



등록특허 10-2218223



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월22일  
(11) 등록번호 10-2218223  
(24) 등록일자 2021년02월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 9/50* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 47/59* (2017.01) *A61P 27/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 9/5031* (2013.01)  
*A61K 38/179* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7003704(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년11월18일  
 심사청구일자 2020년02월07일
- (85) 번역문제출일자 2020년02월07일
- (65) 공개번호 10-2020-0018712
- (43) 공개일자 2020년02월19일
- (62) 원출원 특허 10-2014-7014549  
 원출원일자(국제) 2012년11월18일  
 심사청구일자 2017년11월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/065735
- (87) 국제공개번호 WO 2013/075068  
 국제공개일자 2013년05월23일
- (30) 우선권주장  
 61/561,525 2011년11월18일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020030011858 A\*  
 KR1020090025373 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

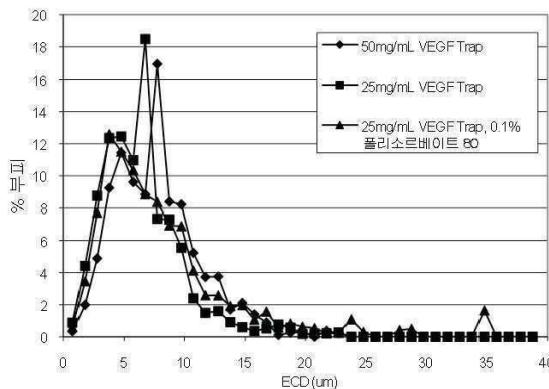
전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 폴리머 단백질 미립자

**(57) 요약**

치료적 단백질의 코어 및 생체 적합성 및 생분해성 폴리머의 코어텍스를 함유하는 미립자, 및 미립자를 만들고 사용하는 방법이 제공된다. 생리학적 용액에서 미립자로부터의 치료적 단백질의 지속적인 방출이 연장된 기간 동안 입증되었다.

**대 표 도**

(52) CPC특허분류

*A61K 39/395* (2013.01)  
*A61K 47/593* (2017.08)  
*A61K 9/5047* (2013.01)  
*A61P 27/02* (2018.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

폴리오르토에스테르 코팅된 단백질 입자를 포함하는 서방형 제형으로서, 상기 단백질은 Fc 융합-단백질이고, 상기 폴리오르토에스테르 코팅된 단백질 입자는 2.5 내지 49.4  $\mu\text{m}$ 의 지름을 갖고, 상기 제형은 50 내지 180 mg/mL의 단백질 및 250mg/mL의 폴리오르토에스테르를 포함하고, 안구의 유리체에서 적어도 60일 동안 일정한 수준의 단백질을 방출하는 서방형 제형.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1 항에 있어서, 상기 단백질은 VEGF-트랩형 단백질인 것을 특징으로 하는 서방형 제형.

#### 청구항 4

제3 항에 있어서, 상기 VEGF-트랩형 단백질은 SEQ ID NO: 1인 것을 특징으로 하는 서방형 제형.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제1 항에 있어서, 상기 입자의 평균 지름은 15  $\mu\text{m}$ 인 것을 특징으로 하는 서방형 제형.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

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

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 지속 방출형(extended release) 단백질 치료제의 제조, 조성물, 및 사용에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 수성-기반 또는 생리학적 환경에서 시간이 흐름에 따른 단백질의 지속적이고 균일한 방출을 위한 복수의 폴리머 코팅된 단백질 미소구체에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 예를 들어, 망막 또는 종양과 같은 생물학적 표적을 향해 투여된, 또는 비경구로 투여된 치료 단백질의 지속적인 방출은 암, 심혈관 질환, 혈관 질환, 정형외과적 장애, 치과 질환, 상처, 자가 면역 질환, 위장관 장애, 및 안구 질환을 포함하는, 많은 다른 질환의 치료에 바람직하다. 약물의 제어되고 지속적인 전달을 위한 생체 적합성 및 생분해성 폴리머는 수십 년 동안 사용되어 왔다. 시간이 흐름에 따라 폴리머가 분해되기 때문에, 치료적 약물은 서서히 방출된다.

[0003] 안구 내 치료제의 경우에, 가능한 적은 안구 내 주사로 시간이 흐름에 따라 단백질 치료제를 효과적으로 전달하기 위한 지속 방출형 제형에 대하여 중요한 미충족 의료 필요가 있다. 암, 염증성 질환들, 및 다른 질환들과 같은 다른 질환의 경우에서, 단백질 치료제를 함유하는, 개선된 주입 가능 지속 방출형 제형이 필요하다.

[0004] [선행기술문헌]

[0005] - 선행기술문헌 1: US 201104151

[0006] - 선행기술문헌 2: US 2008305115

[0007] - 선행기술문헌 3: WO 03092665

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 출원인들은 연장된 기간 동안 치료적 단백질의 치료적 유효량을 균일하게 방출할 수 있는, 생분해성 폴리머 및 치료적 단백질을 함유하는 미립자를 제조하고 사용하는 발견하였고 본원에서 개시하고 주장한다.

#### 과제의 해결 수단

[0009] 한 양태에서, 본 발명은 폴리머로 코팅된 단백질을 포함하는 미립자를 제공한다. 한 구체예에서, 미립자는 지름이 약 2 미크론 내지 약 70 미크론이다. 한 구체예에서, 미립자는 지름이 약 15 미크론이다.

[0010] 한 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질이다. 한 구체예에서, 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 수용체 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 트랩형(trap-type) 단백질이며, 이것은 동계

(cognate)-수용체 단편 및 Fc 도메인을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 단백질은 VEGF-Trap 단백질이다. 한 구체예에서, VEGF-Trap 단백질은 SEQ ID NO:1에서 설명된 아미노산 서열을 포함한다.

[0011]

한 구체예에서, 폴리머는 생분해성 폴리머이다. 일부 구체예들에서, 폴리머는 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리- $\beta$ -R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로 일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검(guar gum), 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트란 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 PLGA 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리오르토에스테르 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다.

[0012]

한 구체예에서, 미립자는 10 미크론 미만의 미소화된 단백질 코어 및 폴리머 코어텍스(cortex)를 포함한다. 한 구체예에서, 미소화된 단백질은 폴리머로 적어도 50% 코팅되며, 이것은 미소화된 단백질 코어 표면의 50% 이하가 노출된다는 것을 의미한다. 한 구체예에서, 미소화된 단백질 코어 표면의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100%가 폴리머로 코팅된다.

[0013]

한 구체예에서, 크기가 10 미크론보다 더 큰 미립자는 (a) 단백질이 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상인, 10 미크론보다 작은 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머가 생체 적합성 폴리머, 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리- $\beta$ -R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트란 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 하나 이상인 폴리머 코팅을 포함한다.

[0014]

한 구체예에서, 평균 지름이 약 15 미크론 내지 약 30 미크론인 미립자는 (a) 단백질이 VEGF-Trap 단백질이며, 약 10 내지 약 12 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머가 PCL, PLGA, 에틸 셀룰로스 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상인 폴리머 코팅을 포함한다.

[0015]

한 양태에서, 본 발명은 복수의 미립자를 제공하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어, 및 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0016]

한 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 또는 항체 단편,

이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상이다. 한 구체예에서, 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 트랩형 단백질이며, 이것은 동계-수용체 단편 및 Fc 도메인을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 단백질은 VEGF-Trap 단백질이다. 특정 구체예에서, VEGF-Trap 단백질은 SEQ ID NO: 1에서 설명된 아미노산 서열을 포함한다.

[0017]

한 구체예에서, 폴리머는 생체 적합성 폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 생침식성 폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 생분해성 폴리머이다. 일부 구체예들에서, 폴리머는 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 페틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트란 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리미로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리-ε-카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리미이다. 한 구체예에서, 폴리머는 PLGA 또는 이들의 유도체 또는 코폴리미이다. 한 구체예에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 또는 이들의 유도체 또는 코폴리미이다. 한 구체예에서, 폴리머는 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르이다.

[0018]

한 구체예에서, 복수의 미립자는, 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있으며, (a) 단백질이 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상인, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머가 생체 적합성 폴리머, 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 페틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트란 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리미, 및 이들의 조합 및 코폴리미 중 어느 하나 이상인 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0019]

한 구체예에서, 복수의 미립자는, 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있으며, (a) 단백질이 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상인, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머가 생체 적합성 폴리머, 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 페틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트란 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리미, 및 이들의 조합 및 코폴리미 중 어느 하나 이상인 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0020]

한 구체예에서, 복수의 미립자는, 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고, 약 15 미크론 내지 약 30 미크론의 중앙 크기를 가지며, (a) 약 10 미크론 내지 약 12 미크론의 중앙 크기를 갖고, 단백질은 VEGF-

Trap 단백질인, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) PLA, PCL, PLGA, 에틸 셀룰로스 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상인 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0021] 한 양태에서, 본 발명은 단백질 코어 및 폴리머 코어텍스를 포함하는 미립자의 제조 방법을 제공한다. 한 구체 예에서, 제조된 미립자는 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 지름, 또는 약 15 미크론 내지 약 30 미크론의 중앙 지름을 갖는다. 한 구체예에서, 미립자의 제조 방법은 (1) 단백질 입자를 획득하는 단계; (2) 폴리머 및 용매를 포함하는 용액에서 단백질 입자를 혼탁하는 단계; 및 (3) 용매를 제거하는 단계를 포함하며, 폴리머 코어텍스로 코팅된 단백질 코어를 포함하는 미립자가 형성된다.

[0022] 한 구체예에서, 단계 (1)의 단백질 입자는 미소화된 단백질 입자이며, 이것은 단백질을 포함하는 용액을 분무 건조함으로써 얻어진다.

[0023] 단백질 용액은 이단-노즐 소니케이션(sonication), 일단-노즐 소니케이션, 또는 전기 분무(electrospray)를 통해 분무 건조된다. 일부 구체예들에서, 결과로 얻은 미소화된 단백질 입자는, 제조된 미립자의 코어를 형성하며, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 지름을 갖고, 약 10 미크론 내지 약 12 미크론의 중앙 지름을 갖는다.

[0024] 일부 구체예들에서, 코어를 형성하는 단백질은 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 (예를 들어, IgG) 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상이다. 특정 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO:1에서 설명된 아미노산 서열을 포함하는 VEGF-Trap이다.

[0025] 한 구체예에서, 용매는 단계 (2)의 단백질-폴리머-용매 혼합물의 분산을 일으키고 용매를 분산에 의해 생성된 방울로부터 증발시킴으로써 단계 (3)에서 제거된다. 한 구체예에서, 분산은 분무 건조에 의해 일어나며, 이것은 이단-노즐 소니케이션, 일단-노즐 소니케이션, 또는 전기 분무에 의해 수행될 수도 있다. 한 구체예에서, 용매는 열 또는 공기를 적용함으로써, 또는 화학 추출법에 의해 방울로부터 제거된다.

[0026] 한 구체예에서, 폴리머는 생분해성, 생침식성, 및/또는 생체 적합성이다. 일부 구체예들에서, 폴리머는 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- $\beta$ -R-히드록시알카노에이트 (PHA), 폴리- $\beta$ -R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 페틴 및 구아검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트란 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미드 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 것도 된다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 PLGA 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리오르토에스테르, 또는 이들의 유도체이며, 이것은 산 불안정 요소를 함유한다. 또 다른 구체예에서, 폴리머는 PLA이다.

[0027] 한 양태에서, 본 발명은 (1) 단백질을 함유하는 용액을 분무 건조함으로써, 지름이 약 2 미크론 내지 약 30 미크론이고, 중앙 지름이 약 10 미크론 내지 12 미크론인 미소화된 단백질 입자를 형성하는 단계로서, 단백질은 항원-결합 단백질인 단계. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상 (예를 들어, SEQ ID NO: 1의 서열을 갖는 것)이다; (2) 폴리머 및 용매를 포함하는 용액에서 미소화된 단백질 입자를 혼탁하는 단계로서, 폴리머는 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 생체 적합성 폴리머, 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토

코페릴 숙시네이트 (PLGA-TG PS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리- $\beta$ -R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 페틴 및 구아 캡, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 하나 이상인 단계; 및 (3) 미소화된 단백질 입자-폴리머-용매 혼탁액을 분무 건조함으로써 용매를 제거하고 열 또는 공기의 적용에 의해, 또는 용매의 추출에 의해 용매를 떨어뜨리는 단계로서, 지름이 약 2 미크론 내지 약 70 미크론이고, 중앙 지름이 약 15 미크론 내지 약 30 미크론이며, 단백질 코어 및 폴리머 코어텍스를 포함하는 미립자가 형성되는 단계를 포함하는, 미립자의 제조 방법을 제공한다.

[0028]

일부 구체예들에서, 단계 (1) 또는 단계 (3)의 분무 건조는 이단-노즐 소니케이션, 일단-노즐 소니케이션, 또는 전기 분무를 통해 수행된다.

[0029]

한 구체예에서, 미립자의 제조 방법은 (1) VEGF Trap 단백질을 함유하는 용액을 분무 건조함으로써 지름이 약 10 미크론 내지 12 미크론인 미소화된 VEGF-Trap 입자를 형성하는 단계; (2) 잠재성 산 및 호환성 용매, 또는 에틸셀룰로스 및 호환성 용매를 포함하는 폴리오르토에스테르를 포함하는 용액에서 미소화된 VEGF Trap 입자를 혼탁하는 단계; 및 (3) (a) 미소화된 VEGF Trap 입자-폴리오르토에스테르-잠재성 산-용매 혼탁액 또는 미소화된 VEGF Trap 입자-에틸 셀룰로스-용매 혼탁액을 분무 건조함으로써 및 (b) 열 또는 공기의 적용, 또는 용매의 추출에 의해 용매를 떨어뜨리면서 용매를 제거하는 단계를 포함하며, 지름이 약 15 미크론 내지 약 30 미크론이고, 폴리오르토에스테르의 VEGF-Trap 코어 및 폴리머 코어텍스, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체를 포함하는 미립자가 형성된다.

[0030]

한 양태에서, 본 발명은 시간이 흐름에 따른 치료적 단백질의 일정한 수준의 방출 또는 전달을 위한 치료적 단백질의 지속 방출형 제형을 제공한다. 지속 방출형 제형은 복수의 미립자를 포함하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있으며, 이것들 각각은 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어, 및 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0031]

한 구체예에서, 치료적 단백질은 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 (예를 들어, IgG) 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상이다 (예를 들어, 이것들 중 하나는 SEQ ID NO: 1의 1차 구조를 갖는다). 한 구체예에서, 치료적 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 IgG이다. 또 다른 구체예에서, 치료적 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 치료적 단백질은 트랩형 단백질이며, 이것은 동계-수용체 단편 및 Fc 도메인을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 치료적 단백질은 VEGF-Trap 단백질이다. 또 다른 구체예에서, VEGF-Trap은 SEQ ID NO: 1에서 설명된 아미노산 서열을 포함한다.

[0032]

한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 생체 적합성 폴리머를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 생침식성 폴리머를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 생분해성 폴리머를 포함한다. 일부 구체예들에서, 폴리머 코어텍스는 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리- $\beta$ -R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린.

린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머로 구성된 군으로부터 선택된 폴리머를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 PLGA를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 에틸 셀룰로스를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 PLA, PLGA, 에틸 셀룰로스, 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상을 포함한다.

[0033] 한 구체예에서, 복수의 미립자는 폴리머 코어텍스의 두께의 범위를 갖는 미립자의 컬렉션(collection)을 포함하며, 이러한 미립자의 컬렉션의 개개의 미립자는 다른 속도로 분해되며, 이것은 치료적 단백질의 균일한 속도의 방출을 허용한다.

[0034] 한 구체예에서, 복수의 미립자는 코팅되지 않은 미소화된 단백질 입자 및 폴리머 코어텍스의 두께의 범위를 갖는 미립자를 포함하며, 이것은 코어텍스 두께를 기준으로 하는 반복 간격으로 치료적 단백질의 방출을 허용한다.

[0035] 한 구체예에서, 복수의 미립자는 분해 및 이후의 방출의 시기 또는 기간을 제어하기 위해 다양한 수준의 소수성의 폴리머 피질을 갖는 미립자의 혼합물을 포함한다. 한 구체예에서, 미립자들 각각은 폴리머 내충 및 폴리머 외충을 포함하며, 폴리머 외충은 폴리머 내충의 수화를 제한하여 치료적 단백질의 방출을 제어한다.

[0036] 한 구체예에서, 치료적 단백질은, 미립자들이 수성 환경에 있을 때, 적어도 60일의 기간 동안 약 0.01 mg/주 내지 약 0.30 mg/주의 속도로 복수의 미립자들로부터 방출된다. 한 구체예에서, 수성 환경은 시험관 내(in vitro) 버퍼이다. 한 구체예에서, 수성 환경은 생체 내부이다. 한 구체예에서, 수성 환경은 생체 외부이다. 한 구체예에서, 수성 환경은 유리액(vitreous humor)이다.

[0037] 한 구체예에서, 지속 방출형 제형은 복수의 미립자를 포함하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고 (a) 단백질이 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상일 수 있는, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 치료적 단백질의 코어; 및 (b) 폴리머는 생체 적합성 폴리머, 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시벌레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- $\beta$ -R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리- $\beta$ -R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로텍스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 하나 이상이며, 미립자는 적어도 60일 동안 약 0.01 mg/주 내지 약 0.30 mg/주의 속도로 일정한 수준의 치료적 단백질을 방출하거나 전달하는, 두께의 범위의 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0038] 한 구체예에서, 지속 방출형 제형은 복수의 미립자를 포함하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고, 약 15 미크론 내지 약 30 미크론의 중앙 크기를 가지며, (a) 약 10 미크론 내지 약 12 미크론의 중앙 크기를 가지며, 단백질이 VEGF-Trap 단백질인, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머는 PLGA, 에틸 셀룰로스, 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상이며, 이러한 수성 환경에서 미립자는 적어도 60일 동안 약 0.06 ± 0.02 mg/주의 속도로 VEGF Trap의 일정한 수준을 방출하거나 전달하는, 두께 범위의 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0039]

한 양태에서, 본 발명은 단백질의 방출을 조절하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 방법은 상기 양태에서 설명된 바와 같이 복수의 미립자를 만드는 단계에 이어서, 미립자를 용매에 배치하는 단계를 포함한다. 일부 구체 예들에서 용매는 수성이다. 용매는 인산염 완충된 용액과 같이, 시험관 내에 있을 수 있다. 용매는 예를 들어, 유리액과 같이, 생체 내에 있을 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0040]

도 1은 50 mg/mL의 VEGF Trap 단백질, 25 mg/mL의 VEGF Trap 단백질, 및 25 mg/mL의 VEGF Trap 단백질 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80으로 제조된 단백질 입자의 집단에서, 주어진 지름(ECD ( $\mu\text{m}$ ))의 폴리머 코어텍스가 없는 단백질 입자의 상대적인 양 (부피%)을 기술한다.

도 2는 50 mg/mL의 VEGF Trap 단백질 플러스 50 mg/mL POE, 250 mg/mL POE, 및 50 mg/mL EC로 제조된 미립자의 집단에서, 주어진 지름 (ECD ( $\mu\text{m}$ ))의 미립자의 상대적인 양 (MFI에 의해 결정된 부피%)을 기술한다.

도 3은 대략 60일 동안 50 mg/mL POE, 250 mg/mL POE, 또는 50 mg/mL EC로 제조된 미립자로부터 방출된, 밀리 그램 단위의 VEGF Trap 단백질의 양을 기술한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041]

본 발명의 미크로 입자 및 단백질 코어 입자는 형태가 거의 구형이다. 일부 미립자 및 단백질 코어는 구형에 근접하는 한편, 다른 것들은 형태가 더 불규칙할 것이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "지름"은 다음 중 각각 및 어느 하나를 의미한다: (a) 미립자 또는 단백질 코어를 제한하는 구체의 지름, (b) 미립자 또는 단백질 코어의 범위 내에서 적합한 가장 큰 구체의 지름, (c) (a)의 제한된 구체 및 (b)의 제한된 구체 사이의, 둘 사이의 평균값을 포함하는, 어떤 측정값, (d) 미립자 또는 단백질 코어의 장축(the longest axis)의 길이, (e) 미립자 또는 단백질 코어의 단축(the shortest axis)의 길이, (f) 장축 (d)의 길이 및 단축 (e)의 길이 사이의, 둘 사이의 평균값을 포함하는, 어떤 측정값, 및/또는 (g) 미세 유동 영상 (micro-flow imaging: MFI), 나노입자 추적 분석 (nanoparticle tracking analysis: NTA), 또는 동적 광산란 (dynamic light scattering: DLS)과 같은 빛 엄폐 방법 (light obscuration method)에 의해 결정된, 상당 원형 지름 (equivalent circular diameter: "ECD"). 일반적으로 Sharma et al., micro-flow imaging: flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations, AAPS J. 2010 Sep; 12(3): 455-64를 참고하면 된다. 지름은 일반적으로 마이크로미터 ( $\mu\text{m}$  또는 미크론)으로 표현된다. 지름은 광학적 측정에 의해 결정될 수 있다.

[0042]

"미소화된 단백질 입자" 또는 "단백질 입자"는 적은, 매우 적은, 또는 0에 가까운 양의 물(예를 들어, <3 중량% 물)이 있는 단백질의 다수의 분자를 함유하는 입자를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 미소화된 단백질 입자는 형태가 일반적으로 구형이고 2 미크론 내지 약 35 미크론의 범위의 ECD를 갖는다. 미소화된 단백질 입자는 미소화된 단백질 입자는 어떤 특정한 단백질 실체물에 제한되지 않고, 치료적 단백질의 제조 및 전달에 적합하다. 일반적인 치료적 단백질은 그 중에서도(*inter alia*), 예를 들어, 가용성 수용체 단편과 같은 항원-결합 단백질, 항체 (IgGs 등) 및 항체의 유도체 또는 단편, Fc 융합 단백질을 포함하는 다른 Fc 함유 단백질, 및 예를 들어, VEGF-Trap과 같은 트랩형 단백질을 포함하는 수용체-Fc 융합 단백질을 포함한다 (Huang, C, Curr. Opin. Biotechnol. 20: 692-99 (2009)).

[0043]

본 발명의 미소화된 단백질 입자는 미크론 크기의 단백질 입자를 만드는 업계에 알려진 어떤 기술에 의해서도 만들어질 수 있다. 예를 들어, 단백질 입자는 그 중에서도 분무 건조(하기와 같음), 동결 건조, 제트 분쇄(jet milling), 행잉 드롭 결정화(hanging drop crystallization) (Ruth et al., Acta Crystallographica D56: 524-28 (2000)), 점진적 침전 (US 7,998,477 (2011)), 단백질-PEG (폴리에틸렌 글리콜) 수성 혼합물의 동결 건조 (Morita et al., Pharma. Res. 17: 1367-73 (2000)), 임계 유체 침전(supercritical fluid precipitation) (US 6,063,910 (2000)), 또는 고압 이산화탄소 유발된 입자 형성 (Bustami et al., Pharma. Res. 17: 1360-66 (2000))에 의해 만들어질 수도 있다.

[0044]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단백질"은 웨პ티드 결합에 의해 서로 결합된 둘 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 나타낸다. 웨პ티드, 폴리웨პ티드 및 단백질은 또한 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복시화, 수산화 및 ADP-리보실화를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 변형을 포함한다. 단백질-기반 약물을 포함하는 폴리웨პ티드는 과학적으로 또는 상업적으로 흥미로운 것들일 수 있다. 폴리웨პ티드는, 다른 것들 중에서도, 항체 및 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. 폴리웨პ티드는 세포 배양 방법을 사용하여 제조함 동물 세포주에 의해 생산된다. 폴리웨პ티드는, 다른 것들 중에서도, 항체 및 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. 폴

리펩티드는 세포 배양법을 사용하여 재조합 동물 세포주에 의해 생산된다.

[0045]

"항체"는 네 개의 폴리펩티드 사슬, 이황화 결합에 의해 서로 연결된 두 개의 중쇄(H) 및 두 개의 경쇄(L)로 구성된 면역글로불린 분자를 나타내기 위한 것이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region: HCVR 또는 VH) 및 중쇄 불변 영역(heavy chain constant region)을 갖는다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3를 함유한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(light chain variable region) 및 경쇄 불변 영역(light chain constant region)을 갖는다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 (CL)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (framework region: FR)으로 불리는, 더 보존적인 영역과 함께 배치된, 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)으로 불리는, 초가변성의 영역으로 더 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 구성되며, 아미노-말단에서 카르복시-말단 방향으로 다음 순서대로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 용어 "항체"는 어떤 이소타입 또는 하위등급의 글리코실화된 및 글리코실화되지 않은 면역글로불린 둘 다에 대한 지시대상을 포함한다. 용어 "항체"는 항체를 발현하기 위해 트랜스펙션된 숙주 세포로부터 분리된 항체와 같이, 재조합 수단에 의해 제조된, 발현된, 생성된 또는 분리된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. IgG는 항체의 부분집합을 포함한다.

[0046]

"Fc 융합 단백질"은 둘 이상의 단백질 중 일부 또는 모두를 포함하며, 이것들 중 하나는 면역글로불린 분자의 Fc 부분이고, 이것들은 그것들의 자연 상태에서 융합되지 않는다. 항체-유래 폴리펩티드의 다양한 부분(Fc 도메인 등)에 융합된 특정 이종 기원의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 제조는 예를 들어, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; 및 Hollenbaugh et al., "Construction of immunoglobulin fusion proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, 페이지 10.19.1- 10.19.11, 1992에 의해 설명되었다. "수용체 Fc 융합 단백질"은 Fc 모이어티에 커플링된 수용체의 하나 이상의 세포 외 도메인(들) 중 하나 이상을 포함하며, 이것은 일부 구체예들에서 힌지 영역(hinge region)에 이어서 면역글로불린의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에서, Fc-융합 단백질은 단일 또는 하나 이상의 리간드(들)에 결합하는, 둘 이상의 별개의 수용체 사슬을 함유한다. 예를 들어, Fc-융합 단백질은 예를 들어, IL-1 트랩(예를 들어, hIgG1의 Fc에 융합된 IL-1 R1 세포 외 영역에 융합된 IL-1 RacP 리간드 결합 영역을 함유하는, 릴로나셉트(Rilonacept); 미국 특허 제6,927,004호를 참고하면 되고, 이것은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다), 또는 VEGF Trap (예를 들어, hIgG1의 Fc에 융합된 VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합된 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 함유하는, 애플리버셉트(Aflibercept); 예를 들어, SEQ ID NO: 1; 미국 특허 제7,087,411호 및 제7,279, 159호를 참고하면 되고, 이것은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)과 같은 트랩이다.

[0047]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리머"는 공유 화학 결합에 의해 연결된 반복 모노머를 포함하는 거대 분자를 나타낸다. 본 발명의 실시에 사용된 폴리머는 생체 적합성 및 생분해성이다. 생체 적합성 및 생분해성 폴리머는 천연의 또는 합성의 것일 수 있다. 천연 폴리머는 폴리뉴클레오티드, 자연 발생 단백질, 재조합 단백질, 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리류신, 류신-글루타메이트 코-폴리머과 같은 폴리펩티드; 및 셀룰로스 알기네이트와 같은 다당류, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펩틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 및 히알루론산을 포함한다. 합성의 생체 적합성 또는 생분해성 폴리머는 폴리젖산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젖산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 에틸 셀룰로스, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로타산 및 폴리슈도로타산, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 분해의 잠재성 산통 제어 속도(tom control rate)를 포함하는 폴리오르토에스테르, 및 그 중에서도 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머를 포함한다.

[0048]

에틸 셀룰로스 (EC)는 잘 알려져 있고 제약 및 식품 과학에서 사용된, 쉽게 이용 가능한 생체 적합 물질이다. 그것은 글루코스 수산기 중 일부가 에틸 에테르로 대체되는 셀룰로스 유도체이다. Martinac et al., J. Microencapsulation, 22(5): 549-561 (2005) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 되고, 이것들은 미소구체의 제조

시 생체 적합성 폴리머로서 에틸 셀룰로스를 사용하는 방법을 설명한다. 또한 US 4,210,529 (1980) 및 에틸 셀룰로스의 상세한 설명 및 에틸 셀룰로스의 유도체를 만드는 방법에 대한 참고문헌을 참고하면 된다.

[0049] 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA)는 또한 조직 공학 및 약학적 전달 시스템에 사용되는, 미국 식품 의약청 (Food and Drug Administration: FDA) 승인된 잘 알려진 생체 적합성 및 생분해성 폴리머이다. PLGA는 글리콜산 및 젖산 모노머를 포함하는 폴리에스테르이다. PLGA의 합성 및 PLGA 나노입자의 제조의 설명을 위해, Astete and Sabliov, Biomater. Sci. Polym. Ed., 17(3): 247-89 (2006) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 된다.

[0050] 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 (PCL)은 약물 전달 장치로서 사람에서 사용을 위해 FDA에 의해 승인된 또 다른 생체 적합성 및 생분해성 폴리머이다. PCL은  $\epsilon$ -카프로락톤의 폴리에스테르이며, 이것은 신체에서 급속히 가수분해되어 비-독성 또는 낮은 독성 히드록시카르복시산을 형성한다. PCL의 제조의 설명을 위해, Labet and Thielemans, Chemical Society Reviews 38: 3484-3504 (2009) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 된다. 전달 시스템으로서 PCL-기반 미소구체 및 나노구체의 제조 및 사용의 설명을 위해, Sinha et al., Int. J. Pharm., 278(1): 1-23 (2004) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 된다.

[0051] 폴리오르토에스테르 (POE)는 약물 전달을 위해 설계된 생침식성 폴리머이다. 그것은 일반적으로 케텐 아세탈, 바람직하게는, 원형 디케텐 아세탈의 폴리머, 예를 들어, 3,9-디메틸렌-2,4,8,10-테트라옥사 스피로[5.5]-운데칸이며, 이것은 글리콜 응축을 통해 폴리머화되어 오르토에스테르 결합을 형성한다. 폴리오르토에스테르 합성 및 다양한 타입의 설명은 예를 들어, US 4,304,767에서 발견될 수 있다. 폴리오르토에스테르는 다양한 소수성 디올 및 폴리올을 교환해 넣거나 교환해냄으로써, 예를 들어, 헥산트리올을 데칸트리올로 대체함으로써; 뿐만 아니라 잠재성 산, 예를 들어, 옥타디오산 등을 백분에 추가하여 pH 민감도를 증가시킴으로써 약물 방출 프로파일 및 분해 속도를 제어하기 위해 변형될 수 있다. 폴리오르토에스테르로의 다른 변형은 기능성을 증가시키기 위한 아민의 통합을 포함한다. 폴리오르토에스테르로의 형성, 설명, 및 사용은 US 5,968,543; US 4,764,364; Heller and Barr, Biomacromolecules, 5(5): 1625-32 (2004); 및 Heller, Adv. Drug. Deliv. Rev., 57: 2053-62 (2005)에서 설명된다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같이, 구절 "분무-건조"는 분무-건조기를 사용하여 슬러리 또는 혼탁액으로부터 미크론 크기의 입자를 포함하는 건성 분말을 생산하는 방법을 의미한다. 분무 건조는 혼탁액 또는 슬러리를 제어된 방울 크기 분무로 분산시키기 위해 분무기 또는 분무 노즐을 이용한다. 10 내지 500  $\mu\text{m}$ 의 방울 크기는 분무 건조에 의해 발생될 수 있다. 용매(물 또는 유기 용매)가 건조됨에 따라, 단백질 물질은 미크론 크기의 입자로 건조되며, 분말-유사 물질을 형성하거나; 또는 단백질-폴리머 혼탁액의 경우에는, 건조 중에, 폴리머는 단백질 로드 (load) 주위의 쉘(shell)을 경화시킨다.

[0053] 본 발명의 미립자는 폴리머 코어텍스 또는 코팅으로 둘러싸인 단백질 코어를 포함한다. 간략히 말하면, 미소화된 단백질 입자가 형성되며, 이것은 폴리머 용액(용매에 용해된 폴리머)에서 분산되어 단백질-폴리머 혼탁액을 형성한다. 단백질-폴리머 혼탁액은 미소화된 (원자화된) 방울로 분산되고, 용매는 미립자를 미립자를 형성하기 위해 떨어진다.

[0054] 한 구체예에서, 미소화된 단백질 입자는 단백질의 용액을 만든 다음 단백질을 포함하는 건성 분말을 형성하기 위해 상기 단백질 용액이 분산 및 열을 받음으로써 형성된다. 미소화된 단백질 입자를 형성하기 위한 한 방법은 분무 건조에 의한 것이다. 한 구체예에서, 단백질은 치료적 단백질의 약학적 제형을 만들기 위해 베피, 안정화제 및 다른 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하도록 조제되는 치료적 단백질이다. 예시적인 약학적 제형은 US 7,365,165, US 7,572,893, US 7,608,261, US 7,655,758, US 7,807,164, US 2010-0279933, US 2011-0171241, 및 PCT/US11/54856에서 설명된다.

[0055] 본 발명의 약학적 제형 내에 함유된 치료적 단백질의 양은 제형의 원하는 특이적 성질, 뿐만 아니라 제형이 사용되기 위한 상황 및 목적에 따라 다를 수도 있다. 특정 구체예들에서, 약학적 제형은 약 1 mg/mL 내지 약 500 mg/mL의 단백질; 약 5 mg/mL 내지 약 400 mg/mL의 단백질; 약 5 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 단백질; 약 25 mg/mL 내지 약 180 mg/mL의 단백질; 약 25 mg/mL 내지 약 150 mg/mL의 단백질; 또는 약 50 mg/mL 내지 약 180 mg/mL의 단백질을 함유할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 약 1 mg/mL; 약 2 mg/mL; 약 5 mg/mL; 약 10 mg/mL; 약 15 mg/mL; 약 20 mg/mL; 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 55 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 86 mg/mL; 약 87 mg/mL; 약 88 mg/mL; 약 89 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 131 mg/mL; 약 132 mg/mL; 약 133 mg/mL; 약 134 mg/mL; 약 135 mg/mL; 약 140 mg/mL; 약 145 mg/mL; 약 150 mg/mL; 약 155 mg/mL; 약 160 mg/mL; 약 165 mg/mL; 약 170 mg/mL; 약 175 mg/mL; 약 180 mg/mL; 약 185 mg/mL; 약 190 mg/mL; 약 195 mg/mL; 약 200 mg/mL; 약 205 mg/mL; 약 210 mg/mL; 약 215 mg/mL; 약 220 mg/mL; 약 225 mg/mL; 약 230 mg/mL; 약 235 mg/mL; 약 240 mg/mL; 약 245 mg/mL; 약 250 mg/mL; 약 255 mg/mL; 약 260 mg/mL; 약 265 mg/mL; 약 270 mg/mL; 약 275 mg/mL; 약 280 mg/mL; 약 285 mg/mL; 약 290 mg/mL; 약 295 mg/mL; 약 300 mg/mL; 약 305 mg/mL; 약 310 mg/mL; 약 315 mg/mL; 약 320 mg/mL; 약 325 mg/mL; 약 330 mg/mL; 약 335 mg/mL; 약 340 mg/mL; 약 345 mg/mL; 약 350 mg/mL; 약 355 mg/mL; 약 360 mg/mL; 약 365 mg/mL; 약 370 mg/mL; 약 375 mg/mL; 약 380 mg/mL; 약 385 mg/mL; 약 390 mg/mL; 약 395 mg/mL; 약 400 mg/mL; 약 405 mg/mL; 약 410 mg/mL; 약 415 mg/mL; 약 420 mg/mL; 약 425 mg/mL; 약 430 mg/mL; 약 435 mg/mL; 약 440 mg/mL; 약 445 mg/mL; 약 450 mg/mL; 약 455 mg/mL; 약 460 mg/mL; 약 465 mg/mL; 약 470 mg/mL; 약 475 mg/mL; 약 480 mg/mL; 약 485 mg/mL; 약 490 mg/mL; 약 495 mg/mL; 약 500 mg/mL; 약 505 mg/mL; 약 510 mg/mL; 약 515 mg/mL; 약 520 mg/mL; 약 525 mg/mL; 약 530 mg/mL; 약 535 mg/mL; 약 540 mg/mL; 약 545 mg/mL; 약 550 mg/mL; 약 555 mg/mL; 약 560 mg/mL; 약 565 mg/mL; 약 570 mg/mL; 약 575 mg/mL; 약 580 mg/mL; 약 585 mg/mL; 약 590 mg/mL; 약 595 mg/mL; 약 600 mg/mL; 약 605 mg/mL; 약 610 mg/mL; 약 615 mg/mL; 약 620 mg/mL; 약 625 mg/mL; 약 630 mg/mL; 약 635 mg/mL; 약 640 mg/mL; 약 645 mg/mL; 약 650 mg/mL; 약 655 mg/mL; 약 660 mg/mL; 약 665 mg/mL; 약 670 mg/mL; 약 675 mg/mL; 약 680 mg/mL; 약 685 mg/mL; 약 690 mg/mL; 약 695 mg/mL; 약 700 mg/mL; 약 705 mg/mL; 약 710 mg/mL; 약 715 mg/mL; 약 720 mg/mL; 약 725 mg/mL; 약 730 mg/mL; 약 735 mg/mL; 약 740 mg/mL; 약 745 mg/mL; 약 750 mg/mL; 약 755 mg/mL; 약 760 mg/mL; 약 765 mg/mL; 약 770 mg/mL; 약 775 mg/mL; 약 780 mg/mL; 약 785 mg/mL; 약 790 mg/mL; 약 795 mg/mL; 약 800 mg/mL; 약 805 mg/mL; 약 810 mg/mL; 약 815 mg/mL; 약 820 mg/mL; 약 825 mg/mL; 약 830 mg/mL; 약 835 mg/mL; 약 840 mg/mL; 약 845 mg/mL; 약 850 mg/mL; 약 855 mg/mL; 약 860 mg/mL; 약 865 mg/mL; 약 870 mg/mL; 약 875 mg/mL; 약 880 mg/mL; 약 885 mg/mL; 약 890 mg/mL; 약 895 mg/mL; 약 900 mg/mL; 약 905 mg/mL; 약 910 mg/mL; 약 915 mg/mL; 약 920 mg/mL; 약 925 mg/mL; 약 930 mg/mL; 약 935 mg/mL; 약 940 mg/mL; 약 945 mg/mL; 약 950 mg/mL; 약 955 mg/mL; 약 960 mg/mL; 약 965 mg/mL; 약 970 mg/mL; 약 975 mg/mL; 약 980 mg/mL; 약 985 mg/mL; 약 990 mg/mL; 약 995 mg/mL; 약 1000 mg/mL; 약 1005 mg/mL; 약 1010 mg/mL; 약 1015 mg/mL; 약 1020 mg/mL; 약 1025 mg/mL; 약 1030 mg/mL; 약 1035 mg/mL; 약 1040 mg/mL; 약 1045 mg/mL; 약 1050 mg/mL; 약 1055 mg/mL; 약 1060 mg/mL; 약 1065 mg/mL; 약 1070 mg/mL; 약 1075 mg/mL; 약 1080 mg/mL; 약 1085 mg/mL; 약 1090 mg/mL; 약 1095 mg/mL; 약 1100 mg/mL; 약 1105 mg/mL; 약 1110 mg/mL; 약 1115 mg/mL; 약 1120 mg/mL; 약 1125 mg/mL; 약 1130 mg/mL; 약 1135 mg/mL; 약 1140 mg/mL; 약 1145 mg/mL; 약 1150 mg/mL; 약 1155 mg/mL; 약 1160 mg/mL; 약 1165 mg/mL; 약 1170 mg/mL; 약 1175 mg/mL; 약 1180 mg/mL; 약 1185 mg/mL; 약 1190 mg/mL; 약 1195 mg/mL; 약 1200 mg/mL; 약 1205 mg/mL; 약 1210 mg/mL; 약 1215 mg/mL; 약 1220 mg/mL; 약 1225 mg/mL; 약 1230 mg/mL; 약 1235 mg/mL; 약 1240 mg/mL; 약 1245 mg/mL; 약 1250 mg/mL; 약 1255 mg/mL; 약 1260 mg/mL; 약 1265 mg/mL; 약 1270 mg/mL; 약 1275 mg/mL; 약 1280 mg/mL; 약 1285 mg/mL; 약 1290 mg/mL; 약 1295 mg/mL; 약 1300 mg/mL; 약 1305 mg/mL; 약 1310 mg/mL; 약 1315 mg/mL; 약 1320 mg/mL; 약 1325 mg/mL; 약 1330 mg/mL; 약 1335 mg/mL; 약 1340 mg/mL; 약 1345 mg/mL; 약 1350 mg/mL; 약 1355 mg/mL; 약 1360 mg/mL; 약 1365 mg/mL; 약 1370 mg/mL; 약 1375 mg/mL; 약 1380 mg/mL; 약 1385 mg/mL; 약 1390 mg/mL; 약 1395 mg/mL; 약 1400 mg/mL; 약 1405 mg/mL; 약 1410 mg/mL; 약 1415 mg/mL; 약 1420 mg/mL; 약 1425 mg/mL; 약 1430 mg/mL; 약 1435 mg/mL; 약 1440 mg/mL; 약 1445 mg/mL; 약 1450 mg/mL; 약 1455 mg/mL; 약 1460 mg/mL; 약 1465 mg/mL; 약 1470 mg/mL; 약 1475 mg/mL; 약 1480 mg/mL; 약 1485 mg/mL; 약 1490 mg/mL; 약 1495 mg/mL; 약 1500 mg/mL; 약 1505 mg/mL; 약 1510 mg/mL; 약 1515 mg/mL; 약 1520 mg/mL; 약 1525 mg/mL; 약 1530 mg/mL; 약 1535 mg/mL; 약 1540 mg/mL; 약 1545 mg/mL; 약 1550 mg/mL; 약 1555 mg/mL; 약 1560 mg/mL; 약 1565 mg/mL; 약 1570 mg/mL; 약 1575 mg/mL; 약 1580 mg/mL; 약 1585 mg/mL; 약 1590 mg/mL; 약 1595 mg/mL; 약 1600 mg/mL; 약 1605 mg/mL; 약 1610 mg/mL; 약 1615 mg/mL; 약 1620 mg/mL; 약 1625 mg/mL; 약 1630 mg/mL; 약 1635 mg/mL; 약 1640 mg/mL; 약 1645 mg/mL; 약 1650 mg/mL; 약 1655 mg/mL; 약 1660 mg/mL; 약 1665 mg/mL; 약 1670 mg/mL; 약 1675 mg/mL; 약 1680 mg/mL; 약 1685 mg/mL; 약 1690 mg/mL; 약 1695 mg/mL; 약 1700 mg/mL; 약 1705 mg/mL; 약 1710 mg/mL; 약 1715 mg/mL; 약 1720 mg/mL; 약 1725 mg/mL; 약 1730 mg/mL; 약 1735 mg/mL; 약 1740 mg/mL; 약 1745 mg/mL; 약 1750 mg/mL; 약 1755 mg/mL; 약 1760 mg/mL; 약 1765 mg/mL; 약 1770 mg/mL; 약 1775 mg/mL; 약 1780 mg/mL; 약 1785 mg/mL; 약 1790 mg/mL; 약 1795 mg/mL; 약 1800 mg/mL; 약 1805 mg/mL; 약 1810 mg/mL; 약 1815 mg/mL; 약 1820 mg/mL; 약 1825 mg/mL; 약 1830 mg/mL; 약 1835 mg/mL; 약 1840 mg/mL; 약 1845 mg/mL; 약 1850 mg/mL; 약 1855 mg/mL; 약 1860 mg/mL; 약 1865 mg/mL; 약 1870 mg/mL; 약 1875 mg/mL; 약 1880 mg/mL; 약 1885 mg/mL; 약 1890 mg/mL; 약 1895 mg/mL; 약 1900 mg/mL; 약 1905 mg/mL; 약 1910 mg/mL; 약 1915 mg/mL; 약 1920 mg/mL; 약 1925 mg/mL; 약 1930 mg/mL; 약 1935 mg/mL; 약 1940 mg/mL; 약 1945 mg/mL; 약 1950 mg/mL; 약 1955 mg/mL; 약 1960 mg/mL; 약 1965 mg/mL; 약 1970 mg/mL; 약 1975 mg/mL; 약 1980 mg/mL; 약 1985 mg/mL; 약 1990 mg/mL; 약 1995 mg/mL; 약 2000 mg/mL; 약 2005 mg/mL; 약 2010 mg/mL; 약 2015 mg/mL; 약 2020 mg/mL; 약 2025 mg/mL; 약 2030 mg/mL; 약 2035 mg/mL; 약 2040 mg/mL; 약 2045 mg/mL; 약 2050 mg/mL; 약 2055 mg/mL; 약 2060 mg/mL; 약 2065 mg/mL; 약 2070 mg/mL; 약 2075 mg/mL; 약 2080 mg/mL; 약 2085 mg/mL; 약 2090 mg/mL; 약 2095 mg/mL; 약 2100 mg/mL; 약 2105 mg/mL; 약 2110 mg/mL; 약 2115 mg/mL; 약 2120 mg/mL; 약 2125 mg/mL; 약 2130 mg/mL; 약 2135 mg/mL; 약 2140 mg/mL; 약 2145 mg/mL; 약 2150 mg/mL; 약 2155 mg/mL; 약 2160 mg/mL; 약 2165 mg/mL; 약 2170 mg/mL; 약 2175 mg/mL; 약 2180 mg/mL; 약 2185 mg/mL; 약 2190 mg/mL; 약 2195 mg/mL; 약 2200 mg/mL; 약 2205 mg/mL; 약 2210 mg/mL; 약 2215 mg/mL; 약 2220 mg/mL; 약 2225 mg/mL; 약 2230 mg/mL; 약 2235 mg/mL; 약 2240 mg/mL; 약 2245 mg/mL; 약 2250 mg/mL; 약 2255 mg/mL; 약 2260 mg/mL; 약 2265 mg/mL; 약 2270 mg/mL; 약 2275 mg/mL; 약 2280 mg/mL; 약 2285 mg/mL; 약 2290 mg/mL; 약 2295 mg/mL; 약 2300 mg/mL; 약 2305 mg/mL; 약 2310 mg/mL; 약 2315 mg/mL; 약 2320 mg/mL; 약 2325 mg/mL; 약 2330 mg/mL; 약 2335 mg/mL; 약 2340 mg/mL; 약 2345 mg/mL; 약 2350 mg/mL; 약 2355 mg/mL; 약 2360 mg/mL; 약 2365 mg/mL; 약 2370 mg/mL; 약 2375 mg/mL; 약 2380 mg/mL; 약 2385 mg/mL; 약 2390 mg/mL; 약 2395 mg/mL; 약 2400 mg/mL; 약 2405 mg/mL; 약 2410 mg/mL; 약 2415 mg/mL; 약 2420 mg/mL; 약 2425 mg/mL; 약 2430 mg/mL; 약 2435 mg/mL; 약 2440 mg/mL; 약 2445 mg/mL; 약 2450 mg/mL; 약 2455 mg/mL; 약 2460 mg/mL; 약 2465 mg/mL; 약 2470 mg/mL; 약 2475 mg/mL; 약 2480 mg/mL; 약 2485 mg/mL; 약 2490 mg/mL; 약 2495 mg/mL; 약 2500 mg/mL; 약 2505 mg/mL; 약 2510 mg/mL; 약 2515 mg/mL; 약 2520 mg/mL; 약 2525 mg/mL; 약 2530 mg/mL; 약 2535 mg/mL; 약 2540 mg/mL; 약 2545 mg/mL; 약 2550 mg/mL; 약 2555 mg/mL; 약 2560 mg/mL; 약 2565 mg/mL; 약 2570 mg/mL; 약 2575 mg/mL; 약 2580 mg/mL; 약 2585 mg/mL; 약 2590 mg/mL; 약 2595 mg/mL; 약 2600 mg/mL; 약 2605 mg/mL; 약 2610 mg/mL; 약 2615 mg/mL; 약 2620 mg/mL; 약 2625 mg/mL; 약 2630 mg/mL; 약 2635 mg/mL; 약 2640 mg/mL; 약 2645 mg/mL; 약 2650 mg/mL; 약 2655 mg/mL; 약 2660 mg/mL; 약 2665 mg/mL; 약 2670 mg/mL; 약 2675 mg/mL; 약 2680 mg/mL; 약 2685 mg/mL; 약 2690 mg/mL; 약 2695 mg/mL; 약 2700 mg/mL; 약 2705 mg/mL; 약 2710 mg/mL; 약 2715 mg/mL; 약 2720 mg/mL; 약 2725 mg/mL; 약 2730 mg/mL; 약 2735 mg/mL; 약 2740 mg/mL; 약 2745 mg/mL; 약 2750 mg/mL; 약 2755 mg/mL; 약 2760 mg/mL; 약 2765 mg/mL; 약 2770 mg/mL; 약 2775 mg/mL; 약 2780 mg/mL; 약 2785 mg/mL; 약 2790 mg/mL; 약 2795 mg/mL; 약 2800 mg/mL; 약 2805 mg/mL; 약 2810 mg/mL; 약 2815 mg/mL; 약 2820 mg/mL; 약 2825 mg/mL; 약 2830 mg/mL; 약 2835 mg/mL; 약 2840 mg/mL; 약 2845 mg/mL; 약 2850 mg/mL; 약 2855 mg/mL; 약 2860 mg/mL; 약 2865 mg/mL; 약 2870 mg/mL; 약 2875 mg/mL; 약 2880 mg/mL; 약 2885 mg/mL; 약 2890 mg/mL; 약 2895 mg/mL; 약 2900 mg/mL; 약 2905 mg/mL; 약 2910 mg/mL; 약 2915 mg/mL; 약 2920 mg/mL; 약 2925 mg/mL; 약 2930 mg/mL; 약 2935 mg/mL; 약 2940 mg/mL; 약 2945 mg/mL; 약 2950 mg/mL; 약 2955 mg/mL; 약 2960 mg/mL; 약 2965 mg/mL; 약 2970 mg/mL; 약 2975 mg/mL; 약 2980 mg/mL; 약 2985 mg/mL; 약 2990 mg/mL; 약 2995 mg/mL; 약 3000 mg/mL; 약 3005 mg/mL; 약 3010 mg/mL; 약 3015 mg/mL; 약 3020 mg/mL; 약 3025 mg/mL; 약 3030 mg/mL; 약 3035 mg/mL; 약 3040 mg/mL; 약 3045 mg/mL; 약 3050 mg/mL; 약 3055 mg/mL; 약 3060 mg/mL; 약 3065 mg/mL; 약 3070 mg/mL; 약 3075 mg/mL; 약 3080 mg/mL; 약 3085 mg/mL; 약 3090 mg/mL; 약 3095 mg/mL; 약 3100 mg/mL; 약 3105 mg/mL; 약 3110 mg/mL; 약 3115 mg/mL; 약 3120 mg/mL; 약 3125 mg/mL; 약 3130 mg/mL; 약 3135 mg/mL; 약 3140 mg/mL; 약 3145 mg/mL; 약 3150 mg/mL; 약 3155 mg/mL; 약 3160 mg/mL; 약 3165 mg/mL; 약 3170 mg/mL; 약 3175 mg/mL; 약 3180 mg/mL; 약 3185 mg/mL; 약 3190 mg/mL; 약 3195 mg/mL; 약 3200 mg/mL; 약 3205 mg/mL; 약 3210 mg/mL; 약 3215 mg/mL; 약 3220 mg/mL; 약 3225 mg/mL; 약 3230 mg/mL; 약 3235 mg/mL; 약 3240 mg/mL; 약 3245 mg/mL; 약 3250 mg/mL; 약 3255 mg/mL; 약 3260 mg/mL; 약 3265 mg/mL; 약 3270 mg/mL; 약 3275 mg/mL; 약 3280 mg/mL; 약 3285 mg/mL; 약 3290 mg/mL; 약 3295 mg/mL; 약 3300 mg/mL; 약 3305 mg/mL; 약 3310 mg/mL; 약 3315 mg/mL; 약 3320 mg/mL; 약 3325 mg/mL; 약 3330 mg/mL; 약 3335 mg/mL; 약 3340 mg/mL; 약 3345 mg/mL; 약 3350 mg/mL; 약 3355 mg/mL; 약 3360 mg/mL; 약 3365 mg/mL; 약 3370 mg/mL; 약 3375 mg/mL; 약 3380 mg/mL; 약 3385 mg/mL; 약 3390 mg/mL; 약 3395 mg/mL; 약 3400 mg/mL; 약 3405 mg/mL; 약 3410 mg/mL; 약 3415 mg/mL; 약 3420 mg/mL; 약 3425 mg/mL; 약 3430 mg/mL; 약 3435 mg/mL; 약 3440 mg/mL; 약 3445 mg/mL; 약 3450 mg/mL; 약 3455 mg/mL; 약 3460 mg/mL; 약 3465 mg/mL; 약 3470 mg/mL; 약 3475 mg/mL; 약 3480 mg/mL; 약 3485 mg/mL; 약 3490 mg/mL; 약 3495 mg/mL; 약 3500 mg/mL; 약 3505 mg/mL; 약 3510 mg/mL; 약 3515 mg/mL; 약 3520 mg/mL; 약 3525 mg/mL; 약 3530 mg/mL; 약 3535 mg/mL; 약 3540 mg/mL; 약 3545 mg/mL; 약 3550 mg/mL; 약 3555 mg/mL; 약 3560 mg/mL; 약 3565 mg/mL; 약 3570 mg/mL; 약 3575 mg/mL; 약 3580 mg/mL; 약 3585 mg/mL; 약 3590 mg/mL; 약 3595 mg/mL; 약 3600 mg/mL; 약 3605 mg/mL; 약 3610 mg/mL; 약 3615 mg/mL; 약 3620 mg/mL; 약 3625 mg/mL; 약 3630 mg/mL; 약 3635 mg/mL; 약 3640 mg/mL; 약 3645 mg/mL; 약 3650 mg/mL; 약 3655 mg/mL; 약 3660 mg/mL; 약 3665 mg/mL; 약 3670 mg/mL; 약 3675 mg/mL; 약 3680 mg/mL; 약 3685 mg/mL; 약 3690 mg/mL; 약 3695 mg/mL; 약 3700 mg/mL; 약 3705 mg/mL; 약 3710 mg/mL; 약 3715 mg/mL; 약 3720 mg/mL; 약 3725 mg/mL; 약 3730 mg/mL; 약 3735 mg/mL; 약 3740 mg/mL; 약 3745 mg/mL; 약 3750 mg/mL; 약 3755 mg/mL; 약 3760 mg/mL; 약 3765 mg/mL; 약 3770 mg/mL; 약 3775 mg/mL; 약 3780 mg/mL; 약 3785 mg/mL; 약 3790 mg/mL; 약 3795 mg/mL; 약 3800 mg/mL; 약 3805 mg/mL; 약 3810 mg/mL; 약 3815 mg/mL; 약 3820 mg/mL; 약 3825 mg/mL; 약 3830 mg/mL; 약 3835 mg/mL; 약 3840 mg/mL; 약 3845 mg/mL; 약 3850 mg/mL; 약 3855 mg/mL; 약 3860 mg/mL; 약 3865 mg/mL; 약 3870 mg/mL; 약 3875 mg/mL; 약 3880 mg/mL; 약 3885 mg/mL; 약 3890 mg/mL; 약 3895 mg/mL; 약 3900 mg/mL; 약 3905 mg/mL; 약 3910 mg/mL; 약 3915 mg/mL; 약 3920 mg/mL; 약 3925 mg/mL; 약 3930 mg/mL; 약 3935 mg/mL; 약 3940 mg/mL; 약 3945 mg/mL; 약 3950 mg/mL; 약 3955 mg/mL; 약 3960 mg/mL; 약 3965 mg/mL; 약 3970 mg/mL; 약 3975 mg/mL; 약 3980 mg/mL; 약 3985 mg/mL; 약 3990 mg/mL; 약 3995 mg/mL; 약 4000 mg/mL; 약 4005 mg/mL; 약 4010 mg/mL; 약 4015 mg/mL; 약 4020 mg/mL; 약 4025 mg/mL; 약 4030 mg/mL; 약 4035 mg/mL; 약 4040 mg/mL; 약 4045 mg/mL; 약 4050 mg/mL; 약 4055 mg/mL; 약 4060 mg/mL; 약 4065 mg/mL; 약 4070 mg/mL; 약 4075 mg/mL; 약 4080 mg/mL; 약 4085 mg/mL; 약 4090 mg/mL; 약 4095 mg/mL; 약 4100 mg/mL; 약 4105 mg/mL; 약 4110 mg/mL; 약 4115 mg/mL; 약 4120 mg/mL; 약 4125 mg/mL; 약 4130 mg/mL; 약 4135 mg/mL; 약 4140 mg/mL; 약 4145 mg/mL; 약 4150 mg/mL; 약 4155 mg/mL; 약 4160 mg/mL; 약 4165 mg/mL; 약 4170 mg/mL; 약 4175 mg/mL; 약 4180 mg/mL; 약 4185 mg/mL; 약 4190 mg/mL; 약 4195 mg/mL; 약 4200 mg/mL; 약 4205 mg/mL; 약 4210 mg/mL; 약 4215 mg/mL; 약 4220 mg/mL; 약 4225 mg/mL; 약 4230 mg/mL; 약 4235 mg/mL; 약 4240 mg/mL; 약 4245 mg/mL; 약 4250 mg/mL; 약 4255 mg/mL; 약 4260 mg/mL; 약 4265 mg/mL; 약 4270 mg/mL; 약 4275 mg/mL; 약 4280 mg/mL; 약 4285 mg/mL; 약 4290 mg/mL; 약 4295 mg/mL; 약 4300 mg/mL; 약 4305 mg/mL; 약 4310 mg/mL; 약 4315 mg/mL; 약 4320 mg/mL; 약 4325 mg/mL; 약 4330 mg/mL; 약 4335 mg/mL; 약 4340 mg/mL; 약 4345 mg/mL; 약 4350 mg/mL; 약 4355 mg/mL; 약 4360 mg/mL; 약 4365 mg/mL; 약 4370 mg/mL; 약 4375 mg/mL; 약 4380 mg/mL; 약 4385 mg/mL; 약 4390 mg/mL; 약 4395 mg/mL; 약 4400 mg/mL; 약 4405 mg/mL; 약 4410 mg/mL; 약 4415 mg/mL; 약 4420 mg/mL; 약 4425 mg/mL; 약 4430 mg/mL; 약 4435 mg/mL; 약 4440 mg/mL; 약 4445 mg/mL; 약 4450 mg/mL; 약 4455 mg/mL; 약 4460 mg/mL; 약 4465 mg/mL; 약 4470 mg/mL; 약 4475 mg/mL; 약 4480 mg/mL; 약 4485 mg/mL; 약 4490 mg/mL; 약 4495 mg/mL; 약 4500 mg/mL; 약 4505 mg/mL; 약 4510 mg/mL; 약 4515 mg/mL; 약 4520 mg/mL; 약 4525 mg/mL; 약 4530 mg/mL; 약 4535 mg/mL; 약 4540 mg/mL; 약 4545 mg/mL; 약 4550 mg/mL; 약 4555 mg/mL; 약 4560 mg/mL; 약 4565 mg/mL; 약 4570 mg/mL; 약 4575 mg

mg/mL; 약 160 mg/mL; 약 165 mg/mL; 약 170 mg/mL; 약 175 mg/mL; 약 180 mg/mL; 약 185 mg/mL; 약 190 mg/mL; 약 195 mg/mL; 약 200 mg/mL; 약 205 mg/mL; 약 210 mg/mL; 약 215 mg/mL; 약 220 mg/mL; 약 225 mg/mL; 약 230 mg/mL; 약 235 mg/mL; 약 240 mg/mL; 약 245 mg/mL; 약 250 mg/mL; 약 255 mg/mL; 약 260 mg/mL; 약 265 mg/mL; 약 270 mg/mL; 약 275 mg/mL; 약 280 mg/mL; 약 285 mg/mL; 약 200 mg/mL; 약 200 mg/mL; 또는 약 300 mg/mL의 치료적 단백질을 포함할 수도 있다.

[0056] 본 발명의 약학적 제형은 하나 이상의 부형제를 포함한다. 용어 "부형제"는, 본원에 사용된 바와 같이, 원하는 밀도, 점도 또는 안정화 효과를 제공하기 위해 제형에 추가된 어떤 비-치료적 약제도 의미한다.

[0057] 본 발명의 약학적 제형은 또한 하나 이상의 탄수화물, 예를 들어, 하나 이상의 당을 포함할 수도 있다. 당은 환원당(reducing sugar) 또는 비-환원당일 수도 있다. "환원당"은, 예를 들어, 케톤기 또는 알데히드기를 가진 당을 포함하고 반응성 헤미아세탈기를 함유하며, 이것은 당이 환원제로서 작용하는 것을 허용한다. 환원당의 특정 예는 프력토스, 글루코스, 글리세르알데히드, 락토스, 아라비노스, 만노스, 자일로스, 리보스, 람노스, 갈락토스 및 말토스를 포함한다. 비-환원당은 마이야르 반응(Maillard reaction)을 개시하기 위해 아세탈이며 아미노산 또는 폴리펩티드와 실질적으로 반응하지 않는 아노머 탄소를 포함할 수 있다. 비-환원당의 특정 예는 수크로스, 트레할로스, 소르보스, 수크랄로스, 멜레지토스 및 라피노스를 포함한다. 당 산(sugar acid)은, 예를 들어, 당산, 글루콘산염 및 다른 폴리히드록시 당 및 이들의 염을 포함한다.

[0058] 본 발명의 약학적 제형 내에 함유된 당의 양은 특정 상황 및 제형이 사용되기 위해 의도된 목적에 따라 다를 것이다. 특정 구체예들에서, 제형은 약 0.1% 내지 약 20% 당; 약 0.5% 내지 약 20% 당; 약 1% 내지 약 20% 당; 약 2% 내지 약 15% 당; 약 3% 내지 약 10% 당; 약 4% 내지 약 10% 당; 또는 약 5% 내지 약 10% 당을 함유할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 제형은 약 0.5%; 약 1.0%; 약 1.5%; 약 2.0%; 약 2.5%; 약 3.0%; 약 3.5%; 약 4.0%; 약 4.5%; 약 5.0%; 약 5.5%; 약 6.0%; 6.5%; 약 7.0%; 약 7.5%; 약 8.0%; 약 8.5%; 약 9.0%; 약 9.5%; 약 10.0%; 약 10.5%; 약 11.0%; 약 11.5%; 약 12.0%; 약 12.5%; 약 13.0%; 약 13.5%; 약 14.0%; 약 14.5%; 약 15.0%; 약 15.5%; 약 16.0%; 16.5%; 약 17.0%; 약 17.5%; 약 18.0%; 약 18.5%; 약 19.0%; 약 19.5%; 또는 약 20.0% 당 (예를 들어, 수크로스)을 포함할 수도 있다.

[0059] 본 발명의 약학적 제형은 또한 하나 이상의 계면활성제를 포함할 수도 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "계면활성제"는 용해되는 유동체의 표면 장력을 감소시키고 및/또는 오일 및 물 사이의 계면 장력을 감소시키는 물질을 의미한다. 계면활성제는 이온성 또는 비-이온성일 수 있다. 본 발명의 제형에 포함될 수 있는 예시적인 비-이온성 계면활성제는, 예를 들어, 알킬 폴리(에틸렌 옥시드), 알킬 폴리글루코시드 (예를 들어, 옥틸 글루코시드 및 데실 말토시드), 세틸 알콜 및 올레일 알콜과 같은 지방 알콜, 코카미드 MEA, 코카미드 DEA, 및 코카미드 TEA를 포함한다. 본 발명의 제형에 포함될 수 있는 특정 비-이온성 계면활성제는, 예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 28, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 및 폴리소르베이트 85와 같은 폴리소르베이트; 폴록사머 188, 폴록사머 407과 같은 폴록사머; 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜; 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 폴리소르베이트 20은 TWEEN 20, 소르비탄 일라우린산염 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 일라우린산염으로도 알려져 있다.

[0060] 본 발명의 약학적 제형 내에 함유된 계면활성제의 양은 제형의 원하는 특이적 성질, 뿐만 아니라 제형이 사용되기 위해 의도된 목적에 따라 다를 수도 있다. 특정 구체예들에서, 제형은 약 0.05% 내지 약 5% 계면활성제; 또는 약 0.1% 내지 약 0.2% 계면활성제를 함유할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 약 0.05%; 약 0.06%; 약 0.07%; 약 0.08%; 약 0.09%; 약 0.10%; 약 0.11%; 약 0.12%; 약 0.13%; 약 0.14%; 약 0.15%; 약 0.16%; 약 0.17%; 약 0.18%; 약 0.19%; 약 0.20%; 약 0.21%; 약 0.22%; 약 0.23%; 약 0.24%; 약 0.25%; 약 0.26%; 약 0.27%; 약 0.28%; 약 0.29%; 또는 약 0.30% 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20)를 포함할 수도 있다.

[0061] 본 발명의 약학적 제형은 또한 하나 이상의 버퍼를 포함할 수도 있다. 일부 구체예들에서, 버퍼는 pH 5.5-7.4의 범위와 완전히 또는 부분적으로 겹치는 완충 범위를 갖는다. 한 구체예에서, 버퍼는 약 6.0 ± 0.5의 pKa를 갖는다. 특정 구체예들에서, 버퍼는 인산염 버퍼를 포함한다. 특정 구체예들에서, 인산염은 5 mM ± 0.75 mM 내지 15 mM ± 2.25 mM; 6 mM ± 0.9 mM 내지 14 mM ± 2.1 mM; 7 mM ± 1.05 mM 내지 13 mM ± 1.95 mM; 8 mM ± 1.2 mM 내지 12 mM ± 1.8 mM; 9 mM ± 1.35 mM 내지 11 mM ± 1.65 mM; 10 mM ± 1.5 mM; 또는 약 10 mM의 농도로 존재한다. 특정 구체예들에서, 버퍼 시스템은 6.0 ± 0.5의 pH에서, 10 mM ± 1.5 mM로 히스티딘을 포함한다.

[0062] 본 발명의 약학적 제형은 약 5.0 내지 약 8.0의 pH를 가질 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 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 수도 있다

[0063] 한 특정 구체예에서, 치료적 단백질은 VEGF Trap 단백질이다. 미소화된 VEGF Trap 단백질 입자의 조제를 위한 약학적 제형은 약 10 mg/mL 내지 약 100 mg/mL VEGF Trap 단백질, 약 10 mg/mL, 약 15 mg/mL, 약 20 mg/mL, 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 55 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, 또는 약 100 mg/mL VEGF Trap 단백질을 함유할 수도 있다. 용액은 약 5 mM 내지 약 50 mM의 하나 이상의 버퍼를 함유할 수도 있다. 한 구체예에서, 버퍼는 약 6 ± 0.5의 pH에서 약 10 mM 인산염이다. 용액은 또한 약 1% 내지 약 10%의 농도에서 수크로스를 함유할 수도 있다. 한 구체예에서, 용액은 약 2 중량%에서 수크로스를 함유한다.

[0064] 일부 구체예들에서, 치료적 단백질 용액은 10 mM 인산염, pH 6.2, 2% 수크로스, 및 임의로 0.1% 폴리소르베이트 중 약 25 mg/mL 또는 약 50 mg/mL로 VEGF Trap 단백질을 함유한다.

[0065] 치료적 단백질 제형은 이후에 분산 및 건조를 받아서 미소화된 단백질 입자를 형성한다. 미소화된 단백질 입자를 만드는 한 방법은 단백질 용액이 분무 건조를 받게 하는 것이다. 분무 건조는 일반적으로 업계에 알려져 있고 예를 들어, 예를 들어, BUCHI Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH)와 같은 장비에서 실행될 수도 있다. 한 특정 구체예에서, 단백질 용액(예를 들어, 하지만 제한 없이 상기 설명된 VEGF 제형 중 어느 하나)은 약 2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 또는 약 7 mL/분의 속도로 분무 건조기로 주입되었다. 분무 건조기의 유입 온도는 예를 들어, 약 130°C와 같이, 물의 끓는점보다 높은 온도로 설정된다. 물의 끓는점보다 낮고 주위 온도보다 높은 유출 온도, 예를 들어, 55°C. 한 특정 구체예에서, 단백질 용액(예를 들어, VEGF Trap 용액 또는 IgG 용액)은 약 7 mL/분으로 BUCHI Mini Spray B-290으로 주입되었으며, 유입 온도는 약 130°C이고 유출 온도는 약 55°C이고, 아스피레이터(aspirator)는 33  $\text{m}^3/\text{h}$ 로 설정되고 분무 가스는 530 L/h이다.

[0066] 결과로 얻은 미소화된 단백질 입자는 크기가 지름 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 100  $\mu\text{m}$ 의 범위에 있으며, 단백질 및 부형제의 특정 제형 및 농도에 의존적이다. 일부 구체예들에서, 미소화된 단백질 입자는 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 100  $\mu\text{m}$ , 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 40  $\mu\text{m}$ , 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 15  $\mu\text{m}$ , 약 2.5  $\mu\text{m}$  내지 약 13  $\mu\text{m}$ , 약 3  $\mu\text{m}$  내지 약 10  $\mu\text{m}$ , 약 5  $\mu\text{m}$ , 약 6  $\mu\text{m}$ , 약 7  $\mu\text{m}$ , 약 8  $\mu\text{m}$ , 약 9  $\mu\text{m}$ , 약 10  $\mu\text{m}$ , 약 11  $\mu\text{m}$ , 또는 약 12  $\mu\text{m}$ 의 지름을 갖는다.

[0067] 이후 미소화된 단백질 입자는 생체 적합성 및 생분해성 폴리머로 코팅된다. 이는 폴리머 용액에서 미소화된 단백질 입자를 혼탁함으로써 달성될 수 있다. 폴리머 용액은 본질적으로 용매에 용해된 폴리머이다. 예를 들어, 생체 적합성 및 생분해성 폴리머는 그 중에서도 염화메틸렌, 테트라히드로푸란, 아세트산염 에틸, 또는 어떤 다른 유용한 용매에도 용해될 수 있다. 아세트산염 에틸은 안전한 용매로서 널리 알려져 있으며 종종 약물, 임플란트(implant) 및 식품의 제조에 사용된다.

[0068] 일부 구체예들에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 ("EC"), 폴리(젖산) ("PLA"), 폴리오르토에스테르 ("POE"), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 ("PLGA"), 또는 폴리-ε-카프로락톤 ("PCL")일 수 있다. 폴리머는 약 10 mg/mL 내지 약 300 mg/mL, 약 15 mg/mL 내지 약 295 mg/mL, 약 20 mg/mL 내지 약 290 mg/mL, 약 25 mg/mL 내지 약 280 mg/mL, 약 30 mg/mL 내지 약 270 mg/mL, 약 35 mg/mL 내지 약 265 mg/mL, 약 40 mg/mL 내지 약 260 mg/mL, 약 45 mg/mL 내지 약 260 mg/mL, 약 50 mg/mL 내지 약 255 mg/mL, 약 55 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 약 20 mg/mL, 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 75 mg/mL, 약 100 mg/mL, 약 125 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 175 mg/mL, 약 200 mg/mL, 약 225 mg/mL, 또는 약 250 mg/mL의 농도로 용매(예를 들어, 아세트산염 에틸)에 용해될 수 있다.

[0069] 미소화된 단백질 입자는 약 10 mg/mL 내지 약 100 mg/mL, 약 15 mg/mL 내지 약 95 mg/mL, 약 20 mg/mL 내지 약 90 mg/mL, 약 25 mg/mL 내지 약 85 mg/mL, 약 30 mg/mL 내지 약 80 mg/mL, 약 35 mg/mL 내지 약 75 mg/mL, 약 40 mg/mL 내지 약 70 mg/mL, 약 45 mg/mL 내지 약 65 mg/mL, 약 50 mg/mL 내지 약 60 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 또는 약 50 mg/mL로 폴리머 용액에 추가된다. 입자가 혼합되어 슬러리 또는 혼탁액을 형성하며, 이것은 이후에 분산 및 건조를 받아서 폴리머 코팅된 단백질 입자(즉, 미립자)를 형성한다.

[0070] 한 구체예에서, 단백질 입자-폴리머 용액 혼탁액은 분무 건조를 받으며, 이것은 미소화된 단백질 입자를 제조하는 방법과 유사하지만, 유기 용매 또는 폴리머의 점화로부터 보호하기 위해 유입 온도를 감소시키는 방식으로 수행된다. 간략히 말하면, 단백질 입자-폴리머 용액 혼탁액은 약 5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 또는 약 12.5 mL/분으로 분무 건조기로 주입된다. 혼탁액은 각각 530 L/h 및 35  $\text{m}^3/\text{h}$  (mm)의 아스피레이터 공기 및 분무 가스 유속으로 12.5 mL/분으로 분무 건조기로 주입되었다. 유입 온도는 90°로 설정되었고 유출 온도는 약 54°C로 설정

되었다. 분무 건조기의 유입 온도는 예를 들어, 약 90°C와 같이, 용매의 인화점보다 높은 온도로 설정된다. 예를 들어, 약 54°C와 같이, 흡수 온도보다 낮거나 주위 온도보다 높은 온도의 유출 온도. 한 특정 구체예에서, 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL 폴리머/아세트산염 에틸 용액 중에 약 50 mg/mL의 단백질 입자(예를 들어, VEGF Trap)를 함유하는 혼탁액은 약 12.5 mL/분으로 BIJCHI Mini Spray Dryer B-290으로 주입되며, 유입 온도는 약 90°C이고 유출 온도는 약 54°C이며, 아스피레이터는 약 35 mL/h로 설정되고 분무 가스는 약 530 L/h로 설정된다.

[0071] 결과로 얻은 미립자는, 폴리머 코어텍스 내에 단백질 입자를 함유하며, 지름의 범위는 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 70  $\mu\text{m}$ , 약 5  $\mu\text{m}$  내지 약 65  $\mu\text{m}$ , 약 10  $\mu\text{m}$  내지 약 60  $\mu\text{m}$ , 약 15  $\mu\text{m}$  내지 약 55  $\mu\text{m}$ , 약 20  $\mu\text{m}$  내지 약 50  $\mu\text{m}$ , 약 15  $\mu\text{m}$ , 약 20  $\mu\text{m}$ , 약 25  $\mu\text{m}$ , 또는 약 30  $\mu\text{m}$ 이다. 크기 변화는 많은 부분에서 폴리머 코어텍스의 두께를 반영하지만, 단백질 코어의 지름은 크기 변화에 어느 정도 기여할 수 있다. 시작 농도의 폴리머 용액, 및/또는 폴리머 자체의 제조는 미립자의 지름을 제어할 수 있다. 예를 들어, 50 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는 중앙 크기가 약 15  $\mu\text{m}$  내지 20  $\mu\text{m}$ 인 반면에, 250 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는 중앙 크기가 약 30  $\mu\text{m}$ 이었다.

[0072] 본 발명의 미립자는 단백질 치료제의 지속적 방출 또는 지속적인 방출에 유용하다. 예를 들어, VEGF Trap 미립자가 암 또는 다른 질병을 치료하기 위해, 예를 들어, 혈관 암구 질환의 치료를 위해 유리체에서 VEGF Trap 치료적 단백질의 지속적인 방출, 또는 VEGF Trap의 지속적인 방출을 위한 피하 이식에 있어서 유용한 것으로 나타난다.

[0073] 본 발명의 미립자는 약 37°C의 생리학적 수성 환경에서 적어도 60일로 연장된 기간 동안 비교적 일정한 속도로 단백질을 방출한다. 일반적으로, 더 높은 농도의 폴리머(예를 들어, 250 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 비교적 선형의 단백질 방출 프로파일을 나타내는 경향이 있는 반면에; 더 낮은 농도의 폴리머(예를 들어, 50 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 초기 파열에 이어서 지연된 파열 방출의 시작을 나타내는 경향이 있다. 게다가, 더 높은 농도의 폴리머로 형성된 미립자는 더 낮은 농도의 입자로 형성된 것들보다 더 느린 속도의 단백질 방출을 나타냈다. 시간이 흐름에 따라 미립자로부터 방출된 단백질의 속성은 시작 단백질 물질의 속성과 일치하였다. 단백질 분해는 거의 내지 전혀 일어나지 않았다.

#### 실시예

[0075] 당업자들에게 본 발명의 방법 및 조성물을 만들고 사용하는 방법의 완벽한 개시 및 설명을 제공하기 위해 다음 실시예가 제안되며 발명자들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다. 노력은 사용된 숫자(예를 들어, 양, 크기, 등)에 대한 정확도를 보장하기 위해 이루어졌지만 일부 실험적 오차 및 편차가 설명되어야 한다.

[0076] 하기 실시예에서, VEGF-Trap 단백질 ("VGT")은, 아미노산 서열 SEQ ID NO: 1을 포함하는 폴리펩티드의 다이머이며, 전형적인 수용체-Fc-융합 단백질의 역할을 한다.

#### 실시예 1 : 미소화된 단백질

[0078] 10 mM 인산염, 2% 슈크로스, pH 6.2 중에 25 mg/mL VEGF Trap 단백질 ("VGT"), 25 mg/mL VGT 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80, 및 50 mg/mL VGT를 함유하는 용액을 분무 건조 초미 분쇄기(micronizer) (BUCHI Mini Spray Dryer B-290, Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH)에서 각각 독립적으로 원자화하여 VEGF Trap을 함유하는 방울을 형성하였다. 열을 적용하여 방울로부터 물을 증발시켰으며, VEGF Trap을 함유하는 분말을 발생시켰다. 유입 온도를 130°C로 설정하였고 유출 온도를 약 55°C로 설정하였다. 아스피레이터를 33 mL/h로 설정하였고 분무 가스를 530 L/h로 설정하였다. VGT 용액을 약 7 mL/분으로 주입하였다. 결과의 VGT 입자의 크기를 미세 유동 영상(MFI) 및 동적 광산란(DLS)에 의해 측정하였다. 도 1은 25 mg/mL VGT, 25 mg/mL VGT 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80, 및 50 mg/mL VGT 농도의 각각으로부터 유래된 VGT 입자에 대하여, MFI에 의해 결정된 입자 크기 분포를 기술한다. 모든 농도에 대하여, VGT 입자의 상당 원형 지름 (ECD)은 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 39  $\mu\text{m}$ 의 범위에 있으며, 입자의 대부분은 크기가 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 14  $\mu\text{m}$ 의 범위에 있다. 25 mg/mL VGT 용액에 대하여, 입자들은 약 2.5  $\mu\text{m}$  내지 약 8.8  $\mu\text{m}$ 의 범위에 모여있으며, 약 6  $\mu\text{m}$ 의 최빈값(mode)를 갖는다. 25 mg/mL VGT 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80 용액에 대하여, 입자는 약 2.5  $\mu\text{m}$  내지 약 9.7  $\mu\text{m}$ 의 범위에 모여있으며, 약 6  $\mu\text{m}$ 의 최빈값을 갖는다. 50 mg/mL VGT 용액에 대하여, 입자는 약 2.7  $\mu\text{m}$  내지 약 12.8  $\mu\text{m}$ 의 범위에 모여있으며, 약 7  $\mu\text{m}$ 의 최빈값을 갖는다. MFI 및 DLS 방법 둘 다에 의해 결정된, 각각의 제형에 대한 중앙 지름은 표 1에서 설

명된다.

[0079] VGT 입자를 주사용수에서 재구성하였고 단백질 순도를 결정하기 위해 크기 배제, 즉, 크기 배제-고성능 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)를 통해 검사하였다. 시작 물질에 비해 초미 분쇄 이후 순도의 어떤 변화도 언급되지 않았다(표 3 참조).

표 1: MFI 및 DLS에 의해 결정된 중앙 단백질 입자 크기( $\mu\text{m}$ )

제형	MFI ( $\mu\text{m}$ )에 의한 중앙 크기	DLS ( $\mu\text{m}$ )에 의한 중앙 크기
50mg/mL VEGF Trap	7	7.6
25mg/mL VEGF Trap	6	5.9
25mg/mL VEGF Trap, 0.1% 폴리소르베이트80	6	7.1

[0081]

## 실시예 2: 유기 폴리머 용액 중의 미소화된 단백질 혼탁액

[0083] 미립자의 폴리머 코어텍스의 제조에 있어서 다양한 폴리머가 사용되었거나 사용을 위해 고려된다. 상기 폴리머는 그 중에서도 에틸 셀룰로스 ("EC"), 폴리오르토에스테르 ("POE"), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드("PLGA"), 및 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 ("PCL")을 포함한다.

### 에틸 셀룰로스 코팅

[0085] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 50 mg/mL 에틸 셀룰로스 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-EC 혼탁액"으로 지정하였다.

[0086] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 100 mg/mL 에틸 셀룰로스 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-100-EC 혼탁액"으로 지정하였다.

[0087] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 250 mg/mL 에틸 셀룰로스 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-EC 혼탁액"으로 지정하였다.

### 폴리오르토에스테르 코팅

[0089] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 약 5% 잠재성 산을 함유하는 50 mg/mL 폴리오르토에스테르 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-POE 혼탁액"으로 지정하였다.

[0090] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 약 5% 잠재성 산을 함유하는 50 mg/mL 폴리오르토에스테르 용액에서 약 250 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-POE 혼탁액"으로 지정하였다.

### 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 코팅

[0092] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 50 mg/mL PLGA 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-PLGA 혼탁액"으로 지정하였다.

[0093] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 200 mg/mL PLGA 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-200-PLGA 혼탁액"으로 지정하였다.

[0094] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 250 mg/mL PLGA 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-PLGA 혼탁액"으로 지정하였다.

### 폴리- $\epsilon$ -카프로락톤 코팅

[0096] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 50 mg/mL PCL 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-PCL 혼탁액"으로 지정하였다.

[0097] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 250 mg/mL PCL 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 혼탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-PCL 혼탁액"으로 지정하였다.

[0098] PCL는 낮은  $T_g$ 를 가지고 있으며 하기 설명된 바와 같이 열 건조에 적합하지 않을 수도 있지만, 예를 들어, 폴리비닐 알콜(PVA)이 들어있는 수조에서의 용매 추출에 사용될 수 있다.

[0099] **실시예 3: 단백질-폴리머 미세 방울의 분산 및 용매 제거**

각 VGT 폴리머 혼탁액은, 실시예 2(상기)에 따라 만들어졌으며, BUCHI Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH)을 사용하여 분무 건조되었다. 간략히 말하면, 각 혼탁액은 원자화되어 미세방울을 형성하며, 이것들은 이후에 열 건조되어 용매를 제거하고 폴리머-코팅된 단백질 미립자를 형성한다. 혼탁액을 분무 건조기로 12.5 mL/분으로 주입하였으며, 아스피레이터 공기 및 분무 건조 유속은 각각 약 530 L/h 및 35 m<sup>3</sup>/h였다. 유입 온도를 90°로 설정하였고 유출 온도를 약 54°C로 설정하였다.

[0101] **실시예 4: 단백질-폴리머 미립자의 특성**

예시된 공정에 따라 제조된, 분무 건조된 폴리머 코팅된 단백질 입자는 약 2.5  $\mu\text{m}$  내지 약 65  $\mu\text{m}$ 의 범위의 상당 원형 지름을 갖는 복수의 미립자를 발생시킨다 (도 2). 크기 변화는 많은 부분에서 폴리머 코어텍스의 두께를 반영하지만, 단백질 코어의 지름은 크기 변화에 어느 정도 기여할 수 있다. 미립자의 지름은 폴리머 용액의 시작 농도와 연관성이 있다 (표 2, 도 2). 50 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는 중앙 크기가 약 17  $\mu\text{m}$  ± 2.8  $\mu\text{m}$ 이었다. 250 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는 중앙 크기가 약 29  $\mu\text{m}$ 이었다.

[0103] **실시예 5: 분무 건조 후 단백질 안정성**

VEGF-Trap 단백질의 안정성을 정량적 크기 배제 크로마토그래피 (SE-UPLC)를 사용하여 평가하였으며, 이는 온전한 모노머에 비해 더 작은 분해 생성물 및 더 큰 응축 생성물의 정량을 허용한다. 결과는 표 3에서 설명된다. 근본적으로, 단백질은 분무 건조 및 분무 코팅 공정을 통해 안정성을 유지하였다.

단백질 대 폴리머의 평균 중량비를 또한 제조된 미립자에 대하여 결정하였다. 다양한 폴리머 및 폴리머 농도로 제조된 미립자의 컬렉션을 추출하였고 정량적 역상 크로마토그래피(RP-HPLC)를 받게 하였다. 결과는 표 3에서 제공된다. 데이터는 더 높은 시작 농도의 폴리머가 미립자에서 더 두꺼운 폴리머 코어텍스를 수득한다는 이론을 지지하는 것으로 설명될 수도 있다.

[0104] **표 2: 상당 원형 지름 값**

물질	범위 ( $\mu\text{m}$ )	중앙값 ( $\mu\text{m}$ )	최빈값 ( $\mu\text{m}$ )
VEGF-Trap ("VGT") (50 mg/mL)	2.5 - 29.4	10 - 12	8.3
VGT (50 mg/mL) + POE (50 mg/mL)	2.5 - 64.5	15	9.4
VGT (50 mg/mL) + POE (250 mg/mL)	2.5 - 49.4	29	28.5
VGT (50 mg/mL) + EC (50 mg/mL)	2.5 - 49.6	19	16.5

[0105] **표 3: 단백질 안정성 및 로딩**

물질	VGT 시작 물질	코팅된 폴리머로부터 추출된 VGT <sup>1</sup>		
		% 고유	% 고유 <sup>2</sup>	중량% VGT/ 폴리머 <sup>3</sup>
VGT 시작 물질	97.7	-	-	-
재구성된 VGT	97.6	-	-	-
VGT (50 mg/mL) + POE (50 mg/mL)	-	96.3	14.6	
VGT (50 mg/mL) + POE (250 mg/mL)	-	97.7	1.8	
VGT (50 mg/mL) + EC (50 mg/mL)	-	97.1	6.1	

[0106] <sup>1</sup>코팅되지 않은 VEGF Trap을 제거하기 위한 1시간 재구성 후 추출된 VEGF Trap에 기초함

[0107] <sup>2</sup>SE-UPLC에 의해 고유한 퍼센트의 평균 (n=4).

[0108] <sup>3</sup>RP-HPLC에 의해 VGT의 중량 로딩 대 폴리머의 중량 로딩에 대한 퍼센트 중량의 평균 (n=4).

[0109] **실시예 6: 미립자로부터의 단백질 방출**

미립자로부터의 단백질 방출을 버퍼(10 mM 인산염, 0.03% 폴리소르베이트 20, pH 7.0)에 다수의 배취의 미립자를 현탁하고 37°C에서 배양되는 동안 시간이 흐름에 따라 용액으로 방출된 단백질의 양 및 속성을 측정함으로써 결정하였다. 1-2주 간격으로, 미립자를 부드러운 원심분리에 의해 펠릿화하였고 방출된 단백질을 함유하는 상층액의 80%를 이후의 분석을 위해 수거하였다.

[0115] 등량의 신선한 버퍼를 대체하였고 미립자를 부드러운 보텍싱(vortexing)에 의해 재현탁하였고 37°C 배양 챔버에 되돌려 놓았다. 혼탁액 중의 단백질 양 및 속성을 크기 배제 크로마토그래피에 의해 평가하였다.

[0116] 일반적으로, 더 높은 농도의 폴리머 (예를 들어, 250 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 비교적 선형의 단백질 방출 프로파일을 나타내는 경향이 있는 반면에; 더 낮은 농도의 폴리머 (예를 들어, 50 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 초기 과열에 이어서 지연된 과열 방출의 시작을 나타내는 경향이 있다. 최대 약 60일 동안, 안정하게 유지되는, 단백질의 지속적인 방출을 나타내는 데이터는 도 3에서 기술된다 (방출 데이터). 표 4는 방출 데이터의 선형 비율을 요약한다.

표 4: 단백질 방출 동역학

물질	VEGF Trap 단백질 방출 (mg VGT/주)
VGT (50 mg/mL) + POE (50 mg/mL)	0.14 ± 0.16
VGT (50 mg/mL) + POE (250 mg/mL)	0.06 ± 0.02
VGT (50 mg/mL) + EC (50 mg/mL)	0.031 ± 0.02

[0118]

[0119] 실시예 7: 입자 크기는 폴리머 농도 및 분무 가스 흐름에 의해 제조될 수 있다

[0120] 입자 크기 분포를 폴리머 농도 및 입자화 분무 건조 유속에 의해 제어하였다. 증가된 폴리머 농도는 분포를 더 큰 입자 쪽으로 이동시켰다 (45 mm 분무 가스 유속에서 200 mg/mL PLGA 대 45 mm 분무 가스 유속에서 100 mg/mL PLGA; 표 5 참조). 유사하게, 더 낮은 원자화 분무 가스 유속은 더 큰 방울, 및 따라서 더 큰 입자를 발생시켰다 (25 mm 분무 가스 유속에서 100 mg/mL PLGA 대 45 mm 분무 가스 유속에서 100 mg/mL PLGA; 표 5 참조).

표 5: 입자 크기(모든 측정값은 대략적임)

[PLGA] (mg/mL)	가스 유속 (m <sup>3</sup> /h)	입자 크기 범위 (미크론)	입자 크기의 최빈값 (미크론)	15 미크론 입자 크기를 갖는 입자의 퍼센트 총 부피
단백질 단독	NA	2.5-25	3.5	1.5%
100	25	2.5-40	9.4	3.7%
100	45	2.5-30	9.4	3.7%
200	45	2.5-30	10.2-15.4	5.4%

[0122]

[0123] 실시예 8: 입자 크기 및 다수의 폴리머에 걸친 단백질 방출

[0124] VEGF Trap 또는 IgG는 저분자량 (202S) 폴리(젖산) (PLA-LMW), 고분자량 (203S) 폴리(젖산) (PLA-HMW), 폴리무수몰 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), PEG-폴리(젖산) 블록 코폴리머 (PEG-PLA), 및 폴리-D,L-락ти드-코-글리콜리드 (PLGA)로 분무 코팅되었다. 분무-건조된 단백질의 25 mg/mL를 50-100 mg/mL 폴리머와 결합시켰다. 37°C에서 10 mM 인산염 버퍼, pH 7.2에서 시험관 내 방출 검정을 수행하였다. 결과는 표6에서 나타난다.

[0125]

표 6: 폴리머 의존적 입자 크기 및 단백질 방출(모든 측정값은 대략적임)

폴리머	단백질	15 미크론에서 입자의 상대적인 수	100% 단백질 방출에 대한 시간
PLA-LMW	VEGF Trap	0.8 × 10 <sup>2</sup>	3일
PLA-HMW	VEGF Trap	0.8 × 10 <sup>2</sup>	3일
pCPH	VEGF Trap	1 × 10 <sup>2</sup>	3일
PHB-PVA	VEGF Trap	5 × 10 <sup>2</sup>	1일
PEG-PLA	VEGF Trap	0.6 × 10 <sup>2</sup>	6시간
PLGA	IgG	1 × 10 <sup>2</sup>	8일

[0126]

[0127] 실시예 9: 다수의 폴리머에서 단백질 안정성

[0128] VEGF Trap 및 IgG를 그것들 각각의 폴리머 코팅으로부터 추출하였고 SE-UPLC에 의해 순도를 측정하였다. 결과를 표 7에서 요약하였다. 단백질은 일반적으로 테스트된 폴리머에 대한 분무 코팅 공정에 호환성이다. 단백질은 계

속해서 단백질을 방출하는 상기 폴리머에 대하여 적어도 14일 동안은 안정하게 유지되었다.

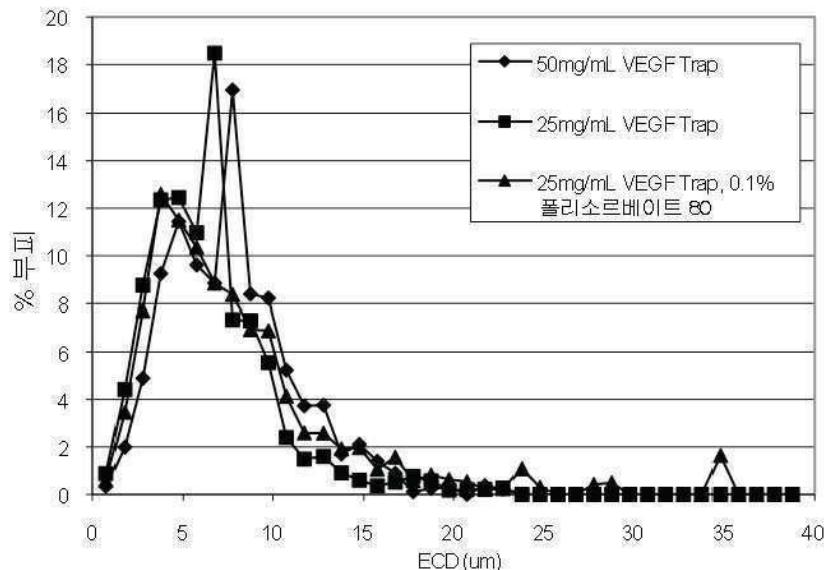
[0129] 표 7

단백질	폴리머	크기 배제 크로마토그래피에 의한 %순도			
		분무 코팅 후	시험관 내 방출 (IVR) 제1 일	IVR 제3 일	IVR 제14 일
VEGF Trap	POE (AP141)	97.7	98.3	98.2	96.7
VEGF Trap	PLA-LMW	97.0	97.4	92.8	-
VEGF Trap	PLA-HMW	93.9	97.3	95.4	-
VEGF Trap	PEG-PLA	89.9	91.2	-	-
VEGF Trap	pCPH	89.2	94.2	84.8	-
VEGF Trap	PHB-PVA	97.4	96.2	-	-
VEGF Trap	PLGA	96.6	97.8	-	93.6
IgG	PLGA	99.2	98.0	-	92.0

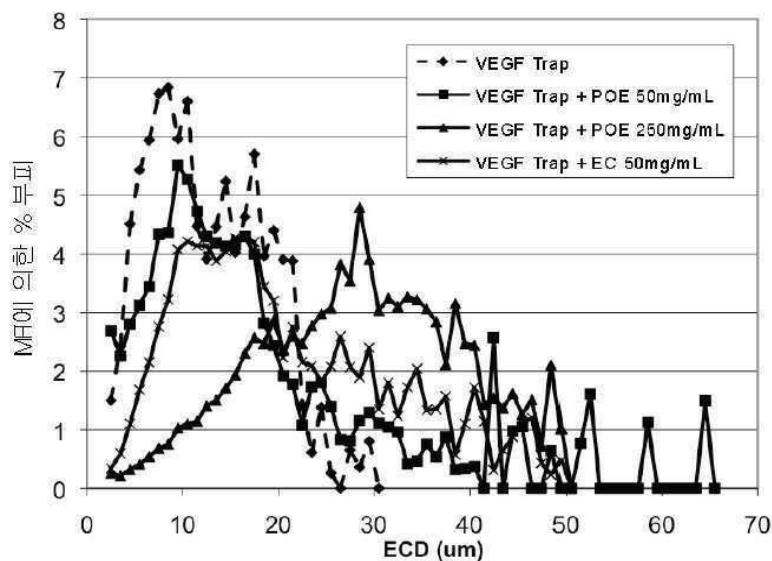
[0130]

## 도면

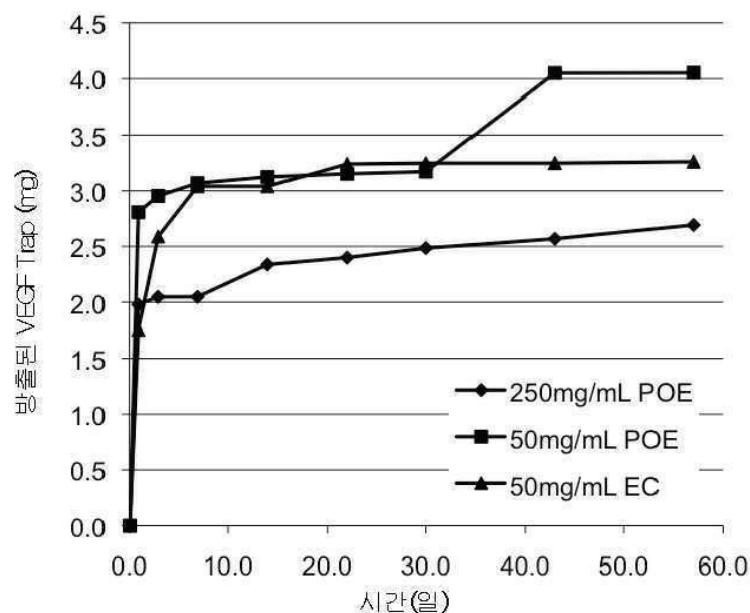
## 도면1



## 도면2



## 도면3



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Polymer Protein Microparticles

<130> 1110A

<140> Not available

<141> 2012-11-18

&lt;150&gt; US 61/561,525

&lt;151&gt; 2011-11-18

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 415

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; synthetic

&lt;400&gt; 1

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val

1 5 10 15

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr

20 25 30

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe

35 40 45

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu

50 55 60

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg

65 70 75 80

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile

85 90 95

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr

100 105 110

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys

115 120 125

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly

130 135 140

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr

145 150 155 160

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met

165 170 175

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr  
 180 185 190  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 195 200 205  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 210 215 220  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 245 250 255  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 260 265 270  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr  
 275 280 285  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 290 295 300  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 325 330 335  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 340 345 350  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 355 360 365  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 370 375 380  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 385 390 395 400  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 405 410 415