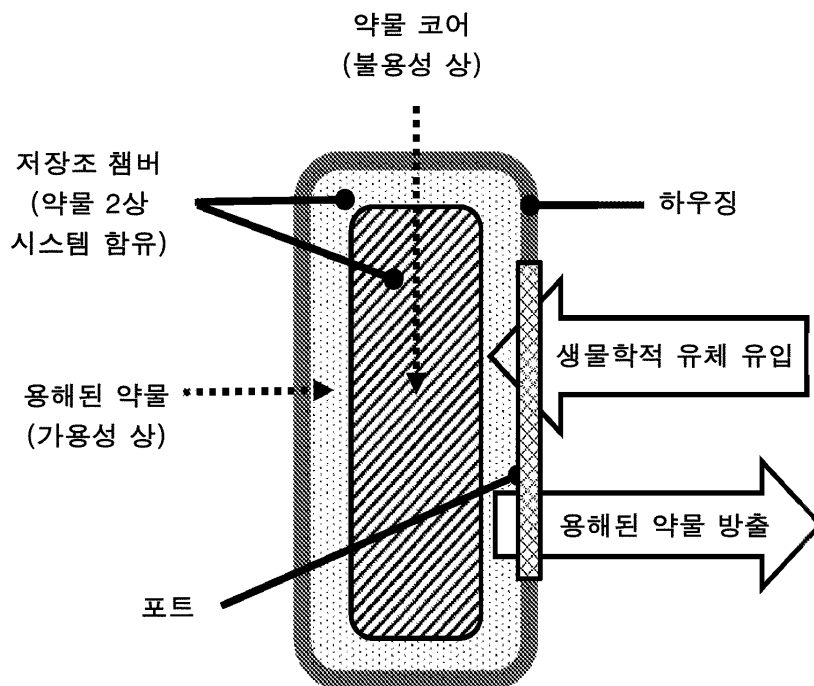
도면7



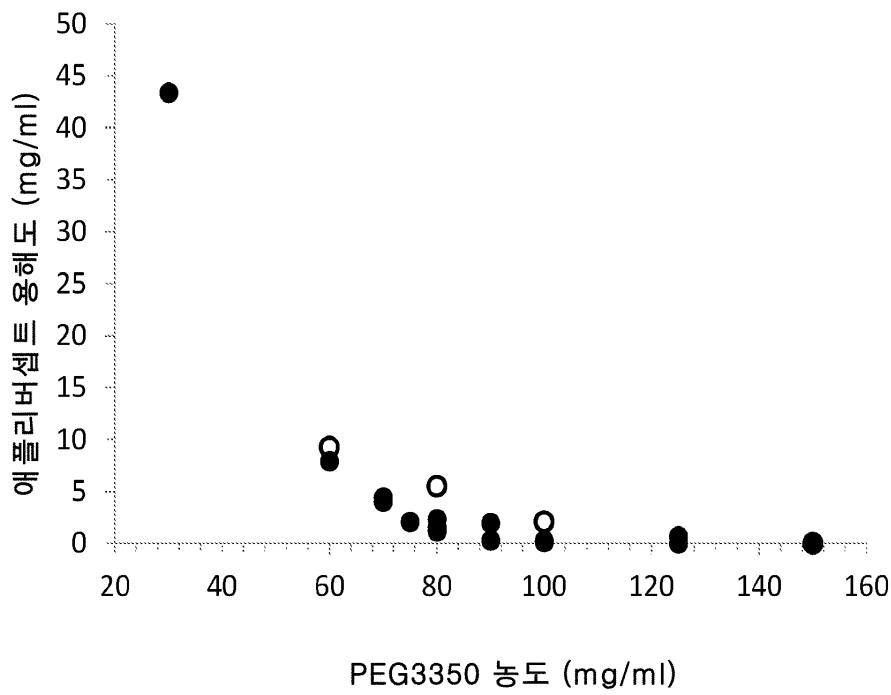
도면8



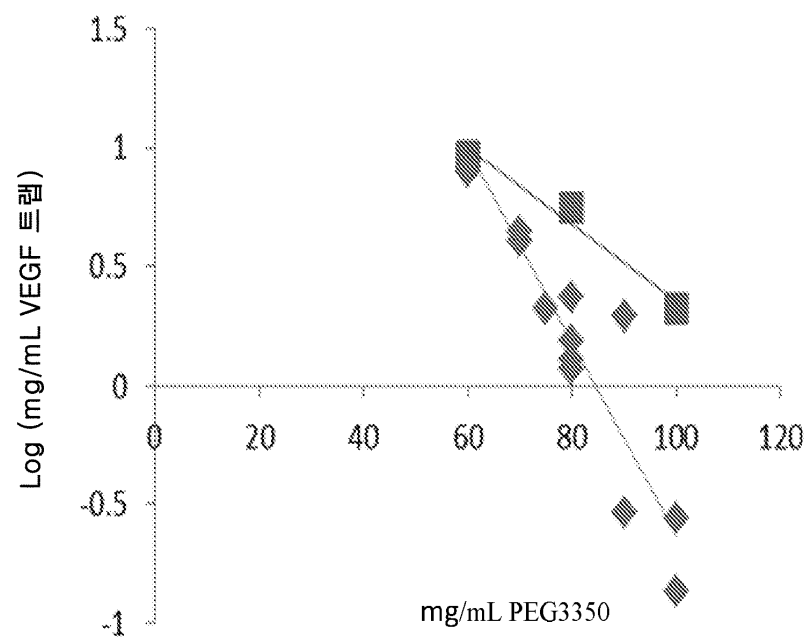
도면9



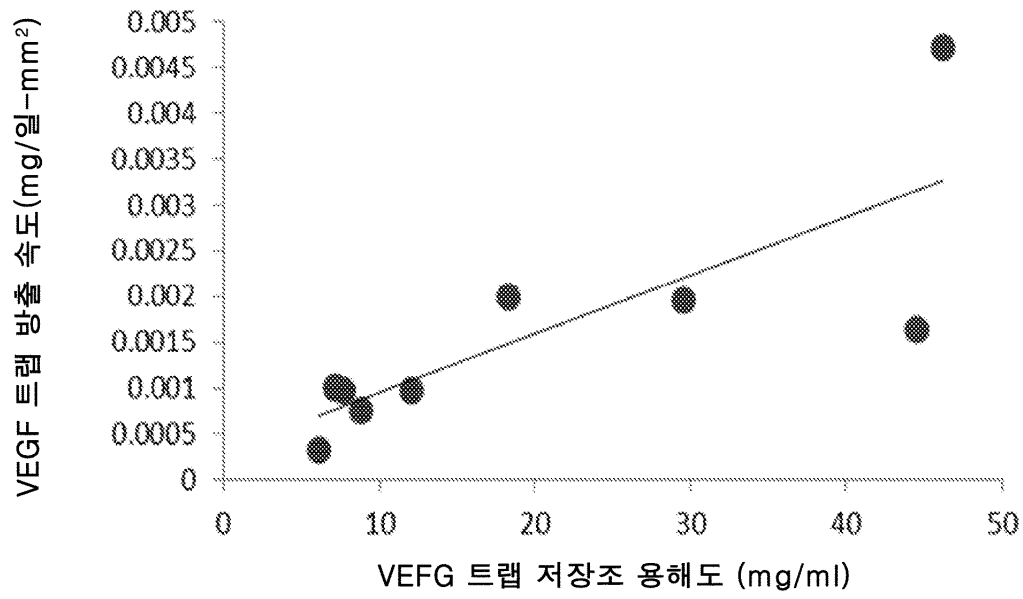
도면10



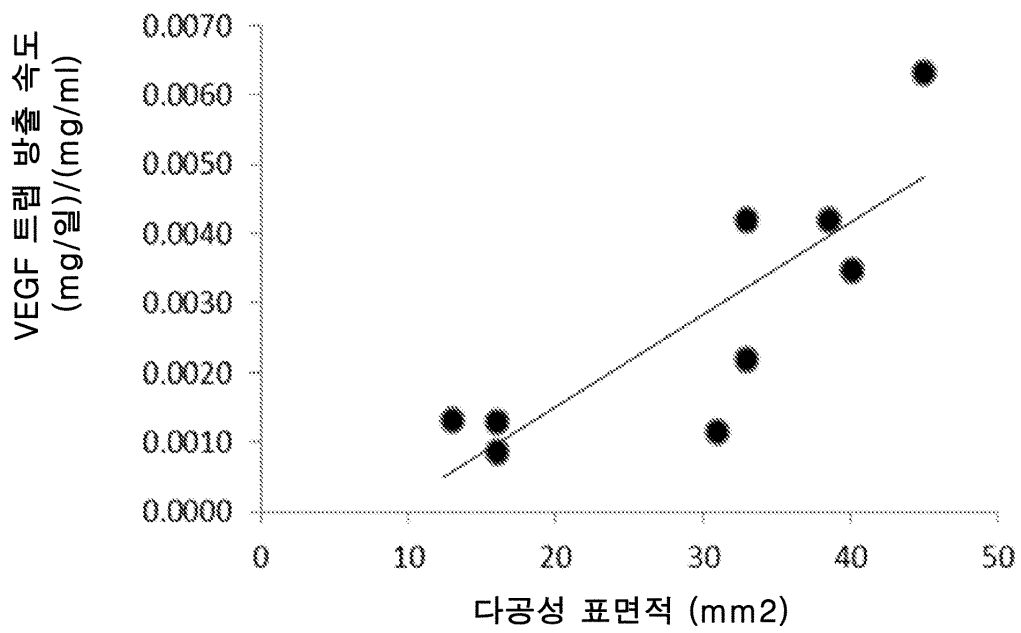
도면11



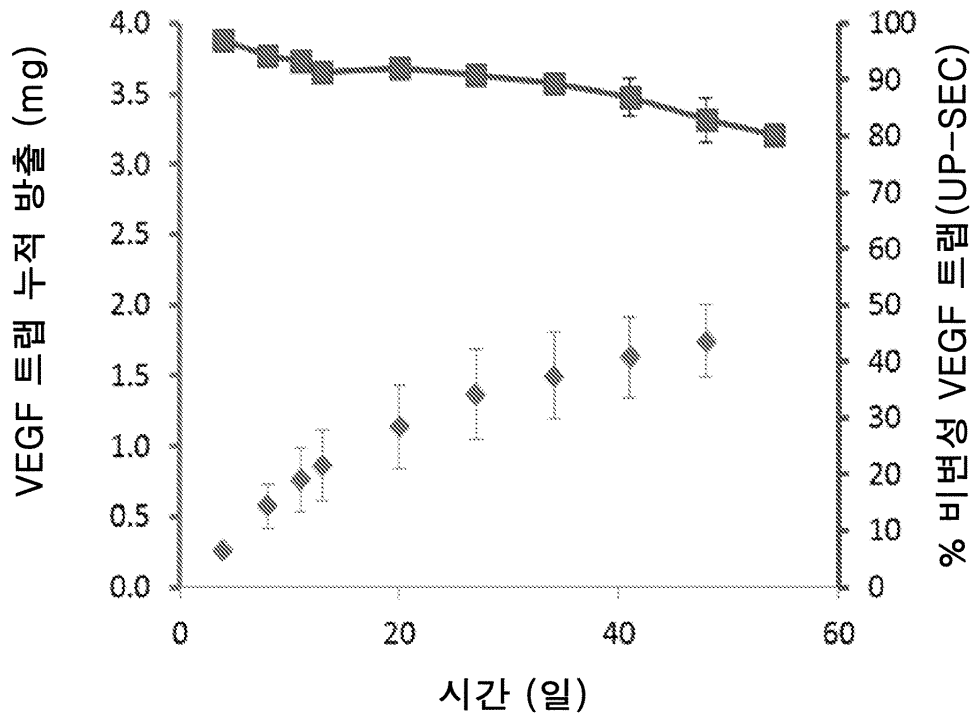
도면12



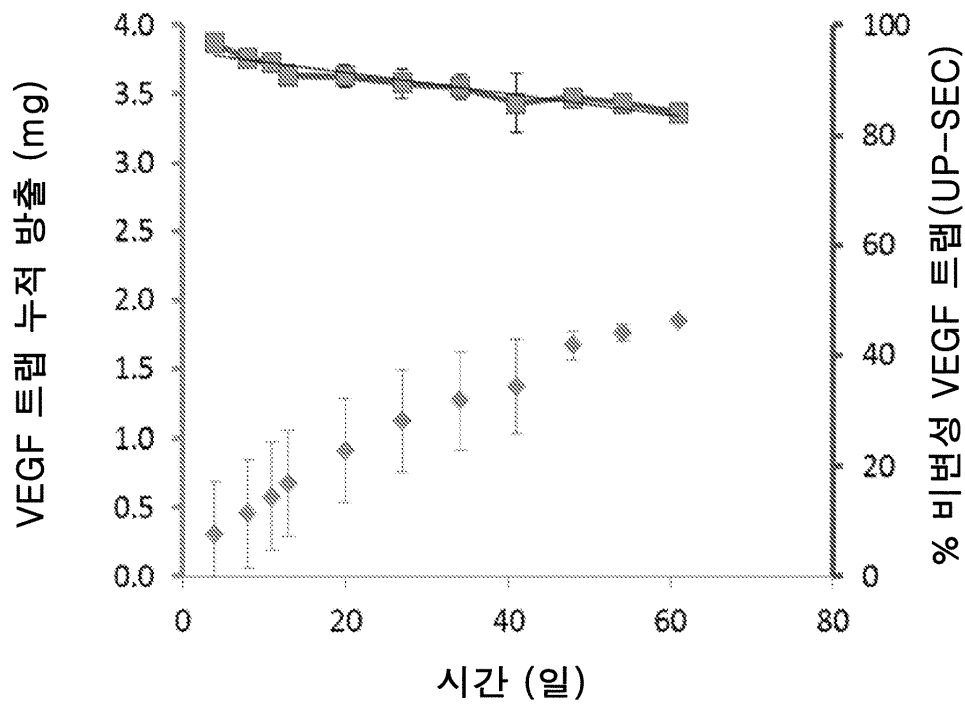
도면13



도면14a



도면14b



도면15

