

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534721
(P2004-534721A)

(43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 47/48
A61K 9/50
A61K 9/51
A61K 38/00
A61K 47/34

F 1

A 61 K 47/48
A 61 K 9/50
A 61 K 9/51
A 61 K 47/34
A 61 P 25/04

テーマコード(参考)

4 C 0 7 6
4 C 0 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-538978 (P2002-538978)	(71) 出願人	50315197 ピーアール ファーマシューティカルズ, インク. P R PHARMACEUTICALS, INC.
(86) (22) 出願日	平成13年10月31日 (2001.10.31)		アメリカ合衆国 コロラド州 80524 ポートコリンズ ウエブスター コ ート 1512 1512 Webster Court, Fort Collins, CO 8 0524 (US)
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月25日 (2003.4.25)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/045154	(74) 代理人	100095577 弁理士 小西 富雅
(87) 國際公開番号	WO2002/036169	(74) 代理人	100100424 弁理士 中村 知公
(87) 國際公開日	平成14年5月10日 (2002.5.10)		
(31) 優先権主張番号	60/244,499		
(32) 優先日	平成12年10月31日 (2000.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生理活性分子の向上した送達のための方法及び組成物

(57) 【要約】

治療タンパク質、ペプチド及びオリゴヌクレオチドなどの生理活性分子の制御された持続性放出のための製剤が開発された。これらの製剤は、ポリ(乳酸)(PLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)及びこれらのコポリマなどの生分解性合成ポリマの組合せから形成された固体のマイクロ粒子又はナノ粒子に基づく。生理活性分子をポリエチレングリコール又はポリプロピレングリコールなどの親水性ポリマに結合させ、制御放出を行うよう、調剤する。当該生理活性分子は、親水性ポリマを結合させていない同じ生理活性分子に比べ、より安定で、免疫原性が低く、優れた放出速度曲線を有し、バーストレベルは低く、また装薬量も多い。

本制御放出製剤は注射、吸入、鼻孔、又は経口で投与できる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生理活性分子の制御放出のための医薬製剤であって、生理活性分子及び親水性ポリマの結合体と組み合わされた生分解性ポリマを含んで成る、医薬製剤。

【請求項 2】

前記生理活性分子及び前記親水性ポリマが共有結合させてある、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3】

前記生分解性ポリマが、ポリヒドロキシ酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びこれらのコポリマからなる群より選択される、請求項 1 に記載の医薬製剤。 10

【請求項 4】

前記生分解性ポリマがポリ無水物、ポリオルトエステル、及び多糖ポリマからなる群より選択される、請求項 3 に記載の医薬製剤。

【請求項 5】

前記親水性ポリマが、ポリエチレンジリコール、ポリプロピレンジリコール並びにこれらの直線状及び分枝状の誘導体からなる群より選択される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 6】

前記生分解性ポリマを調剤して、前記結合体を封入したマイクロ粒子又はナノ粒子にする、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 7】

前記生理活性分子が、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、エリスロポエチン、顆粒球コロニ刺激因子、顆粒球マクロファージコロニ刺激因子、インターロイキン 1、インターロイキン 2、インターロイキン 3、インターロイキン 12、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、インシュリン、ACTH、グルカゴン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、チモシン、副甲状腺ホルモン、色素性ホルモン、ソマトメジン、黄体形成ホルモン、総毛性性腺刺激ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、ビファリン（原語：biphalain）、プロラクチン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ、治療遺伝子、ヘパリン、低分子量ヘパリン及び小型生理活性分子からなる群より選択される、請求項 1 に記載の医薬製剤。 30

【請求項 8】

生理活性分子及び親水性ポリマの結合体に組み合わされた生分解性ポリマを含んで成る組成物を対象に投与するステップを含む、対象に対する生理活性分子の制御された全身送達のための方法。

【請求項 9】

前記組成物が経口投与される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記組成物が吸入又は粘膜送達により投与される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記組成物が注射により投与される、請求項 8 に記載の方法。 40

【請求項 12】

前記注射が皮下又は筋肉内である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記生理活性分子及び前記親水性ポリマが共有結合させてある、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記生分解性ポリマが、ポリヒドロキシ酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びこれらのコポリマからなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 15】

前記親水性ポリマが、ポリエチレンジリコール、ポリプロピレンジリコール、並びにこれらの直線状及び分枝状の誘導体からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。 50

【請求項 16】

前記生分解性ポリマを調剤して、前記結合体を封入したマイクロ粒子又はナノ粒子にする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 17】

前記生理活性分子が、 - インターフェロン、 - インターフェロン、 - インターフェロン、エリスロポエチン、顆粒球コロニ刺激因子、顆粒球マクロファージコロニ刺激因子、インターロイキン 1、インターロイキン 2、インターロイキン 3、インターロイキン 12、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、インシュリン、A C T H、グルカゴン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、チモシン、副甲状腺ホルモン、色素性ホルモン、ソマトメジン、黄体形成ホルモン、総毛性性腺刺激ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、ビファリン、プロラクチン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ、治療遺伝子、ヘパリン、低分子量ヘパリン及び小型生理活性分子からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 18】

生理活性分子を親水性ポリマに結合させるステップと、
前記結合された生理活性分子を生分解性ポリマと一緒に調剤するステップと、
生じた製剤を対象に投与するステップと
を含む、生理活性分子の生物学的利用能を増加させる方法。

20

【請求項 19】

前記生分解性ポリマを調剤して、前記結合体を封入したナノ粒子にする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記製剤が経口投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記生理活性分子及び前記親水性ポリマを共有結合させる、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記生分解性ポリマが、ポリヒドロキシ酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びこれらのコポリマからなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 23】

前記親水性ポリマが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール並びにこれらの直線状及び分枝状の誘導体からなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 24】

前記生分解性ポリマを調剤して、前記結合体を封入したマイクロ粒子又はナノ粒子にする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 25】

前記生理活性分子が、 - インターフェロン、 - インターフェロン、 - インターフェロン、エリスロポエチン、顆粒球コロニ刺激因子、顆粒球マクロファージコロニ刺激因子、インターロイキン 1、インターロイキン 2、インターロイキン 3、インターロイキン 12、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、インシュリン、A C T H、グルカゴン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、チモシン、副甲状腺ホルモン、色素性ホルモン、ソマトメジン、黄体形成ホルモン、総毛性性腺刺激ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、ビファリン、プロラクチン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ、治療遺伝子、ヘパリン、低分子量ヘパリン及び小型生理活性分子からなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 26】

生理活性分子を親水性ポリマに結合させるステップと、
前記結合された生理活性分子を生分解性ポリマと一緒に調剤するステップと、
生じた製剤を対象に投与するステップと

50

を含む、生理活性分子の免疫原性を低下させる方法。

【請求項 27】

前記組成物が経口投与される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記生理活性分子及び前記親水性ポリマを共有結合させる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記生分解性ポリマが、ポリヒドロキシ酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びこれらのコポリマからなる群より選択される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記親水性ポリマが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール並びにこれら直線状及び分枝状の誘導体からなる群より選択される、請求項 26 に記載の方法。 10

【請求項 31】

前記生分解性ポリマを調剤して、前記結合体を封入したマイクロ粒子又はナノ粒子にする、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

前記生理活性分子が、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、エリスロポエチン、顆粒球コロニ刺激因子、顆粒球マクロファージコロニ刺激因子、インターロイキン 1、インターロイキン 2、インターロイキン 3、インターロイキン 12、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、インシュリン、ACTH、グルカゴン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、チモシン、副甲状腺ホルモン、色素性ホルモン、ソマトメジン、黄体形成ホルモン、総毛性性腺刺激ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、ビファリン、プロラクチン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アブタマ、治療遺伝子、ヘパリン、低分子量ヘパリン及び小型生理活性分子からなる群より選択される、請求項 26 に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、引用をもってその内容をここに援用することとする、2000年10月31日出願の米国仮出願番 60/244,499 号の標題「生理活性分子の向上した送達のための方法及び組成物」の優先権を主張するものである。 30

【0002】

発明の背景

生分解性ポリマのマイクロスフィア及びナノスフィアに医薬を封入すると、薬物自体を投与したときに比較して、治療的薬物レベルの維持を長引かせることができる。処方や封入した活性分子によっては、持続的放出を最高で数ヶ月まで、延長させることもできる。しかしながら、数多くの生理活性分子、特にタンパク質は、ポリマ担体にそれらを封入するのに必要な手法により、損傷したり、不安定になる。さらに、荷電し、極性があるという多くのタンパク質の性質のために、ポリマによる薬物担体への封入の程度が制約を受け、最初に投与したときに、封入された生理活性分子の一部が急速に失われる（バースト）ことがある。生分解性ポリマ送達系への生理活性分子の封入は、患者への投与時の免疫応答を刺激するために用いられてきた（ゴムボッツ氏らの米国特許第 5,942,253 号を参照されたい）。場合によってはこれは望ましい結果ではあるが、治療を目的とした生理活性分子の送達が目的である場合には、これは望ましくない。このように、生分解性ポリマを用いて送達された生理活性分子の免疫系による認識を低下させることは、治療の場では有利であろう。 40

【0003】

生理活性分子、特に治療タンパク質（薬物）の一箇所以上のアミノ酸側鎖に、ポリエチレングリコールなどの親水性ポリマを共有結合させて（ペギレーションとして知られるプロセス）修飾することがある（例えばデイビス氏らの米国特許第 4,179,337 号；ハ 50

リス氏の米国特許第5,446,090号、デルガド氏らの米国特許第5,880,255号を参照されたい)。当業では、このような結合により分子量が見かけ上増加して、修飾された治療タンパク質の血中クリアランス速度が低下することが公知である(例えばキャンブル氏の米国特許第5,320,840号を参照されたい)が、この先行技術は、PEG化タンパク質を用いると、免疫原性を低減できたり、又は、生分解性ポリマ薬物送達系からの放出時間が延長できることは教示していない。また該先行技術は、PEG化により、生分解性の薬物送達系中の装薬量を、PEG化していない薬物に比べて増加させられることを教示しておらず、また、PEG化した成分では、PEG化していない薬物に比べて、薬物のバーストを低減できることも教示していない。

【0004】

10

発明の概要

本発明は、治療タンパク質、ペプチド及びオリゴヌクレオチドなどの生理活性分子の制御された持続性放出のための新規な製剤を提供するものである。本製剤は、例えばポリ(乳酸)(PLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、及びこれらのコポリマなどの生分解性のポリマの組合せから形成されたマイクロ粒子又はナノ粒子に基づく。生理活性分子をポリエチレンギリコール又はポリプロピレンギリコールなどの親水性ポリマに結合させた後、調剤して固体のマイクロ粒子又はナノ粒子にすることで、放出を制御する。本制御放出製剤は、注射、吸入、鼻孔、又は経口により投与することができる。

【0005】

20

従って、本発明の一部として、親水性のポリマを薬物及び治療タンパク質などの生理活性分子に結合させると、薬物担体への封入条件下における分解及び変性から保護できるという点を含め、いくつかの利点があることが発見されている。さらに、封入可能な修飾タンパク質の量が、修飾していないタンパク質に比べて増すため、総投与量を抑えることができ、患者及びメーカーに双方にとって有利である。

【0006】

30

加えて、本発明は、生分解性ポリマ薬物送達用担体に封入されたPEG化生理活性分子の免疫原性は、該担体中のPEG化していない生理活性分子に比べて、特に皮下もしくは筋肉内注射又は吸入又は粘膜送達(例えば経口又は鼻孔送達)したときに、低減されているという発見にも基づくものである。このような免疫原性の低減は、生分解性ポリマを経口送達に用いるという、粘膜ワクチン接種の典型的な方法で、特に有利である。

【0007】

30

別の局面では、本発明は、通常は胃腸管から吸収されないようなPEG化タンパク質、ペプチド、オリゴ糖及びオリゴヌクレオチドも、生分解性ポリマ系、特にナノスフィアに入れて投与すると生物学的利用能を獲得するという発見に基づくものである。ここで用いる用語「生物学的利用能のある」とは、対象への投与後に血流に入る分の生理活性分子を言う。本発明の制御放出製剤は、経口投与されたときの生理活性分子、特にここに解説するナノスフィア製剤の生物学的利用能を増加させる。例えば、ナノスフィアに封入したPEG化生理活性分子を一回、経口投与後では、血中レベルを、最長数日、維持できる。さらに、ポリエチレンギリコール鎖は、ナノスフィアの形成過程において生理活性分子を分解及び変性から守り、活性物質の保持量を増加させ、「バースト」効果を低減する。

【0008】

40

このように、ある好適な実施態様では、本発明は、生理活性分子の制御された持続放出と生物学的利用能增加のための医薬組成物を提供するものであり、該医薬組成物は、ナノスフィア中に封入された、ポリマ(例えばPEG)を結合させた治療薬を含む。特に好適な実施態様では、本組成物を経口投与する。

【0009】

50

ある好適な実施態様では、本生理活性分子は、-インターフェロン、-インターフェロン、-インターフェロン、エリスロポエチン、顆粒球コロニ刺激因子、顆粒球マクロファージコロニ刺激因子、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン12、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、インシュ

リン、A C T H、グルカゴン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、チモシン、副甲状腺ホルモン、色素性ホルモン、ソマトメジン、黄体形成ホルモン、総毛性性腺刺激ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、ビファリン、プロラクチン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ、治療遺伝子、ヘパリン、低分子量ヘパリン及び小型生理活性分子からなる群より選択される。

【 0 0 1 0 】

従って、本発明の組成物は、治療的生理活性分子の *i n v i v o* 送達をいくつかの点で向上させるのに用いることができる。具体的には、本発明は、生理活性分子の *i n v i v o* における免疫原性を低下させ、生物学的利用能を高め、持続時間を長引かせ、安定性を高め、バーストを低減し、そして制御された持続的放出を行わせるという長所を提供するものである。10

【 0 0 1 1 】

発明の詳細な説明

I . 生理活性分子

ここで用いる「生理活性分子」という用語は、ヒト又は他の哺乳動物などの対象に投与するためのあらゆる治療タンパク質、ペプチド、多糖、核酸又は他の生物学的に活性な化合物を言う。本発明に用いるのに適した治療タンパク質には、限定はしないが、インターフェロン - アルファ、インターフェロン - ベータ、インターフェロン - ガンマ、エリスロポエチン、顆粒球コロニ刺激因子、顆粒球マクロファージコロニ刺激因子 (G M - C S F)、インターロイキン 1、インターロイキン 2、インターロイキン 3、インターロイキン 12、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ 及びインシュリンが含まれる。20

【 0 0 1 2 】

適した治療ペプチドには、さらに、ホルモン、例えば A C T H、グルカゴン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、チモシン、副甲状腺ホルモン、色素性ホルモン、ソマトメジン、黄体形成ホルモン、総毛性性腺刺激ホルモン、視床下部放出因子、抗利尿ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、エンドルフィン、エンケファリン、ビファリン及びプロラクチンが含まれる。

【 0 0 1 3 】

更なる適した治療タンパク質には、モノクローナル及びポリクローナル抗体、一本鎖抗体、他の抗体フラグメント、類似体及び誘導体が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマ及び治療遺伝子を含む治療的ポリヌクレオチドも、本発明の方法及び組成物を用いて送達できる。30

【 0 0 1 4 】

ヘパリン及び低分子量ヘパリンなどの抗凝固性治療薬も、本発明の方法及び組成物を用いて送達できる。本発明で用いるのに適した他の治療タンパク質には、小型生理活性分子、例えば抗癌剤、例えばパクリタキセル、タキソテール、ドキソルビシン及びダウノルビシン、ビンクリスチン、シスプラチニン、カルボプラチニン、カンプトテシン及びカンプトテシン類似体、抗生物質、抗精神病薬、抗うつ剤、糖尿病及び心血管疾患用の小分子薬物、が含まれる。40

【 0 0 1 5 】

I I . 親水性ポリマへの生理活性分子の結合

用語「親水性ポリマ」とは、限定はしないが、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコール及び類似の直線状及び分枝状ポリマを含め、あらゆる水溶性の直線状及び分枝状ポリマを言う。好ましくは、当該ポリマの分子量は約 5 0 0 ダルトン乃至約 5 0 , 0 0 0 ダルトンの範囲であるとよい。本発明で用いる親水性ポリマは、典型的には、目的の生理活性分子にアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、リン酸基又は水酸基の官能性を介して結合するよう加えられた反応基を有する。

【 0 0 1 6 】

ポリエチレングリコールなど、本発明で用いる親水性ポリマは標準的なプロトコルに従つ50

て調製でき、一端をメトキシ基でキャップをし、他端を、生理活性分子上の活性基に容易に結合するよう活性化させる。例えば、米国特許第6,113,906号は、コハク酸又はカルバミン酸スクシンアミジル反応基をポリエチレングリコールに用いて、タンパク質のアミン基に反応させることを解説している。米国特許第5,446,090号は、ポリエチレングリコールのスルホン誘導体を用いて、タンパク質のスルフヒドリル基との安定な結合を形成することを解説している。米国特許第5,880,255号は、トレシル誘導体を用いてタンパク質のアミン基に反応させて、簡単で安定な二番目のアミン結合を形成することを解説している。これらの特許の内容全体を、引用をもってここに援用することとする。N-ヒドロキシスクシンアミドも、反応基として取り入れてよい。

【0017】

10

I I I . ポリマを結合させた生理活性分子のための制御放出製剤

用語「制御放出」とは、生理活性分子が本発明の薬物送達製剤で送達されるときの速度及び／又は量の制御を言う。ここで制御放出は連続的でも、非連続的でもよく、及び／又は、線形でも、非線形でもよい。これは、所望の効果を得るために、一種類以上のポリマ組成物や装薬を用いたり、賦形剤又は分解促進剤を含有させたり、又は他の修飾物質を単独もしくは組合せもしくは連続的に投与して用いて達成できる。

【0018】

ゼロ次又は線形の放出とは、ある時間にわたって放出される生理活性分子の量が、所望の時間枠の間の量／単位時間の関数として相対的に一定のままであることを意味すると、一般には解釈されている。多相とは、放出が二回以上の「バースト」で起きることを意味すると、一般には解釈されている。

【0019】

A .マイクロ粒子

ある実施態様では、本発明は、ポリマを結合させた生理活性分子の制御放出のために、生分解性マイクロ粒子を利用する。ここで用いる「マイクロ粒子」とは、好ましくは1.0mm未満、そしてより好ましくは1.0乃至100.0ミクロンの直径を有する粒子を言う。マイクロ粒子には、典型的には固体の球形のマイクロ粒子であるマイクロスフィアが含まれる。またマイクロ粒子には、典型的には異なるポリマ、薬物、又は組成のコアを有する球形のマイクロ粒子であるマイクロカプセルも含まれる。

【0020】

30

本発明で用いるマイクロ粒子は、当業で公知のように、制御放出製剤に用いられる多種の生分解性ポリマを用いて作製できる。適したポリマには、限定はしないが、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びこれらのコポリマを含むポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ無水物、ポリオルトエステル、及びいくつかの種類のタンパク質及び多糖ポリマが含まれる。ここで用いる用語「生体分解性」又は「生分解性」とは、約6～8のpHと、約25～38の温度の生理溶液に暴露したときに、所望の用途(通常はin vivo治療法)で許容できる期間内、典型的には約5年未満、そしてより好ましくは約1年未満、で、溶解又は分解するポリマを言う。

【0021】

好適なポリマには、身体の水性環境に暴露後に加水分解により分解するポリ(ヒドロキシ酸)、特に(ポリ(乳酸-コ-グリコール酸))('PLGA')が含まれる。次にこのポリマは加水分解して乳酸及びグリコール酸単量体を生じるが、これらは細胞代謝で出る通常の副産物である。ポリマの崩壊速度は数週間から1年を越える期間まで、様々であり、ポリマの分子量、ポリマ鎖中のラクチド単量体対グリコリド単量体の比や、単量体サブユニットの立体規則性(L型及びD型立体異性体が混合していると、ポリマの結晶性が損なわれて、ポリマの分解を促進する)に左右される。マイクロスフィアは分子量及び／又は単量体比の異なる、二種又はそれ以上の生分解性ポリマの混合体を含んでいてよい。

【0022】

PLGA等々に結合させた親水性ポリマを含め、誘導体化させた生分解性ポリマも、本発明で用いるのに適する。特にマイクロスフィアを形成するには、当業で公知の多種の技術

40

50

を用いることができる。これらには、例えば、一回又は二回の乳濁ステップの後に溶媒を除去する方法が含まれる。溶媒の除去は、例えば抽出、蒸発又は噴霧乾燥により、行ってよい。

【0023】

溶媒抽出法では、水などの抽出溶媒に少なくとも部分的に可溶性の有機溶媒中にポリマを溶解させる。次に、可溶性の形か、又は微細粒子として分散させた形の生理活性分子をこのポリマ溶液に加え、この混合液を、ポリ(ビニルアルコール)などの界面活性剤を含有する水相中に分散させる。その結果得られた乳濁液を、より大きな体積の水に加えると、有機溶媒がポリマ/生理活性物質から除去されて、硬化したマイクロ粒子が形成される。

【0024】

溶媒蒸発法では、ポリマを揮発性の有機溶媒に溶解させる。次に、可溶性の形か、又は微細な粒子として分散させた形の生理活性分子をポリマ溶液に加え、この混合液を、ポリ(ビニルアルコール)などの界面活性剤を含有する水相に懸濁させる。その結果生じた乳濁液を、有機溶媒の大半が蒸発して固体のマイクロスフィアが残るまで、攪拌する。

【0025】

噴霧乾燥法では、塩化メチレン(例えば0.04g/ml)などの適した溶媒にポリマを溶解させる。次に、既知の量の生理活性分子(薬物)を、このポリマ溶液中に懸濁(不溶性の場合)させるか、又は同時溶解(可溶性の場合)させる。次に、この溶液又は分散液を噴霧乾燥させる。ポリマの選択に応じた形態を持つ、直径が1乃至10ミクロンのマイクロスフィアを得ることができる。

【0026】

相分離及びコアセルベーションや、上記の変更法など、他の公知の方法も当業で知られており、本発明に用いてよい。

【0027】

B. ナノ粒子

別の実施態様では、本発明は、ポリマを結合させた生理活性分子の制御放出用、特に経口投与用の生分解性ナノ粒子を利用する。ここで用いる用語「ナノ粒子」とは、好ましくは直径が約20.0ナノメートル乃至約2.0ミクロン、典型的には約100ナノメートル乃至1.0ミクロンの粒子を言う。

【0028】

ナノ粒子の製剤は、基本的にはマイクロ粒子に関して上述した通りに作製できるが、例外として、高速混合又は均質化を用いて、ポリマ/生理活性物質乳濁液の大きさを約2.0ミクロン未満、好ましくは約1.0ミクロン未満に低下させる。例えば、ナノ粒子を作製するのに適した技術はその開示全体を引用をもってここに援用することとするWO 97/04747号に解説されている。

【0029】

実施例

I. leu-エンケファリンを送達するための製剤の調製及び特徴付け

実施例1 - ポリエチレングリコール結合leu-エンケファリン(P E G - leu-エンケファリン)の調製

ポリエチレングリコールを共有結合させることで修飾されたleu-エンケファリンを以下のように調製した: 25mgのleu-エンケファリンを、50μLのTEAを含有する500μLの無水DMSO中に溶解させた。250mgのmPEG(5000)-SPAを1.5mLの無水DMSOに溶解させ、ペプチド溶液に直接注射して加えた。反応を2時間、室温で進ませるか、又は、ペプチドの90%を越えるものがそのPEG修飾型に転化するまで、進ませた。反応物から生成物であるmPEG(5000)-leu-エンケファリンを、EtOHからの再結晶化(2×)で分離した。反応生成物は白色の固体であり、その95%を越えるものがPEG化していた(RP-HPLCによる評価)。

【0030】

実施例2 - leu-エンケファリンを含有する通常の(w₁/o/w₂)マイクロ粒

10

20

30

40

50

子の調製及び特徴付け

l e u - エンケファリンを含有する通常の ($w_1 / o / w_2$) マイクロ粒子を以下のように調製した： l e u - エンケファリンを 1 : 9 の D M S O : P B S 混合液に溶解させて、最終濃度を 35 mg / mL (その P B S 中の最大溶解度)とした。 P L G A (50 : 50 ラクチド：グリコリド；酸性の末端基；固有粘度 0.16 L / g) を塩化メチレンに溶解させて、最終濃度を 200 mg / mL にした。 200 μL のこのペプチド溶液を 3 mL のポリマ溶液と 10,000 rpm で 3 分間均質化させて、一次 (w/o) 乳濁液を作製した。この一次乳濁液を 100 mL の 0.5% P V A 溶液に注ぎ入れ、750 rpm で 3 乃至 6 時間、攪拌した。溶媒が蒸発してマイクロ粒子が硬化したところで、それらを濾過で採集して真空で乾燥してから解析した。その粒子を、コア装薬量 (C L)、封入効率 (E E)、粒子の大きさ (P S)、及びそれらの内容物の初期放出 (I R) について、以下のように特徴付けた。表 1 はその結果を示す。

10

20

30

30

【0031】

マイクロスフィアのコア装薬量の測定は、10 mg のマイクロスフィアを 50% アセトニトリルに溶解させた後に遠心分離して、不溶性のポリマをペレットにして行った。アリコートを R P - H P L C で解析し、50% アセトニトリル中に調製した代表的な標準に比較した。マイクロスフィアからの最初の内容物放出は、20 mg の試料を、0.02% の T w e e n 20 及び 25% E t O H を含有する 2 mL の P B S (50 mM、pH 7.2) 中に懸濁させて測定した。この懸濁液をボルテックスし、37°でインキュベートした。1 時間後、数アリコートを取り出し、濾過し、放出された量を R P - H P L C で解析した。1 時間目の時点でのこのような促進された放出は、E t O H を加えない P B S 中に 1 日後に放出された活性分子の量と、良好な相関関係にあることが示された。

20

30

【0032】

実施例 3 - P E G - l e u - エンケファリン結合体を含有する通常の ($w_1 / o / w_2$) マイクロ粒子の調製及び特徴付け

P E G - l e u - エンケファリンを含有する通常の $w_1 / o / w_2$ マイクロ粒子を以下のように調製した： P E G - l e u - エンケファリンを 1 : 9 D M S O : P B S 混合液に溶解させて、最終濃度を 50 mg / mL とした。 P L G A (50 : 50 ラクチド：グリコリド；酸性の末端基；固有粘度 0.16 L / g) を塩化メチレンに溶解させて、最終濃度を 200 mg / mL とした。 200 μL のペプチド溶液を 3 mL のポリマ溶液と 10,000 rpm で 3 分間均質化させて、一次 (w/o) 乳濁液を作製した。この一次乳濁液を 100 mL の 0.5% P V A 溶液に注ぎ入れ、750 rpm で 3 乃至 6 時間、攪拌した。溶媒が蒸発してマイクロ粒子が硬化したところで、それらを濾過で採集して真空乾燥してから解析した。その粒子を、コア装薬量 (C L)、封入効率 (E E)、粒子の大きさ (P S)、及びそれらの内容物の初期放出 (I R) について、実施例 2 で解説したように特徴付けた。これらのデータを表 1 に示す。

30

40

40

【0033】

実施例 4 - l e u - エンケファリンを含有する単相マイクロ粒子の調製及び特徴付け
未修飾の l e u - エンケファリンを含有する単相マイクロ粒子を以下のように調製した：
10 mg の l e u - エンケファリンを、30 μL の T F A を含有する 1 mL の塩化メチレンに溶解させた。次に、90 mg の P L G A (50 : 50 ラクチド：グリコリド；ラウリル末端基；固有粘度 0.61 L / g) を有機ペプチド溶液に溶解させた。この溶液を 2.5 mL の 2.5% P V A と一緒に 3 分間ボルテックスして、一次 (o/w) 乳濁液を形成した。強制換気 (15 分間) 及び攪拌 (6 乃至 8 時間) を用いて、溶媒を蒸発させ、マイクロ粒子を硬化させた。硬化後、濾過でマイクロ粒子を採集し、真空乾燥してから解析した。コア装薬量 (C L)、封入効率 (E E)、粒子の大きさ (P S)、及び内容物の初期放出 (I R) に関するデータを表 1 に示す。

50

50

【0034】

実施例 5 - P E G - l e u - エンケファリン結合体を含有する単相マイクロ粒子の調製及び特徴付け

PEG-leu-エンケファリンを含有する単相マイクロ粒子を以下のように調製した：50mgのPEG-leu-エンケファリン及び150mgのPLGA(50:50ラクチド:グリコリド;ラウリル末端基;固有粘度0.61L/g)を2mLの塩化メチレンに溶解させた。有機ペプチド/ポリマの溶液を5mLの2.5%PVAと一緒に3分間、ボルテックスして、一次(o/w)乳濁液を形成した。攪拌/真空蒸発を2時間行って有機溶媒をマイクロ粒子から取り除いた。マイクロ粒子の硬化後、濾過でそれらを採集し、真空乾燥させてから解析した。コア装薬量(CL)、封入効率(EE)、粒子の大きさ(PS)、及び内容物の初期放出(IR)に関するデータを表1に示す。

【0035】

実施例6 - PEG化leu-エンケファリンの装薬量増加

10

表1のデータは、PEG5000をleu-エンケファリンに共有結合させると、実現可能な装薬量(CL)が、二相乳濁技術の場合には0.07%から0.36%に、そして単相法の場合には0.3%から3.95%に増加することを示す。さらにPEG化の結果、二つの方法で封入効率が大きく向上した。初期放出(「バースト」)は、単相で作製した非PEG化ペプチドに比べ、PEG化した方が僅かに少なく(より好ましく)、コア装薬量もPEG化ペプチドの方が10倍を越えて多かった。コア装薬量を多くできることにより、所望の薬物用量を達成するのに患者に投与せねばならない生分解性薬物送達系の用量を少なくすることができます。

【0036】

【表1】

20

表1. leu-エンケファリン及びPEG-leu-エンケファリンマイクロ粒子の特徴

leu-エンケファリン		PEG-Leu-エンケファリン	
二重乳濁法	単相	二重乳濁法	単相
TL (%) ^a	1.64	10	1.64
CL (%)	0.07	0.3	0.36
EE (%)	4.43	3.04	17
PS (mm)	50-250	20-100	50-200
IR (%)	47.1	22.5	ND
			20.8

【0037】

30

a 理論装薬量(活性分子の重量/活性分子及びポリマの総重量)

CL コア装薬量(分離時のマイクロ粒子中の活性分子の重量%)

EE 封入効率(加工時に封入される活性分子の%)

PS 平均粒子サイズ(SEMから推定されたもの)

IR 0.02%Tween20及び25%EtOHを含有する37のPBS(50mM、pH7.2)中のin vitro溶解液からの1時間目の時点での初期放出

ND 検出不能

【0038】

II. ビファリンを送達するための製剤の調製、特徴付け及び投与

実施例7 - PEG化ビファリンの装薬量増加及びバースト低下

40

ビファリンは哺乳動物で鎮痛活性を持つ合成ペプチドである。それに二本のPEG200鎖を結合させると、非PEG化ペプチドに比べて、静脈内投与後の鎮痛作用が長引く。ビファリン及びPEG化ビファリンを、以下の例で解説するように、PLGAマイクロスフィア封入におけるそれらの挙動について比較した。表2に示すように、PEG化ビファリンは、非PEG化ペプチドに比べて、高いコア装薬量、高い封入効率、及び低い初期放出レベル(バースト)を有する。

【0039】

実施例8 - ビファリンを含有する通常の(w₁/o/w₂)マイクロ粒子の調製及び特徴付けPEG-ビファリンを含有する通常のw₁/o/w₂マイクロ粒子を以下のように調製

50

した：ビファリンを3元P B S : D M S O : 酢酸（5 : 1 : 1 . 5）混合液に溶解させて最終濃度を35 mg / mLとした。P L G A（50 : 50 ラクチド：グリコリド；酸性末端基；固有粘度0 . 16 L / g）を塩化メチレンに溶解させて最終濃度を200 mg / mLとした。200 μLのペプチド溶液を3 mLのポリマー溶液に10,000 rpmで3分間、均質化させて一次(w / o)乳濁液を作製した。この一次乳濁液を100 mLの0 . 5% P V A溶液に注ぎ入れて、750 rpmで3時間、攪拌した。溶媒が蒸発し、マイクロ粒子が硬化した後、これらを水で洗浄し、濾過で採集し、真空乾燥させてから解析した。コア装薬量(C L)、封入効率(E E)、粒子の大きさ(P S)、及び内容物の初期放出(I R)に関するデータを表2に示す。

【0040】

10

実施例9 - P E G - ビファリン結合体を含有する通常の(w₁ / o / w₂)マイクロ粒子の調製及び特徴付け

P E G - ビファリンを含有する通常のw₁ / o / w₂マイクロ粒子を以下のように調製した：P E G - ビファリンをP B Sに溶解させて最終濃度を50 mg / mLとした。P L G A（50 : 50 ラクチド：グリコリド；酸性末端基；固有粘度0 . 16 L / g）を塩化メチレンに溶解させて最終濃度を200 mg / mLとした。200 μLのペプチド溶液を3 mLのポリマー溶液に10,000 rpmで3分間、均質化させて一次(w / o)乳濁液を作製した。この一次乳濁液を100 mLの0 . 5% P V A溶液に注ぎ入れて、750 rpmで3時間、攪拌した。溶媒が蒸発し、マイクロ粒子が硬化した後、これらを水で洗浄し、濾過で採集し、真空乾燥させてから解析した。コア装薬量(C L)、封入効率(E E)、粒子の大きさ(P S)、及び内容物の初期放出(I R)に関するデータを表2に示す。

20

【0041】

実施例10 - ビファリンを含有する単相マイクロ粒子の調製及び特徴付け

修飾されていないビファリンを含有する単相マイクロ粒子を以下のように調製した：20 mgのビファリン及び180 mgのP L G A（50 : 50 ラクチド：グリコリド；ラウリル末端基；固有粘度0 . 61 L / g）を2 mLの1 : 3 醋酸：塩化メチレン混合液に溶解させた。この油相を5 mLの1% P V Aと一緒に3分間、ボルテックスして、一次乳濁液を作製した。この一次o / w乳濁液を4時間、攪拌しながら真空乾燥させて、有機溶媒を取り除いた。溶媒除去後、硬化したマイクロ粒子を濾過で採集し、蒸留脱イオン水で数回洗浄して、非特異的に結合したP V A又はビファリンを取り除いた。最後に、このマイクロ粒子を真空乾燥させてから解析した。コア装薬量(C L)、封入効率(E E)、粒子の大きさ(P S)、及び内容物の初期放出(I R)に関するデータを表2に示す。

30

【0042】

実施例11 - P E G - ビファリン結合体を含有する単相マイクロ粒子の調製及び特徴付け

P E G - ビファリンを含有する単相マイクロ粒子を以下のように調製した：180 mgのP L G A（50 : 50 ラクチド：グリコリド；ラウリル末端基；固有粘度0 . 61 L / g）及び20 mgのP E G - ビファリンを2 mLの塩化メチレンに溶解させた。ポリマ/ペプチド溶液を5 mLの2 . 5%ポリビニルアルコール(P V A、80 - 85 %加水分解済み)と一緒に3分間、ボルテックスして、一次乳濁液を作製した。この一次乳濁液(o / w)を4時間、攪拌しながら吸引蒸発させて、有機溶媒を取り除いた。硬化したマイクロ粒子を濾過で採集し、蒸留水で数回洗浄して、非特異的に結合したP V A又はP E G - ビファリンを取り除いた。最後に、このマイクロ粒子を真空乾燥させてから解析した。コア装薬量(C L)、封入効率(E E)、粒子の大きさ(P S)、及び内容物の初期放出(I R)に関するデータを表2に示す。

40

【0043】

実施例12 - 生分解性マイクロスフィアに入れたP E G化ビファリンの投与後の哺乳動物における鎮痛効果

50

本発明に基づいて投与されたビファリンの *in vivo* での向上した送達を評価するためには、比較研究を以下のように行うことができる。PEG化ビファリン PLGAマイクロスフィアは、実施例9で解説したように二重乳濁法で調製できる。このマイクロスフィアを、0.5%Tween20を加えた媒質カルボキシメチルセルロース(0.5%)水溶液に懸濁させる。次に、有効量をスプラーグ・ドーリー・ラットに皮下投与して、テイル・フリックアッセイなどで鎮痛効果を測定する。マイクロスフィアに封入されたPEG-ビファリンの有する鎮痛効果は、封入されていないPEG-ビファリン・コントロール注射のそれよりも長時間、続く。この実験を、実施例11の単相法で調製したPLGA封入PEG-ビファリンで繰り返しても、同様な結果を得ることができる。

【0044】

10

【表2】

表2. ビファリン及びPEG-ビファリンマイクロ粒子の特徴

ビファリン		PEG-ビファリン	
二重乳濁法	単相	二重乳濁法	単相
TL (%) ^a	1	10	1.64
CL (%)	0.24	0.36	1.48
EE (%)	14.28	3.64	90.52
PS (mm)	50-250	20-100	20-200
IR (%)	ND	49.4	19
			15.6

20

【0045】

a 理論装薬量(活性分子の重量 / 活性分子及びポリマの総重量)

C L コア装薬量(分離時のマイクロ粒子中の活性分子の重量 %)

E E 封入効率(加工時に封入される活性分子の %)

P S 平均粒子サイズ(S EMから推定されたもの)

I R 0.02%Tween20及び25%EtOHを含有する37のPBS(50mM、pH7.2)中の*in vitro*溶解液からの1時間目の時点での初期放出

N D 検出不能

【0046】

30

III. インシュリンを送達するための製剤の調製、特徴付け及び投与

実施例13 - ポリエチレングリコール結合ヒトインシュリン(PEG-インシュリン)の調製

ヒトインシュリンをポリエチレングリコールに共有結合させる修飾を以下のように行った：116mgの組換えヒトインシュリンを、200μLのTEAを含有する4mLの無水DMSOに溶解させた。1gのmPEG(5000)-SPAを10mLの無水DMSOに溶解させ、前記のインシュリン溶液に直接注射して加えた。この反応は、一晩(6乃至10時間)、室温で続けさせるか、又は、当該タンパク質の90%を越えるものがPEG化するまで続けさせた。未反応のPEG及びPEG化インシュリンは、Et₂O(×2)で沈殿させて分離した。その最終生成物は、顆粒状の白色の固体であり、その95%を越えるものが(RP-HPLC解析によると)PEG化していた。

【0047】

40

実施例14 ヒトインシュリンを含有する通常の(w₁/o/w₂)マイクロ粒子の調製及び特徴付け

ヒトインシュリンを含有する通常の(w₁/o/w₂)マイクロ粒子を以下のように調製した：組換えヒトインシュリンをDMSO:0.1N HCl(1:1)に溶解させて最終濃度を50mg/mLとし、PLGA(50:50ラクチド：グリコリド；ラウリル末端基；固有粘度0.61L/g)を塩化メチレンに溶解させて、最終濃度を200mg/mLとした。200μLの当該タンパク質溶液及び3mLのポリマ溶液を10,000rpmで3分間、均質化させて一次(w/o)乳濁液を形成した。次に、この一次乳濁液を100mLの0.5%PVAに加えて、真空下で3乃至6時間、攪拌し

50

た。有機溶媒を除去後、マイクロ粒子を濾過し、水で数回洗浄し、真空乾燥させてから解析した。表3はこのマイクロ粒子の特徴を挙げる。

【0048】

実施例15 - PEG-インシュリン結合体を含有する通常の($w_1 / o / w_2$)マイクロ粒子の調製及び特徴付け

PEG-インシュリンを含有する通常の $w_1 / o / w_2$ マイクロ粒子を以下のように調製した: PEG-インシュリンをDMSO:H₂O(1:2)混合液に最終濃度50mg/mLになるように溶解させ、PLGA(50:50ラクチド:グリコリド;ラウリル末端基;固有粘度0.61L/g)を塩化メチレンに溶解させて、最終濃度を200mg/mLとした。200μLの当該タンパク質溶液及び3mLのポリマ溶液を10,000rpmで3分間、均質化させて一次(w/o)乳濁液を形成した。次に、この一次乳濁液を100mLの0.5%PVAに加えて、真空下で3乃至6時間、攪拌した。有機溶媒を除去後、マイクロ粒子を濾過し、水で数回洗浄し、真空乾燥させてから解析した。表3はこのマイクロ粒子の解析結果を挙げる。

【0049】

実施例16 - ヒトインシュリンを含有する単相マイクロ粒子の調製及び特徴付け

ヒトインシュリンを含有する単相マイクロ粒子を以下のように調製した: 20mgの組換えヒトインシュリン(Zn^{2+} -インシュリン塩)を2mLの酢酸:塩化メチレン(1.4:1)混合液に溶解させた。次に180mgのPLGA(50:50ラクチド:グリコリド;ラウリル末端基;固有粘度0.61L/g)をこの有機ペプチド溶液に溶解させた。この有機ペプチド/ポリマ溶液を5mLの1%PVAと一緒に3分間、ボルテックスして、一次乳濁液を作製した。攪拌しながら2時間、真空乾燥させてこの有機溶媒を取り除いた。一部硬化したマイクロ粒子を100mLの水を含有するビーカに加え、さらに2時間、攪拌して、全ての有機溶媒を完全に除去した。マイクロ粒子を濾過で採集し、水で数回洗浄して、真空乾燥してから解析した。表3は、このマイクロ粒子の解析結果を挙げる。

【0050】

実施例17 - PEG-インシュリン結合体を含有する単相マイクロ粒子の調製及び特徴付け

PEG-インシュリンを含有する単相マイクロ粒子を以下のように調製した: 63mgのPEG-インシュリン及び137mgのPLGA(50:50ラクチド:グリコリド;ラウリル末端基;固有粘度0.61L/g)を2mLの塩化メチレンに溶解させた。この油相を5mLの1%PVAと一緒に3分間、ボルテックスして、一次乳濁液を形成した。2時間真空蒸発させた後、周囲条件下で1時間攪拌して、溶媒を除去した。硬化したマイクロ粒子を濾過で採集し、水で数回洗浄してから 真空乾燥し、解析した。表3はこのマイクロ粒子の解析結果を挙げる。

【0051】

実施例18 - PEG化インシュリンの装薬量及び封入効率の上昇

表3のデータは、PEG化インシュリンにより、単相及び二重乳濁法の両方で調製したPLGAマイクロスフィア中に、より多くの装薬が可能であることを示す。さらにPEG化インシュリンは、価値の高い生物学的活性ペプチド及びタンパク質を用いるときの大きな長所である、高い封入効率を有する。

【0052】

【表3】

表3. インシュリン及びPEG-インシュリンマイクロ粒子の特徴

インシュリン		PEG-インシュリン	
二重乳濁法	単相	二重乳濁法	単相
TL (%) ^a	1.64	10	1.64
CL (%)	0.23	0.6	0.54
EE (%)	13.86	6	33
PS (mm)	100-350	30-100	50-250
			50-100

【0053】

a 理論装薬量（活性分子の重量 / 活性分子及びポリマの総重量）

C L コア装薬量（分離時のマイクロ粒子中の活性分子の重量 %）

E E 封入効率（加工時に封入される活性分子の %）

P S 平均粒子サイズ（SEMから推定されたもの）

【0054】

実施例19 - P L G Aに封入されたP E G - インシュリンの血糖降下作用

P E G - インシュリン P L G Aマイクロスフィア及び当量の遊離インシュリンを正常なラットに皮下投与した。血液を定期的に抜き取り、血液凝固を阻止した。血糖値を標準的テストで測定した。表4に示すように、P L G Aマイクロスフィアに入れたP E G - インシュリンを用いると、未修飾のインシュリンで観察される値に比べ、初期血糖低下が有意に抑制された。さらに、これらのデータは、重要なことに、P E G - インシュリン・マイクロスフィア製剤は、その薬物を生物学的に活性な形で放出し、修飾していない通常の製剤で起きる「バースト」効果もなく、in vivo動物モデルで血糖値を効果的に抑制できたことを示している。

【0055】

【表4】

表4. インシュリン及びPEG-インシュリンマイクロ粒子の In Vivo 研究

時間(hr)	インシュリン(ヒューマリン-U)		PEG-インシュリン	
	%BGLa	SD	%BGLa	SD
0	100	0	100	0
1	25.8	6.6	111.1	16
2	14.9	11.4	86.5	17.6
4	68.1	11.6	97	13.3
6	89.3	7	98.5	12.1
8	75	1.7	82	6.8
12	75.8	8.2	88.8	6.6

【0056】

a % B G L は、提示した血糖値は、基礎値のパーセンテージに対して正規化してあることを示す。

【0057】

I V . G M - C S F を送達するための製剤の調製及び特徴付け

実施例20 - ポリエチレングリコールを結合させたG M - C S F の調製

G M - C S F をポリエチレングリコール(P E G)に以下のように共有結合させることができる：1 0 0 m g のG M - C S F を1 0 m l のp H 7 . 5 のリン酸緩衝液に室温で溶解させる。次に、1 0 0 m g のトレシル - モノメトキシ - ポリエチレングリコール(分子量 = 5 0 0 0 ダルトン)を加え、この混合液を1時間、攪拌する。未反応のG M - C S F画分とP E G化したG M - C S F画分を、未反応のトレシル - モノメトキシ - ポリエチレングリコールからゲル・クロマトグラフィで分離する。次に、P E G化G M - C S Fを1 0 0 m Mのトリス緩衝液中に透析して濃度を5 0 m g / m l に調節する。

【0058】

10

20

30

40

50

実施例 21 - PEG化GM-CSFを封入したマイクロ粒子の調製

PEG化GM-CSFを封入したマイクロ粒子は以下のように調製できる：6.0 g m のPLGA（50:50 ラクチド:グリコリド；固有粘度0.351/g）を20 m l の酢酸エチルに溶解させる。実施例20の1 m l のPEG化GM-CSFを加え、ホモジナイザで10,000 r p m で高速で攪拌して、油中水乳濁液を作製する。次に、ポリマ／薬物／酢酸エチル乳濁液を1%ポリビニルアルコール（PVA）を含有する水のポンプ流と組み合わせて、固定ミキサでポンプする。この作用によりw/o/w乳濁液が生じ、この乳濁液を次に、1リットルの5°C水に攪拌しながら加えた。2時間後、PEG化GM-CSFを含有する硬化したPLGAマイクロスフィアを25ミクロンのふるいで採集して乾燥させる。その結果得られるマイクロスフィアの大きさは、25乃至200 μ mの範囲であろう。

【0059】**実施例 22 - PEG化GM-CSFを封入したナノ粒子の調製**

PEG化GM-CSFを封入したナノ粒子は以下のように調製できる：3.0 g m のPLGA（実施例21と同じ材料）を5 m l のジクロロメタン及び5 m l のアセトンに溶解させる。実施例20のPEG化GM-CSFを0.5 m l 、加え、この混合液をホモジナイザで10,000 r p m で攪拌する。この混合液を5%PVAを含有する200 m l の水に加える。次にこの混合液を15,000 r p m で、直径約1.0ミクロン未満のナノ粒子が形成されるのに必要な時間、均質化させる。有機溶媒を真空で取り除き、ナノスフィアを水から回収して乾燥させることができる。

10
20**【0060】****等価物**

当業者であれば、日常的な実験によって、ここに解説した本発明の具体的な実施態様の等価物を数多く、認識し、又は確認できることであろう。このような等価物は以下の請求の範囲の包含するところと、意図されている。加えて、ここに引用した全特許及び公開文献の内容全体を、引用をもってここに援用することとする。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/36169 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 47/48 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/45154
- (22) International Filing Date: 31 October 2001 (31.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/244,499 31 October 2000 (31.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PR PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 1512 Webster Court, Fort Collins, CO 80524 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): LEWIS, Danny [US/US]; 383 Wynn-Wallace Road, Hartelle, AL 35640 (US), SCHMIDT, Paul [US/US]; 8678 Niwot Road, Niwot, CO 80503 (US), HINDS, Kenneth [US/US]; 1112 onticelo Court, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (74) Agents: REMILLARD, Jane, E. et al.; Lahive & Cockfield, LLP, 28 State Street, Boston, MA 02109 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/36169 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR ENHANCED DELIVERY OF BIOACTIVE MOLECULES

(57) Abstract: Formulations for controlled, prolonged release of bioactive molecules such as therapeutic proteins, peptides and oligonucleotides have been developed. These formulations are based on solid microparticles or nanoparticles formed of the combination of biodegradable, synthetic polymers such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), and copolymers thereof. Bioactive molecules are coupled to hydrophilic polymers such as polyethylene glycol or polypropylene glycol and formulated to provide controlled release. The bioactive molecules are more stable, less immunogenic and have improved release rate profiles with lower burst levels and increased drug loading relative to the same bioactive molecules lacking coupled hydrophilic polymers. The controlled release formulations can be administered by injection, by inhalation, nasally, or orally.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR ENHANCED DELIVERY
OF BIOACTIVE MOLECULES**

5 **Related Applications**

This application claims priority to U.S. Provisional Application Number 60/244,499 entitled "Methods and Compositions for Enhanced Delivery of Bioactive Molecules" filed on October 31, 2000, the contents of which are incorporated herein by reference.

10

Background of the Invention

Encapsulation of pharmaceuticals in biodegradable polymer microspheres and nanospheres can prolong the maintenance of therapeutic drug levels relative to administration of the drug itself. Sustained release may be extended up to several months depending on the formulation and the active molecule encapsulated. However many bioactive molecules, and especially proteins, are damaged or made unstable by the procedures required to encapsulate them in the polymeric carriers. Furthermore, the charged, polar nature of many proteins may limit the extent of encapsulation in polymer drug carriers and may lead to rapid loss of a fraction of the encapsulated bioactive molecule when first administered ("burst").

Encapsulation of bioactive molecules in biodegradable polymer delivery systems has been used to stimulate an immune response when administered to a patient (see U.S. Pat. No. 5,942,253 to Gombotz et al.). While this is a desired result in certain cases, it is undesirable when the purpose is delivery of the bioactive molecule for therapeutic purposes. Thus, diminished recognition by the immune system of bioactive molecules delivered using biodegradable polymers would be beneficial in a therapeutic setting.

Bioactive molecules, especially therapeutic proteins (drugs), may be modified with hydrophilic polymers (a process generally known as "pegylation"), such as polyethylene glycol, covalently attached to one or more amino acid side chains (see e.g., U.S Pat. No. 4,179,337 to Davis et al.; U.S pat. No. 5,446,090 to Harris; U.S. Pat. No. 5,880,255 to Delgado et al.). While it is known in the art that such attachment may lead to an apparent increase in molecular mass and decreased blood clearance rate for the modified therapeutic protein (see e.g., U.S. Pat. No. 5,320,840

WO 02/36169

PCT/US01/45154

to Camble et al.), the prior art does not teach that diminished immunogenicity can be achieved or that the duration of release from biodegradable polymer drug delivery systems can be extended using pegylated proteins. The prior art does not teach that pegylation can increase the drug loading achievable in a biodegradable drug delivery system relative to the unpegylated drug, nor does it teach that reduced burst of drug is achievable for the pegylated moiety relative to the unpegylated drug.

Summary of the Invention

The present invention provides novel formulations for controlled, prolonged release of bioactive molecules such as therapeutic proteins, peptides and oligonucleotides. The formulations are based on microparticles or nanoparticles formed of the combination of biodegradable, polymers such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), and copolymers thereof. Bioactive molecules are coupled to hydrophilic polymers such as polyethylene glycol or polypropylene glycol and then formulated with the solid microparticles or nanoparticles to provide controlled release. The controlled release formulations can be administered by injection, by inhalation, nasally, or orally.

Accordingly, as part of the present invention, it has been discovered that attachment of hydrophilic polymers to bioactive molecules, such as drugs and therapeutic proteins, has several beneficial effects, including providing protection from degradation and denaturation under the conditions of encapsulation in drug carriers. Additionally the amount of modified protein that can be encapsulated is increased relative to the unmodified protein, thus providing a lower total dose of material, benefiting both the patient and producer.

In addition, the present invention is further based on the discovery that immunogenicity of pegylated bioactive molecules encapsulated in biodegradable polymer drug delivery carriers is decreased relative to non-pegylated bioactive molecules in the carriers, particularly when administered by subcutaneous or intramuscular injection or inhalation or mucosal delivery (e.g., oral or nasal delivery). Such diminished immunogenicity is particularly advantageous when biodegradable polymers are used for oral delivery, since this is a typical method for mucosal vaccination.

In another aspect, the present invention is based on the discovery that pegylated proteins, peptides, oligosaccharides and oligonucleotides, which normally

WO 02/36169

PCT/US01/45154

are not absorbed from the gastro-intestinal tract, are made bioavailable by administration in biodegradable polymer systems, particularly nanospheres. The term "bioavailable", as used herein, refers to the fraction of bioactive molecule that enters the blood stream following administration to a subject. The controlled release 5 formulations of the invention increase the bioavailability of bioactive molecules and, in particular, the nanosphere formulations described herein when administered orally. For example, blood levels can be maintained for up to several days following a single oral administration of nanosphere encapsulated pegylated bioactive molecule. Additionally the polyethylene glycol chains protect the bioactive molecules from 10 degradation and denaturation in the process of forming the nanospheres, contribute to increased entrapment of active material, and diminish the "burst" effect.

Thus, in a preferred embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition for controlled, sustained release and increased bioavailability of a bioactive molecule, which includes a polymer (e.g., PEG) conjugated therapeutic 15 agent encapsulated into nanospheres. In a particularly preferred embodiment, the composition is administered orally.

In a preferred embodiment, the bioactive molecule is selected from the group consisting of α -interferon, β -interferon, γ -interferon, erythropoietins, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor, 20 interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 12, asparaginase, adenosine deaminase, insulin, ACTH, glucagon, somatostatin, somatotropin, thymosin, parathyroid hormone, pigmentary hormones, somatomedin, leuteinizing hormone, chorionic gonadotropin, hypothalamic releasing factors, anti-diuretic hormones, thyroid stimulating hormone, endorphins, enkephalins, biphalin, prolactin, monoclonal 25 antibodies, polyclonal antibodies, antisense oligonucleotides, aptamers, therapeutic genes, heparin, low molecular weight heparin and small bioactive molecules.

Accordingly, the compositions of the present invention can be used to improve 30 *in vivo* delivery of therapeutic bioactive molecules in several respects. In particular, the invention provides the advantages of reduced immunogenicity, increased bioavailability, increased duration, increased stability, decreased burst and controlled, sustained release of bioactive molecules *in vivo*.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

Detailed Description of the Invention**I. Bioactive Molecules**

The term "bioactive molecule", as used herein, refers to any therapeutic protein, peptide, polysaccharide, nucleic acid or other biologically active compound for administration to a subject, such as a human or other mammal. Suitable therapeutic proteins for use in the invention include, but are not limited to, interferon-alphas, interferon-betas, interferon-gamma, erythropoetins, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 12, asparaginase, adenosine deaminase and insulin.

Suitable therapeutic peptides also include hormones, such as ACTH, glucagon, somatostatin, somatotropin, thymosin, parathyroid hormone, pigmentary hormones, somatomedin, luteinizing hormone, chorionic gonadotropin, hypothalmic releasing factors, antidiuretic hormones, thyroid stimulating hormone, endorphins, enkephalins, biphalin and prolactin.

Additional suitable therapeutic proteins include monoclonal and polyclonal antibodies, single-chain antibodies, other antibody fragments, analogs and derivatives. Therapeutic polynucleotides, including antisense oligonucleotides, aptamers and therapeutic genes also can be delivered using the methods and compositions of the invention.

Anticoagulant therapeutics, such as heparin and low molecular weight heparin, also can be delivered using the methods and compositions of the invention. Other suitable therapeutic proteins for the use in the invention include small bioactive molecules, such as anticancer drugs, e.g., paclitaxel, taxotere, doxorubicin and daunorubicin, vincristine, cisplatin, carboplatin, camptothecin and camptothecin analogs, antibiotics, antipsychotics, antidepressants, small molecule drugs for diabetes and cardiovascular disease.

30 II. Conjugation of Bioactive Molecules to Hydrophilic Polymers

The term "hydrophilic polymer" refers to any water-soluble linear or branched polymer including, but not limited to, polyethylene glycol and polypropylene glycol and similar linear and branched polymers. Preferably, the molecular weight of the polymer ranges from about 500 daltons to about 50,000 daltons. Hydrophilic

WO 02/36169

PCT/US01/45154

polymers for use in the invention typically have a reactive group incorporated for attachment to the bioactive molecule of interest through amino, carboxyl, sulfhydryl, phosphate or hydroxyl functions.

Hydrophilic polymers used in the present invention, such as polyethylene glycol, can be prepared according to standard protocols with one end capped as with a methoxy group and the other end activated for facile conjugation to active groups on bioactive molecules. For example, U.S Patent No. 6,113,906 describes the use of succinimidyl succinate or carbamate reactive groups on the polyethylene glycol to react with amine groups on proteins. U.S Patent No. 5,446,090 describes the use of sulfone derivatives of polyethylene glycol to form stable bonds with sulfhydryl groups of proteins. U.S Patent No. 5,880,255 describes the use of tresyl derivatives for reaction at amine groups of proteins to form a simple, stable secondary amine linkage. The entire contents of these patents is incorporated by reference herein. N-hydroxy succinamide also may be incorporated as the reactive group.

15

III. Controlled Release Formulations for Polymer Conjugated Bioactive Molecules

The term "controlled release" refers to control of the rate and/or quantity of bioactive molecules delivered according to the drug delivery formulations of the invention. The controlled release can be continuous or discontinuous, and/or linear or non-linear. This can be accomplished using one or more types of polymer compositions, drug loadings, inclusion of excipients or degradation enhancers, or other modifiers, administered alone, in combination or sequentially to produce the desired effect.

20 Zero order or linear release is generally construed to mean that the amount of the bioactive molecule released over time remains relatively constant as a function of amount/unit time during the desired time frame. Multi-phasic is generally construed to mean that release occurs in more than one "burst".

25

A. MICROPARTICLES

In one embodiment, the invention employs biodegradable microparticles for controlled release of polymer conjugated bioactive molecules. As used herein, "microparticles" refers to particles having a diameter of preferably less than 1.0 mm, and more preferably between 1.0 and 100.0 microns. Microparticles include

WO 02/36169

PCT/US01/45154

microspheres, which are typically solid spherical microparticles. Microparticles also include microcapsules, which are spherical microparticles typically having a core of a different polymer, drug, or composition.

Microparticles for use in the present invention can be made using a variety of biodegradable polymers used for controlled release formulations, as are well known in the art. Suitable polymers for example include, but are not limited to, poly(hydroxy acids) including polylactic acid, polyglycolic acid, and copolymers thereof, polyamides, polyorthoesters, and certain types of protein and polysaccharide polymers. The term "bioerodible" or "biodegradable", as used herein, refer to polymers that dissolve or degrade within a period that is acceptable in the desired application (usually *in vivo* therapy), typically less than about five years, and more preferably less than about one year, once exposed to a physiological solution of pH between about 6-8 and at a temperature of between about 25°C - 38°C.

Preferred polymers include poly(hydroxy acids), especially poly(lactic acid-co-glycolic acid) ("PLGA") that degrade by hydrolysis following exposure to the aqueous environment of the body. The polymer is then hydrolyzed to yield lactic and glycolic acid monomers, which are normal byproducts of cellular metabolism. The rate of polymer disintegration can vary from several weeks to periods of greater than one year, depending on several factors including polymer molecular weight, ratio of lactide to glycolide monomers in the polymer chain, and stereoregularity of the monomer subunits (mixtures of L and D stereoisomers disrupt the polymer crystallinity enhancing polymer breakdown). Microspheres may contain blends of two and more biodegradable polymers, of different molecular weight and/or monomer ratio.

Derivatized biodegradable polymers are also suitable for use in the present invention, including hydrophilic polymers attached to PLGA and the like. To form microspheres, in particular, a variety of techniques known in the art can be used. These include, for example, single or double emulsion steps followed by solvent removal. Solvent removal may be accomplished by extraction, evaporation or spray drying among other methods.

In the solvent extraction method, the polymer is dissolved in an organic solvent that is at least partially soluble in the extraction solvent such as water. The bioactive molecule, either in soluble form or dispersed as fine particles, is then added

WO 02/36169

PCT/US01/45154

to the polymer solution, and the mixture is dispersed into an aqueous phase that contains a surface-active agent such as poly(vinyl alcohol). The resulting emulsion is added to a larger volume of water where the organic solvent is removed from the polymer/bioactive agent to form hardened microparticles.

5 In the solvent evaporation method, the polymer is dissolved in a volatile organic solvent. The bioactive molecule, either in soluble form or dispersed as fine particles, is then added to the polymer solution, and the mixture is suspended in an aqueous phase that contains a surface-active agent such as poly(vinyl alcohol). The resulting emulsion is stirred until most of the organic solvent evaporates, leaving solid 10 microspheres.

In the spray drying method, the polymer is dissolved in a suitable solvent, such as methylene chloride (e.g., 0.04 g/ml). A known amount of bioactive molecule (drug) is then suspended (if insoluble) or co-dissolved (if soluble) in the polymer solution. The solution or the dispersion is then spray-dried. Microspheres ranging in 15 diameter between one and ten microns can be obtained with a morphology, which depends on the selection of polymer.

Other known methods, such as phase separation and coacervation, and variations of the above, are known in the art and also may be employed in the present invention.

20

B. NANOPARTICLES

In another embodiment, the invention employs biodegradable nanoparticles for controlled release of polymer conjugated bioactive molecules, particularly for oral administration. As used herein, the term "nanoparticles" refers to particles having a 25 diameter of preferably between about 20.0 nanometers and about 2.0 microns, typically between about 100 nanometers and 1.0 micron.

Formulation of nanoparticles can be achieved essentially as described above for microparticles, except that high speed mixing or homogenization is used to reduce the size of the polymer/bioactive agent emulsions to below about 2.0 microns, 30 preferably below about 1.0 micron. For example, suitable techniques for making nanoparticles are described in WO 97/04747, the complete disclosure of which is incorporated by reference herein.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

EXAMPLES**I. Preparation and Characterization of Formulations for Delivering Leu-Enkephalin****5 Example 1 – Preparation of polyethylene glycol-conjugated leu-enkephalin (PEG-leu-enkephalin)**

Leu-enkephalin covalently modified with polyethylene glycol was prepared as follows: 25 mg of leu-enkephalin was dissolved in 500 µL of anhydrous DMSO containing 50 µL TEA. 250 mg of mPEG(5000)-SPA was dissolved in 1.5 mL anhydrous DMSO and added by direct injection to the peptide solution. The reaction was allowed to proceed for 2 hours at room temperature or until >90% of the peptide was converted to its PEG-modified form. Isolation of the product, mPEG(5000)-leu-enkephalin, from reactants was accomplished by recrystallization (2×) from EtOH. The reaction product was a white solid that was >95% pegylated (as assessed by RP-HPLC).

Example 2 – Preparation and characterization of conventional ($w_1/o/w_2$) microparticles containing leu-enkephalin

Conventional $w_1/o/w_2$ microparticles containing leu-enkephalin were prepared as follows: Leu-enkephalin was dissolved in a 1:9 DMSO:PBS mixture to a final concentration of 35 mg/mL (its maximum solubility in PBS). PLGA (50:50 lactide:glycolide; acid end group; inherent viscosity 0.16 L/g) was dissolved in methylene chloride to a final concentration of 200 mg/mL. The primary (w/o) emulsion was created by homogenizing 200 µL of the peptide solution with 3 mL of the polymer solution at 10,000 rpm for 3 minutes. This primary emulsion was poured into 100 mL of 0.5% PVA solution and stirred at a 750 rpm for 3-6 hours. After the solvent had evaporated and the microparticles had hardened, they were collected by filtration and dried *in vacuo* before analysis. The particles were characterized for core loading (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of their contents as follows. Table 1 shows the results.

Core loading measurement of the microspheres was done by dissolving 10 mg of microspheres in 50% acetonitrile followed by centrifugation to pellet the insoluble polymer. Aliquots were analyzed by RP-HPLC and compared to representative

WO 02/36169

PCT/US01/45154

standards prepared in 50% acetonitrile. Initial release of contents from microspheres was measured by suspending 20 mg samples in 2 mL of PBS (50 mM, pH 7.2) containing 0.02% Tween 20 and 25% EtOH. The suspensions were vortexed and incubated at 37°C. After 1 hour, aliquots were removed, filtered and analyzed for the amount released by RP-HPLC. This accelerated release at 1 hour was shown to correlate well with the amount of active released after 1 day in PBS without EtOH.

Example 3 – Preparation and characterization of conventional (w₁/o/w₂) microparticles containing PEG-leu-enkephalin conjugate

10 Conventional w₁/o/w₂ microparticles containing PEG-leu-enkephalin were prepared as follows: PEG-leu-enkephalin was dissolved in a 1:9 DMSO:PBS mixture to a final concentration of 50 mg/mL. PLGA (50:50 lactide:glycolide; acid end group; inherent viscosity 0.16 L/g) was dissolved in methylene chloride to a final concentration of 200 mg/mL. The primary (w/o) emulsion was created by
15 homogenizing 200 µL of the peptide solution with 3 mL of the polymer solution at 10,000 rpm for 3 minutes. This primary emulsion was poured into 100 mL of 0.5% PVA solution and allowed to stir at a 750 rpm for 3-6 hours. After the solvent had evaporated and the microparticles had hardened, they were collected by filtration and dried *in vacuo* before analysis. The particles were characterized for core loading
20 (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of their contents as described in Example 2. These data are presented in Table 1.

Example 4 – Preparation and characterization of monophase microparticles containing leu-enkephalin

25 Monophase microparticles containing unmodified leu-enkephalin were prepared as follows: 10 mg of leu-enkephalin was dissolved in 1 mL methylene chloride containing 30 µL TFA. 90 mg of PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end group; inherent viscosity 0.61 L/g) was then dissolved in the organic peptide solution. The primary (o/w) emulsion was formed by vortexing this solution with 2.5 mL of
30 2.5% PVA for 3 minutes. Forced air (15 minutes) and stirring (6-8 hours) were used to evaporate the solvent and harden the microparticles. After hardening, the microparticles were collected by filtration and dried *in vacuo* before analysis. Data

WO 02/36169

PCT/US01/45154

for core loading (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of contents are presented in Table 1.

Example 5 – Preparation and characterization of monophase microparticles containing PEG-leu-enkephalin conjugate

Monophase microparticles containing PEG-leu-enkephalin were prepared as follows: 50 mg PEG-leu-enkephalin and 150 mg PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end group; inherent viscosity 0.61 L/g) were dissolved in 2 mL methylene chloride. The primary (o/w) emulsion was formed by vortexing the organic peptide/polymer solution with 5 mL of 2.5% PVA for 3 minutes. The organic solvent was removed from the microparticles by stirring / vacuum evaporation for 2 hours. After microparticles hardened, they were collected by filtration and dried *in vacuo* before analysis. Data for core loading (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of contents are presented in Table 1.

15

Example 6 - Increased Drug Loading for Pegylated Leu-Enkephalin.

Data from Table 1 shows that covalent coupling of PEG 5000 to leu-enkephalin increases the drug loading (CL) attainable from 0.07% to 0.36% for the double emulsion technique and from 0.3% to 3.95% for the monophase method.

Pegylation also resulted in greatly improved encapsulation efficiency for the two methods. The initial release ("burst") was slightly less (better) for the pegylated than for unpegylated peptides made by the monophase, and the drug core load was more than 10 times greater for the pegylated peptide. The higher drug coreload allows smaller doses of biodegradable drug delivery systems to be administered to patients to achieve the desired drug dose.

Table 1. Characteristics of Leu-Enkephalin and PEG-Leu-Enkephalin Microparticles.

	Leu-enkephalin		PEG-Leu-enkephalin	
	Double-emulsion	Monophase	Double-emulsion	Monophase
TL (%) ^a	1.64	10	1.64	10
CL (%)	0.07	0.3	0.36	3.95
EE (%)	4.43	3.04	17	40.3
PS (μm)	50-250	20-100	50-200	40-100
IR (%)	47.1	22.5	ND	20.8

Theoretical loading (weight of active/total weight of active and polymer)

CL – Coreload (wt% of active in microparticle as isolated)

30 EE – Encapsulation Efficiency (% of active encapsulated in process)

WO 02/36169

PCT/US01/45154

PS – Mean Particle Size (estimated from SEM)
IR – Initial Release at 1 h from in vitro dissolution in PBS (50 mM, pH 7.2) containing 0.02% Tween 20 and 25% EtOH at 37°C
ND – Not detectable

5

II. Preparation, Characterization and Administration of Formulations for Delivering Biphalin

Example 7 - Increased Drug Loading and Decreased Burst for Pegylated Biphalin.

10 Biphalin is a synthetic peptide with analgesic activity in mammals. With two PEG 2000 chains attached it has a longer duration of analgesic action after intravenous administration than does the unpegylated peptide. Biphalin and pegylated biphalin were compared for their behavior in PLGA microsphere encapsulation as 15 described in the Examples below. As shown in Table 2, pegylated biphalin has a higher drug core loading, higher encapsulation efficiency, and lower initial release level (burst) than the unpegylated peptide.

20 **Example 8 – Preparation and characterization of conventional ($w_1/o/w_2$) microparticles containing biphalin**

Conventional $w_1/o/w_2$ microparticles containing PEG-biphalin were prepared as follows: Biphalin was dissolved in a ternary PBS:DMSO:acetic acid (5:1:1.5) mixture to a final concentration of 35 mg/mL. PLGA (50:50 lactide:glycolide; acid end group; inherent viscosity 0.16 L/g) was dissolved in methylene chloride to a final 25 concentration of 200 mg/mL. The primary (w_1/o) emulsion was created by homogenizing 200 μ L of the peptide solution with 3 mL of the polymer solution at 10,000 rpm for 3 minutes. This primary emulsion was poured into 100 mL of 0.5% PVA solution and allowed to stir at 750 rpm for 3 hours. After the solvent had evaporated and the microparticles had hardened, they were washed with water, 30 collected by filtration and dried *in vacuo* before analysis. Data for core loading (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of contents are shown in Table 2.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

Example 9 – Preparation and characterization of conventional (w₁/o/w₂) microparticles containing PEG-biphalin conjugate

Conventional w₁/o/w₂ microparticles containing PEG-biphalin were prepared as follows: PEG-biphalin was dissolved in PBS to a final concentration of 50 mg/mL.

5 PLGA (50:50 lactide:glycolide; acid end group; inherent viscosity 0.16 L/g) was dissolved in methylene chloride to a final concentration of 200 mg/mL. The primary (w/o) emulsion was created by homogenizing 200 µL of the peptide solution with 3 mL of the polymer solution at 10,000 rpm for 3 minutes. This primary emulsion was poured into 100 mL of 0.5% PVA solution and allowed to stir at a 750 rpm for 3

10 hours. After the solvent had evaporated and the microparticles had hardened, they were washed with water, collected by filtration and dried *in vacuo* before analysis. Data for core loading (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of contents are presented in Table 2.

15 **Example 10 – Preparation and characterization of monophase microparticles containing biphalin**

Monophase microparticles containing unmodified biphalin were prepared as follows: 20 mg of biphalin and 180 mg of PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end group; inherent viscosity 0.61 L/g) were dissolved in 2mL of a 1:3 acetic acid:methylene chloride mixture. The primary emulsion was created by vortexing the oil phase with 5 mL of 1% PVA for 3 minutes. Removal of the organic solvents from the primary o/w emulsion was accomplished by vacuum evaporation under stirring for 4 hours. After solvent removal, the hardened microparticles were collected by filtration and washed several times with distilled-deionized water to remove any

20 nonspecifically bound PVA or biphalin. Finally, the microparticles were dried *in vacuo* before analysis. Data for core loading (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of contents are shown in Table 2.

25 **Example 11 – Preparation and characterization of monophase microparticles containing PEG-biphalin conjugate**

Monophase microparticles containing PEG-biphalin were prepared as follows: 180 mg of PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end group; inherent viscosity 0.61 L/g) and 20 mg of PEG-biphalin were dissolved in 2 mL methylene chloride. The

WO 02/36169

PCT/US01/45154

primary emulsion was created by vortexing the polymer/peptide solution with 5 mL of 2.5% polyvinyl alcohol (PVA, 80-85% hydrolyzed) for 3 minutes. The organic solvent was removed from the primary emulsion (o/w) by vacuum evaporation under stirring for 4 hours. The hardened microparticles were collected by filtration and 5 washed several times with distilled water to remove any nonspecifically bound PVA or PEG-biphalin. Finally, the microparticles were dried *in vacuo* before analysis. Data for core loading (CL), encapsulation efficiency (EE), particle size (PS), and initial release (IR) of contents are presented in Table 2.

10 **Example 12 – Analgesic Effect on a Mammal Following Administration of
Pegylated Biphalin in a Biodegradable Microsphere.**

To evaluate the improved delivery *in vivo* of biphalin administered according to the present invention, a comparison study can be performed as follows: Pegylated biphalin PLGA microspheres can be prepared by the double emulsion method as 15 described in Example 9. The microspheres are suspended in a medium of carboxymethylcellulose (.5%) in water with 0.5% Tween-20. An effective dose is then administered subcutaneously to Sprague-Dawley rats and the analgesic effect is measured by, for example, the tail-flick assay. The microsphere-encapsulated PEG-biphalin has an analgesic effect which last longer than that for an unencapsulated 20 PEG-biphalin control injection. The experiment can be repeated with PLGA-encapsulated PEG-biphalin prepared by the monophase method of Example 11 with similar results.

Table 2. Characteristics of Biphalin and PEG-Biphalin Microparticles

Biphalin		PEG-Biphalin	
	Double-emulsion	Monophase	Double-emulsion
TL (%) ^a	1.0	10	1.64
CL (%)	0.24	0.36	1.48
EE (%)	14.28	3.64	90.52
PS (μm)	50-250	20-100	20-200
IR (%)	ND	49.4	19
			15.6

25 ^aTheoretical loading (weight of active/total weight of active and polymer)

CL – Coreload (wt% of active in microparticle as isolated)

EE – Encapsulation Efficiency (% of active encapsulated in process)

PS – Mean Particle Size (estimated from SEM)

IR – Initial Release at 1 h from *in vitro* dissolution in PBS (50 mM, pH 7.2)

30 containing 0.02% Tween 20 and 25% EtOH at 37°C

ND – Not detectable

WO 02/36169

PCT/US01/45154

**III. Preparation, Characterization and Administration of
Formulations for Delivering Insulin****Example 13 – Preparation of polyethylene glycol-conjugated human insulin****5 (PEG-insulin)**

Human insulin was covalently modified with polyethylene glycol as follows: 116 mg of recombinant human insulin was dissolved in 4 mL anhydrous DMSO containing 200 μ L TEA. 1 g of mPEG(5000)-SPA was dissolved in 10 mL anhydrous DMSO and added to the insulin solution by direct injection. The reaction proceeded 10 overnight (6-10 hours) at room temperature or until >90% of the protein was pegylated. The unreacted PEG and pegylated insulin were isolated by precipitation (2x) from Et₂O. The final product was a white granular solid that was >95% pegylated (according to RP-HPLC analysis).

**15 Example 14 – Preparation and characterization of conventional (w₁/o/w₂)
microparticles containing human insulin**

Conventional w₁/o/w₂ microparticles containing human insulin were prepared as follows: recombinant human insulin was dissolved in DMSO:0.1N HCl (1:1) to a final concentration of 50 mg/mL and PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end 20 group; inherent viscosity 0.61 L/g) was dissolved in methylene chloride to a final concentration of 200 mg/mL. The primary (w/o) emulsion was formed by homogenization of 200 μ L of the protein solution and 3 mL of the polymer solution at 10,000 rpm for 3 minutes. This primary emulsion was then added to 100 mL of 0.5% PVA and allowed to stir under vacuum for 3-6 hours. Once the organic solvents were 25 removed, the microparticles were filtered, washed several times with water, and dried *in vacuo* before analysis. Table 3 lists characteristics of the microparticles.

**Example 15 – Preparation and characterization of conventional (w₁/o/w₂)
microparticles containing PEG-insulin conjugate**

30 Conventional w₁/o/w₂ microparticles containing PEG-insulin were prepared as follows: PEG-insulin was dissolved in a DMSO:H₂O (1:2) mixture to a final concentration of 50 mg/mL and PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end group; inherent viscosity 0.61 L/g) was dissolved in methylene chloride to a final

WO 02/36169

PCT/US01/45154

concentration of 200 mg/mL. The primary (w/o) emulsion was formed by homogenization of 200 µL of the protein solution and 3 mL of the polymer solution at 10,000 rpm for 3 minutes. This primary emulsion was added to 100 mL of 0.5% PVA and allowed to stir under vacuum for 3-6 hours. Once the organic solvents were removed, the microparticles were filtered, washed several times with water, and dried *in vacuo* before analysis. Table 3 lists results from analysis of the microparticles.

Example 16 – Preparation and characterization of monophase microparticles containing human insulin

Monophase microparticles containing human insulin were prepared as follows: 20 mg of recombinant human insulin (Zn^{2+} -insulin salt) was dissolved in 2 mL of an acetic acid:methylene chloride (1.4:1) mixture. 180 mg of PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end group; inherent viscosity 0.61 L/g) was then dissolved in the organic peptide solution. The primary emulsion was created by vortexing the organic peptide/polymer solution with 5 mL of 1% PVA for 3 minutes. The organic solvents were removed by vacuum evaporation under stirring for 2 hours. The partially hardened microparticles were added to a beaker containing 100 mL water and stirred for another 2 hours to completely remove all organic solvents. The microparticles were collected by filtration, washed several times with water and dried *in vacuo* before analysis. Table 3 lists results from analysis of the microparticles.

Example 17 – Preparation and characterization of monophase microparticles containing PEG-insulin conjugate

Monophase microparticles containing PEG-insulin were prepared as follows: 63 mg of PEG-insulin and 137 mg of PLGA (50:50 lactide:glycolide; lauryl end group; inherent viscosity 0.61 L/g) were dissolved in 2 mL of methylene chloride. The primary emulsion was formed by vortexing the oil phase with 5 mL of 1% PVA for 3 minutes. Solvent removal was accomplished by vacuum evaporation for 2 h followed by stirring under ambient conditions for 1 hour. The hardened microparticles were collected by filtration and washed several times with water before drying *in vacuo* and analyzing. Table 3 lists results from analysis of the microparticles.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

Example 18 - Increased Drug Loading and Encapsulation Efficiency for PEGylated Insulin.

Data in Table 3 show that pegylated insulin achieves increased drug loading in PLGA microspheres prepared by both the monophase and double emulsion methods.

- 5 Pegylated insulin also has higher encapsulation efficiency, a major advantage when high value biologically active peptides and proteins are used.

Table 3. Characteristics of Insulin and PEG-Insulin Microparticles.

Insulin	PEG-Insulin			
	Double-emulsion	Monophase	Double-emulsion	Monophase
TL (%) ^a	1.64	10	1.64	31.5
CL (%)	0.23	0.6	0.54	15.5
EE (%)	13.86	6	33	49.2
PS (μm)	100-350	30-100	50-250	50-100

^aTheoretical loading (weight of active/total weight of active and polymer)

- 10 CL - Coreload (wt% of active in microparticle as isolated)
EE - Encapsulation Efficiency (% of active encapsulated in process)
PS - Mean Particle Size (estimated from SEM)

Example 19 – Hypoglycemic Effect of PLGA-Encapsulated PEG-Insulin.

- 15 PEG-Insulin PLGA microspheres and an equivalent dose of free insulin were administered subcutaneously to normal rats. Blood was drawn periodically and anticoagulated. Blood glucose levels were measured by standard tests. As shown in Table 4, use of PEG-insulin in PLGA microspheres significantly suppressed the initial reduction in blood glucose relative to the values observed for unmodified insulin. In
20 addition, these data importantly show that the PEG-insulin microsphere preparation released its drug in a biologically active form that was able to effectively depress blood glucose levels in an *in vivo* animal model without the “burst” effect of unmodified, conventional formulations.

25 Table 4. *In Vivo* Study of Insulin and PEG-Insulin Microparticles.

Time (hr)	Insulin (Humulin-U)		PEG-Insulin	
	%BGL ^a	SD	%BGL ^a	SD
0	100	0	100	0
1	25.8	6.6	111.1	16
2	14.9	11.4	86.5	17.6
4	68.1	11.6	97	13.3
6	89.3	7	98.5	12.1
8	75	1.7	82	6.8
12	75.8	8.2	88.8	6.6

WO 02/36169

PCT/US01/45154

^a%BGL denotes the glucose values shown are normalized to a percentage of basal levels

IV. Preparation and Characterization of Formulations for**5 Delivering GM-CSF****Example 20 - Preparation of polyethylene glycol conjugated GM-CSF**

GM-CSF can be covalently conjugated to polyethylene glycol (PEG) as follows: 100 mg of GM-CSF is dissolved in 10 ml pH 7.5 phosphate buffer, at room temperature. 100 mg tresyl-monomethoxy-polyethylene glycol (MW=5000 daltons) is then added, and the mixture stirred for 1 hour. The unreacted GM-CSF and pegylated GM-CSF fractions are isolated from unreacted tresyl-monomethoxy-polyethylene glycol by gel chromatography. The pegylated GM-CSF is then dialyzed into 100 mM Tris buffer and adjusted to a concentration of 50 mg/ml.

15

Example 21 - Preparation of microparticles encapsulating pegylated GM-CSF

Microparticles encapsulating pegylated GM-CSF can be prepared as follows: 6.0 gm of PLGA (50:50 lactide:glycolide; inherent viscosity 0.35 l/g) is dissolved in 20 ml ethyl acetate. 1 ml of pegylated GM-CSF from Example 20 is added and stirred rapidly with a homogenizer at 10,000 rpm to create a water-in-oil emulsion. The polymer/drug/ethyl acetate emulsion is then pumped through a static mixer in combination with a pumped stream of water containing 1% polyvinyl alcohol (PVA). This action produces a w/o/w emulsion, which was subsequently added to 1 liter of SC water with stirring. After 2 hours the hardened PLGA microspheres containing pegylated GM-CSF are collected on a 25 micron sieve and dried. The resulting microspheres will be in a size range of between 25–200 µm.

Example 22 - Preparation of nanoparticles encapsulating pegylated GM-CSF

Nanoparticles encapsulating pegylated GM-CSF can be prepared as follows: 3.0 gm of PLGA (material same as in Example 21) is dissolved in 5 ml dichloromethane and 5 ml acetone. 0.5 ml of pegylated GM-CSF from Example 20 is added and the mixture stirred at 10,000 rpm with a homogenizer. The mixture is added to 200 ml water containing 5% PVA. The mixture is then homogenized at 15,000 rpm for such time as is required to form nanoparticles of less than about 1.0

WO 02/36169

PCT/US01/45154

micron in diameter. The organic solvents can be removed by vacuum and the nanospheres can be recovered from the water and dried.

Equivalents

5 Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims. In addition, the entire contents of all patents and publications cited herein is hereby incorporated by reference.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

What is claimed is:

1. A pharmaceutical formulation for controlled release of a bioactive molecule, the formulation comprising a biodegradable polymer in combination with a conjugate of a bioactive molecule and a hydrophilic polymer.
2. The pharmaceutical formulation of claim 1 wherein the bioactive molecule and the hydrophilic polymer are covalently conjugated.
- 10 3. The pharmaceutical formulation of claim 1 wherein the biodegradable polymer is selected from the group consisting of polyhydroxy acids, polylactic acids, polyglycolic acids, and copolymers thereof.
- 15 4. The pharmaceutical formulation of claim 3 wherein the biodegradable polymer is selected from the group consisting of polyanhydrides, polyorthoesters, and polysaccharide polymers.
5. The pharmaceutical formulation of claim 1 wherein the hydrophilic polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, polypropylene glycol and linear and branched derivatives thereof.
- 20 6. The pharmaceutical formulation of claim 1 wherein the biodegradable polymer is formulated into microparticles or nanoparticles encapsulating the conjugate.
- 25 7. The pharmaceutical formulation of claim 1 wherein said bioactive molecule is selected from the group consisting of α -interferon, β -interferon, γ -interferon, erythropoietins, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor, interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 12, asparaginase, adenosine deaminase, insulin, ACTH, glucagon, somatostatin, somatotropin, thymosin, parathyroid hormone, pigmentary hormones, somatomedin, leuteinizing hormone, chorionic gonadotropin, hypothalamic releasing factors, antidiuretic hormones, thyroid stimulating hormone, endorphins, enkephalins,

WO 02/36169

PCT/US01/45154

biphalin, prolactin, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antisense oligonucleotides, aptamers, therapeutic genes, heparin, low molecular weight heparin and small bioactive molecules.

- 5 8. A method for controlled systemic delivery of bioactive molecules to a subject comprising administering to the subject a composition comprising a biodegradable polymer in combination with a conjugate of a bioactive molecule and a hydrophilic polymer.
- 10 9. The method of claim 8 wherein the composition is administered orally.
10. The method of claim 8 wherein the composition is administered by inhalation or mucosal delivery.
- 15 11. The method of claim 8 wherein the composition is administered by injection.
12. The method of claim 11 wherein the injection is subcutaneous or intramuscular.
- 20 13. The method of claim 8 wherein the bioactive molecule and the hydrophilic polymer are covalently conjugated.
14. The method of claim 8 wherein the biodegradable polymer is selected from the group consisting of polyhydroxy acids, polylactic acids, polyglycolic acids, and
- 25 copolymers thereof.
15. The method of claim 8 wherein the hydrophilic polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, polypropylene glycol and linear and branched derivatives thereof.
- 30 16. The method of claim 8 wherein the biodegradable polymer is formulated into microparticles or nanoparticles encapsulating the conjugate.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

17. The method of claim 8 wherein said bioactive molecule is selected from the group consisting of α -interferon, β -interferon, γ -interferon, erythropoietins, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor, interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 12, asparaginase, 5 adenosine deaminase, insulin, ACTH, glucagon, somatostatin, somatotropin, thymosin, parathyroid hormone, pigmentary hormones, somatomedin, leuteinizing hormone, chorionic gonadotropin, hypothalamic releasing factors, antiuretic hormones, thyroid stimulating hormone, endorphins, enkephalins, biphilin, prolactin, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antisense oligonucleotides, aptamers, 10 therapeutic genes, heparin, low molecular weight heparin and small bioactive molecules.
18. A method for increasing bioavailability of a bioactive molecule, comprising conjugating the bioactive molecule with a hydrophilic polymer, formulating the 15 conjugated bioactive molecule with a biodegradable polymer, and then administering the resulting formulation to a subject.
19. The method of claim 18 wherein the biodegradable polymer is formulated into nanoparticles encapsulating the conjugate. 20
20. The method of claim 18 wherein the formulation is administered orally.
21. The method of claim 18 wherein the bioactive molecule and the hydrophilic polymer are covalently conjugated. 25
22. The method of claim 18 wherein the biodegradable polymer is selected from the group consisting of polyhydroxy acids, polylactic acids, polyglycolic acids, and copolymers thereof.
- 30 23. The method of claim 18 wherein the hydrophilic polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, polypropylene glycol and linear and branched derivatives thereof.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

24. The method of claim 18 wherein the biodegradable polymer is formulated into microparticles or nanoparticles encapsulating the conjugate.
25. The method of claim 18, wherein said bioactive molecule is selected from the group consisting of α -interferon, β -interferon, γ -interferon, erythropoietins, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor, interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 12, asparaginase, adenosine deaminase, insulin, ACTH, glucagon, somatostatin, somatotropin, thymosin, parathyroid hormone, pigmentary hormones, somatomedin, leutinizing hormone, chorionic gonadotropin, hypothalamic releasing factors, antidiuretic hormones, thyroid stimulating hormone, endorphins, enkephalins, biphilin, prolactin, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antisense oligonucleotides, aptamers, therapeutic genes, heparin, low molecular weight heparin and small bioactive molecules.
- 15 26. A method for reducing immunogenicity of a bioactive molecule, comprising conjugating the bioactive molecule with a hydrophilic polymer, formulating the conjugated bioactive molecule with a biodegradable polymer, and then administering the resulting formulation to a subject.
- 20 27. The method of claim 26 wherein the composition is administered orally.
28. The method of claim 26 wherein the bioactive molecule and the hydrophilic polymer are covalently conjugated.
- 25 29. The method of claim 26 wherein the biodegradable polymer is selected from the group consisting of polyhydroxy acids, polylactic acids, polyglycolic acids, and copolymers thereof.
- 30 30. The method of claim 26 wherein the hydrophilic polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, polypropylene glycol and linear and branched derivatives thereof.

WO 02/36169

PCT/US01/45154

31. The method of claim 26 wherein the biodegradable polymer is formulated into microparticles or nanoparticles encapsulating the conjugate.

32. The method of claim 26, wherein said bioactive molecule is selected from the group consisting of α -interferon, β -interferon, γ -interferon, erythropoietins, granulocyte colony stimulating factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor, interleukin 1, interleukin 2, interleukin 3, interleukin 12, asparaginase, adenosine deaminase, insulin, ACTH, glucagon, somatostatin, somatotropin, thymosin, parathyroid hormone, pigmentary hormones, somatomedin, leuteinizing hormone, chorionic gonadotropin, hypothalamic releasing factors, antidiuretic hormones, thyroid stimulating hormone, endorphins, enkephalins, biphosphin, prolactin, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antisense oligonucleotides, aptamers, therapeutic genes, heparin, low molecular weight heparin and small bioactive molecules.

15

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/036169 A3(51) International Patent Classification⁵: A61K 47/48

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,

(21) International Application Number: PCT/US01/45154

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU,

(22) International Filing Date: 31 October 2001 (31.10.2001)

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM,

(25) Filing Language: English

HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KU, KG, KP, KR, KZ, LC,

(26) Publication Language: English

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

(30) Priority Data: 60/244,499 31 October 2000 (31.10.2000) US

MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,

(71) Applicant (for all designated States except US): PR PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 1512 Webster Court, Fort Collins, CO 80524 (US).

SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,

ZA, ZW.

(72) Inventors: and

(81) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,

(75) Inventors/Applicants (for US only): LEWIS, Danny [US/US]; 383 Wynn-Wallace Road, Huntsville, AL 35640 (US), SCHMIDT, Paul [US/US]; 8678 Niwot Road, Niwot, CO 80503 (US), HINDS, Kenneth [US/US]; 1112 omieko Court, Fort Collins, CO 80525 (US).

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,

(88) Date of publication of the international search report:

31 July 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/036169 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR ENHANCED DELIVERY OF BIOACTIVE MOLECULES

(57) **Abstract:** Formulations for controlled, prolonged release of bioactive molecules such as therapeutic proteins, peptides and oligonucleotides have been developed. These formulations are based on solid microparticles or nanoparticles formed of the combination of biodegradable, synthetic polymers such as poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), and copolymers thereof. Bioactive molecules are coupled to hydrophilic polymers such as polyethylene glycol or polypropylene glycol and formulated to provide controlled release. The bioactive molecules are more stable, less immunogenic and have improved release rate profiles with lower burst levels and increased drug loading relative to the same bioactive molecules lacking coupled hydrophilic polymers. The controlled release formulations can be administered by injection, by inhalation, nasally, or orally.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/45154
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 46212 A (AMGEN INC) 22 October 1998 (1998-10-22) claims 1,12-23 ---	1-32
E	WO 02 41829 A (DUNN JAMES M ;PR PHARMACEUTICALS INC (US)) 30 May 2002 (2002-05-30) claims ---	1,2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but which understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step if it is combined with such document alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the International search 3 April 2003	Date of mailing of the International search report 10/04/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5016 Patentlaan 2 NL-2233 RA Delft Tel. (+31-70) 340-3010, Fax. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Berte, M	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/45154
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 8-17, 26-32 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p>	
<ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 	
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846212	A 22-10-1998	US 6020004 A AU 7134898 A EP 0975334 A1 JP 2002514215 T WO 9846212 A1	01-02-2000 11-11-1998 02-02-2000 14-05-2002 22-10-1998
WO 0241829	A 30-05-2002	AU 3927902 A WO 0241829 A2	03-06-2002 30-05-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/04 A 6 1 K 37/02

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72) 発明者 ルイス, ダニー
アメリカ合衆国 アリゾナ州 35640 ハートセル ウィン - ウォレス ロード 383

(72) 発明者 シュミット, ポール
アメリカ合衆国 コロラド州 80503 ナイウォット ナイウォット ロード 8678

(72) 発明者 ヒンズ, ケネス
アメリカ合衆国 コロラド州 80525 フォート コリンズ オンチセロ コート 1112

F ターム(参考) 4C076 AA61 AA64 AA65 AA67 AA94 AA95 BB01 BB15 BB16 CC29
EE23A EE24H EE30H FF32 GG25 GG32
4C084 AA02 AA03 BA44 DA19 DA21 DB01 DB34 DC01 MA01 MA05
MA38 MA52 MA66 NA12 NA13 ZA082