(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월06일
(11) 등록번호 10-1557502
(24) 등록일자 2015년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7007326
(22) 출원일자(국제) 2006년09월14일
심사청구일자 2011년09월02일
(85) 번역문제출일자 2008년03월26일
(65) 공개번호 10-2008-0043372
(43) 공개일자 2008년05월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/035822
(87) 국제공개번호 WO 2007/033316
국제공개일자 2007년03월22일
(30) 우선권주장
60/717,524 2005년09월14일 미국(US)
60/744,882 2006년04월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20040234615 A1

(73) 특허권자
맨카인드 코포레이션
미합중국 캘리포니아 91355 발렌시아 28903 노스 애비뉴 패인
(72) 발명자
호켄슨. 마크
미국 캘리포니아주 91354 발렌시아 메이페어 드라이브 28337
오베르그, 키스, 에이.
미국 캘리포니아주 91355 발렌시아 엘 게이토 플레이스 25850
(74) 대리인
김진희

전체 청구항 수 : 총 22 항 심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 **결정질 미립자 표면에 대한 활성제의 친화력의 증가를기반으로 하는 약물 제제의 방법**

(57) 요 약

미립자에 선호될 수 있는 결합을 용이하게 하기 위해 활성제의 구조적 성질을 개질함으로써 미립자에 대한 활성제의 흡착을 촉진시키는 방법이 제공된다.

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) 활성제의 화학 전위를 개질하는 단계로서, 상기 개질은 활성제와 미립자 사이의 에너지적으로 선호되는(energetically favorable) 상호작용을 가능하게 하고, 상기 화학 전위의 개질은 용액 조건의 변경에 의해 활성제의 구조, 가요성, 강성, 용해도 또는 안정성을 개질하는 것을 포함하고, 이 때 용액 조건의 변경은 염, 계면활성제, 이온, 오스모라이트, 알코올, 카오트로프(chaotrope), 코스모트로프(kosmotrope), 산, 염기 및 유기 용매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 활성제 개질제를 용액에 첨가하는 것을 포함하며, 상기 개질 단계는 현탁액으로부터 용매를 제거하는 것을 포함하지 않는 것인 단계; 및

ii) 미립자의 표면상에 활성제를 흡착시키는 단계로서, 상기 활성제는 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드인 단계

를 포함하는, 현탁액 내 사전 형성된 결정질 미립자에 대한 활성제의 결합을 촉진시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 염이 염화 나트륨인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 미립자의 현탁액의 유체 상에 활성제를 용해시키는 단계 및 유체 상의 pH를 변화시키는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 활성제의 첨가 이전에 pH를 변화시키는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 활성제의 첨가 이후에 pH를 변화시키는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 활성제의 약역학 또는 구조 안정성은 용액에 활성제 개질제를 첨가함으로써 개선되는 것인 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서, 활성제가 인슐린, 그렐린, 성장 호르몬 및 부갑상선 호르몬(PTH)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 활성제가 항체 또는 항체 단편을 포함하는 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항에 있어서, 활성제의 화학 전위의 개질이 미립자 표면과의 1 이상의 에너지적으로 선호되는 상호작용의 조절을 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 활성제와 미립자 사이의 1 이상의 에너지적으로 선호되는 상호작용이 정전기적 상호작용을 포함하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 활성제와 미립자 사이의 1 이상의 에너지적으로 선호되는 상호작용이 소수성 상호작용을 포함하는 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 활성제와 미립자 사이의 1 이상의 에너지적으로 선호되는 상호작용이 수소결합 상호작용을 포함하는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 미립자가 다이케토피페라진을 포함하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 다이케토피페라진이 푸마릴 다이케토피페라진인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 용매를 제거하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 24

활성제 분자를 포함하는 활성제 용액을 제공하는 단계로서, 상기 활성제 분자는 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드인 단계;

활성제의 화학 전위를 개질하는 단계로서, 상기 화학 전위의 개질은 용액 조건의 변경에 의해 활성제의 구조, 가요성, 강성, 용해도 또는 안정성을 개질하는 것을 포함하며, 이 때 용액 조건의 변경은 염, 계면활성제, 이온, 오스모라이트, 알코올, 카오트로프(chaotrope), 코스모트로프(kosmotrope), 산, 염기 및 유기 용매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 활성제 개질제를 용액에 첨가하는 것을 포함는 것인 단계;

현탁액 또는 분말로 미립자를 제공하는 단계; 및

상기 미립자 현탁액 또는 분말과 상기 활성제 용액을 조합하는 단계

를 포함하는, 활성제 및 결정질 미립자를 포함하는 약물 전달 조성물의 제조 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 활성제의 화학 전위의 개질이 활성제와 미립자 사이의 상호작용을 가능하게 하는 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

제24항에 있어서, 활성제 개질제가 활성제 분자의 용해도를 감소시키는 방법.

청구항 29

제24항에 있어서, 활성제 개질제가 활성제의 화학 전위를 변경하도록 활성제에 작용하여, 활성제와 미립자 사이의 결합이 촉진되는 것인 방법.

청구항 30

제24항에 있어서, 활성제 개질제가 활성제의 화학 전위를 변경하도록 활성제에 작용하여, 활성제 분자의 구조 안정성이 개선되는 것인 방법.

청구항 31

제24항에 있어서, 미립자가 다이케토피페라진을 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 다이케토피페라진이 푸마릴 다이케토피페라진인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련된 출원의 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e)에 근거하여 2005년 9월 14일에 출원된 미국 가출원 제60/717,524호 및 2006년 4월 14일에 출원된 미국 가출원 제60/744,882호에 대한 우선권을 주장하고, 이의 모든 내용은 전체로서 참조에 의해 본 명세서에 편입된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 이 발명은 약물 제제에 관한 것이고, 특히 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로는 결정질 미립자의 표면상에 활성제를 결합 또는 흡착시키는 것을 개시한다.

배 경 기 술

[0005] 치료제의 전달은 주요한 문제로 존재하여 왔다. 경구 투여는 투여의 용이성, 환자 순응도 및 감소된 비용 때문에 가장 통상적이고, 바람직한 전달 경로 중 하나이다. 그러나, 이 경로의 단점은 치료제의 낮은 효능 또는 변하기 쉬운 효능 및 불충분한 흡착을 포함한다. 특히 이는 전달되는 화합물이 위장관에서 마주치는 조건 하에서 불안정한 경우 명백하다. 다양한 코팅 및 피막형성 방법이 본 기술분야에서 개발되어 왔지만, 극히 소수만이 이 문제를 해결하는 데 효과적이었다. 위장관의 조건에서 덜 활성인 경향이 있고, 유효량으로 혈류에 흡착되기 위해 고 투여량으로 투여되어야 하는 치료 화합물이 여전히 존재한다.

[0006] 최적의 약물 전달 문제를 해결하기 위해 광범위한 범위의 약물 제제 시스템이 개발되어 왔고, 이는 담체로서 작용하는 매트릭스 내로 약물의 도입을 기반으로 한다. 약물 제제에서 고려되는 인자는 시스템이 무독성이고, 전달되는 약물과 비반응성 이어야 하고, 제조가 경제적이어야 하고, 즉시 입수 가능한 성분으로 형성되어야하고, 최종 조성 및 안정성과 방출 속도를 포함하는 물리적 특성에 관해 일관성이 있어야 하는 요구 조건을 포함한다. 또한 약물 전달 시스템은 보통의 생리학적 방법에 의해 신체로부터 용이하게 제거되는 재료로 형성되는 것이 바람직하다.

[0007] 미립자 기술의 발달은 개선된 약물 제제의 발전에 도움되어 왔다. 그러나, 이러한 발달에도 불구하고, 약학적 수단, 특히, 폐에 의해 투여되는 경우 장기간 효능 및 최적의 흡착을 갖는 안정한 약물 제제에 대한 요구가 본 기술분야에 여전히 존재한다. 이 결점을 해결하는 접근법 중 하나는 미립자의 표면에 이의 흡착을 촉진하고, 용액에 잔존하는 이의 경향을 감소시키는 활성제의 구조적 특성/성질을 표적하는 것이다.

발명의 상세한 설명

[0008] **발명의 개요**

[0009] 결정질 미립자 표면상에 활성제를 결합, 코팅 또는 흡착시키는 방법을 제공한다. 일반적으로, 활성제가 용액에 잔존하는 것보다 미립자 표면에 대해 더 큰 친화력을 갖도록 미립자 및 용해된 활성제를 포함하는 시스템을 개질함으로써 미립자는 활성제로 코팅된다. 특히 본 발명은 용액의 다수의 조건 하에서 활성제의 성질을 개질/활용함으로써 미립자 표면에 대한 활성제의 흡착을 더 촉진시키는 것을 추구한다.

[0010] 따라서, 본 발명에서 i) 활성제의 화학 전위를 개질하는 단계로서, 상기 개질은 용매의 제거와 관계없이 활성제와 미립자 사이의 에너지적으로 선호되는(energetically favorable) 상호작용을 고려하는 것인 단계; 및 ii) 미립자의 표면상에 활성제를 흡착시키는 단계를 포함하는, 현탁액 내 사전 형성된 결정질 미립자에 대한 활성제의 결합을 촉진시키는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 특정한 구체예에서, 화학 전위의 개질은 활성제의 구조, 가요성, 강성, 용해도 또는 안정성을 개별적으로 또는 조합으로 개질하는 것을 포함한다. 활성제의 화학 전위의 개질은 용액 조건의 변경을 포함한다. 용액 조건의 변경은 활성제 개질제를 용액에 첨가하는 것을 포함한다.

[0012] 특정한 구체예에서, 활성제 개질제는 염, 계면활성제, 이온, 오스모라이트, 알코올, 카오트로프, 코스모트로프, 산, 염기 및 유기 용매로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 염은 염화 나트륨이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 방법은 미립자의 현탁액의 유체 상(fluid phase)에 활성제를 용해시키는 단계 및 유체 상의 pH를 변화시키는 단계를 더 포함한다. 한 측면에서, 유체 상에 활성제를 용해시키는 단계는 고체의 용해를 지칭한다. 다른 측면에서, 활성제의 용해 단계는 활성제의 농축 용액의 첨가를 지칭한다.

[0014] 본 발명의 다른 구체예에서, 활성제 개질제는 활성제의 구조 안정성을 개선시킨다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 활성제는 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 소 분자 또는 핵산 분자이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 활성제는 인슐린, 그렐린(ghrelin), 성장 호르몬 및 부갑상선 호르몬(PTH)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 활성제는 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 다양한 측면에서, 항체는 종양 관련 항원 또는 전염성 병원균 관련 항원(이에 한정되지는 않음)을 포함하는 질병 관련 항원을 인식할 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 소 분자는 이온화 가능한 분자 또는 소수성 분자이고, 예컨대, 사이클로스포린 A이고, 이에 한정되지는 않는다.

[0017] 본 발명의 다른 구체예에서, 활성제의 화학 전위의 개질은 활성제와 미립자 표면 사이의 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용 및/또는 수소결합 상호작용(이에 제한되지는 않음)과 같은 1 이상의 에너지적으로 선호되는 상호작용을 조절하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 미립자는 다이케토피페라진, 예컨대, 푸마릴 다이케토피페라진을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 방법은 용매를 제거 또는 교체하는 단계를 더 포함한다. 본 명세서에서 이용되는 것으로서 용매는 활성제 및 미립자가 적셔져 있는(bathed) 유체 매질을 지칭한다. 모든 성분이 용액에 존재하는 것이 요구되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 실제로 많은 경우에서 이는 미립자가 현탁되어 있는 액체 매질을 지칭하기 위해 이용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구체예에서, 활성제 분자를 포함하는 활성제 용액을 제공하는 단계; 활성제의 화학 전위를 개질하는 단계; 현탁액 또는 분말로 미립자를 제공하는 단계; 및 미립자 현탁액 또는 분말과 활성제 용액을 조합하는 단계를 포함하는, 활성제 및 결정질 미립자를 포함하는 약물 전달 조성물의 제조 방법이 제공된다. 분말은 예를 들어, 여과될 수 있지만 건조되지 않는다.

[0020] 본 발명의 다른 구체예에서, 활성제의 화학 전위를 개질하는 방법은 활성제와 미립자 사이의 상호작용을 고려한다. 한 구체예에서, 활성제의 화학 전위의 개질은 활성제 개질제를 용액에 첨가하는 것을 포함한다. 이러한 활성제 개질제는 염, 계면활성제, 이온, 오스모라이트, 알코올, 카오트로프, 코스모트로프, 산, 염기 및 유기 용매로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 개질제는 활성제 분자의 용해도를 감소시키고, 활성제와 미립자, 예컨대, 다이케토피페라진 입자 사이의 결합을 촉진시키고, 그리고/또는 활성제 분자의 구조 안정성을 개선한다.

[0021] **도면의 간단한 설명**

[0022] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 명세서에서 개시되는 실시예의 특정한 측면을 더 증명하기 위해 포함된다. 본 명세서에 존재하는 특정한 구체예의 상세한 설명과 함께 1 이상의 도면을 참조함으로써 본 발명은 더 잘 이해될 수 있다.

[0023] 도 1A-1C는 본 발명의 교시에 따른 pH 및 100 mM 카오트로프/코스모트로프 제제의 함수로서 푸마릴 다이케토피페라진(FDKP) 미립자 상으로의 활성제의 로딩 곡선에 대한 카오트로프 및 코스모트로프의 효과를 도시한다. 도 1A는 pH 3.0-5.0에서 카오트로프 및 코스모트로프의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.75 mg/mL의 인슐린의 로딩을 도시한다. 도 1B는 pH 2.0-4.0에서 카오트로프 및 코스모트로프의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.25 mg/mL의 글루카곤 유사 펩타이드 1(GLP-1)의 로딩을 도시한다. 도 1C는 pH 4.0-5.0에서 강한 카오트로프, NaSCN 및 $NaClO_4$의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.25 mg/mL의 부갑상선 호르몬(PTH)의 로딩을 도시한다.

[0024] 도 2A-2C는 본 발명의 교시에 따른 pH 및 오스모라이트(100 mM)의 함수로서 FDKP 미립자 상으로의 활성제의 로딩 곡선에 대한 오스모라이트의 효과를 도시한다. 도 2A는 pH 3.0-5.0에서 오스모라이트의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상에 0.75 mg/mL의 인슐린의 로딩을 도시한다. 도 2B는 pH 2.0-4.0 사이의 오스모라이트의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상에 0.25 mg/mL의 GLP-1의 로딩을 도시한다. 도 2C는 pH 4.0-5.0에서 강한 오스모라이트의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상에 0.10 mg/mL의 그렐린 펩타이드의 로딩을 도시한다.

[0025] 도 3A-3D는 본 발명의 교시에 따른 pH 및 알코올의 함수로서, FDKP 미립자 상으로의 활성제의 로딩 곡선에 대한 알코올의 효과를 도시한다. 도 3A는 pH 2.0-4.0에서 5 부피%, 10 부피%, 15 부피% 및 20 부피%의 헥사플루오로아이소프로판올(HFIP)의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.10 mg/mL의 그렐린의 로딩을 도시한다. 도 3B는 pH 2.0-4.0에서 5 부피%, 10 부피%, 15 부피% 및 20 부피%의 트라이플루오로에탄올(TFE)의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.10 mg/mL의 그렐린의 로딩을 도시한다. 도 3C 및 3D는 pH 2.0-5.0에서 HFIP 및 TFE 각각의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.25 mg/mL의 GLP-1의 로딩을 도시한다.

[0026] 도 4A-4D는 본 발명의 교시에 따른 pH 및 NaCl 농도의 함수로서, FDKP 미립자 상으로의 활성제의 로딩 곡선에 대한 염의 효과를 도시한다. 도 4A는 pH 2.0-5.0에서 0-500 mM의 NaCl의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.75 mg/mL의 인슐린의 로딩을 도시한다. 도 4B는 pH 2.0-5.0에서 0-500 mM의 NaCl의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.25 mg/mL의 GLP-1의 로딩을 도시한다. 도 4C는 pH 2.0-5.0에서 0-1000 mM의 NaCl의 존재 하에서 5 mg/mL의 FDKP 미립자 상으로의 0.25 mg/mL의 PTH 펩타이드의 로딩을 도시한다. 도 4D는 다양한 염 농도(20℃)에서 PTH의 2차 구조 분석을 도시한다. pH 5.8에서 4.3 mg/mL의 PTH의 원자외선(far-UV) 원편광 2 색성(CD)은 NaCl의 농도가 증가함에 따라 펩타이드의 2차 구조가 더 나선형인 형태를 선택함을 설명한다.

[0027] 도 5A-5B는 본 발명의 교시에 따른 미립자 상에 소수성 분자의 흡착을 도시한다. 도 5A는 60%, 80% 및 90% 농도로 반용매(물)가 증가함에 따른 FDKP 미립자에 대한 사이클로스포린 A의 결합을 도시한다. 도 5B는 90%의 반용매의 존재 하에서 사이클로스포린 A/FDKP 미립자의 변화하는 질량비에서 사이클로스포린 A가 달성하는 이론적 최대 로드의 퍼센트를 도시한다.

[0028] 도 6은 본 발명의 교시에 따른 90%의 반용매에서 다양한 질량비의 사이클로스포린 A/FDKP 미립자를 이용하여 랫트 내 1회의 정맥 내 주사(IV) 및 폐 흡입(IS)의 약동학을 도시한다.

[0029] **본 발명의 상세한 설명**

[0030] 결정질 미립자와 함께 약학 활성제를 안정시키는 데 유용한 방법이 본 명세서에서 설명된다. 얻어지는 조성물은 결정질 미립자 표면상에 코팅된 안정한 활성제를 제공한다.

[0031] 본 명세서에서는 결정질 미립자 상에 코팅 또는 흡착되는 물질을 활성제로서 지칭한다. 활성제의 종류의 예는 치료, 예방 및/또는 진단 효용을 갖는 약학 조성물, 합성 화합물 및 유기 거대분자를 포함한다.

[0032] 일반적으로, 유기 거대분자, 핵산, 합성 유기 화합물, 폴리펩타이드, 펩타이드, 단백질, 폴리사카라이드 및 다른 당, 및 지질(이에 한정되지 않음)을 포함하는 결정질 미립자의 표면상에 대부분의 활성제를 코팅 또는 흡착할 수 있다. 펩타이드, 단백질 및 폴리펩타이드는 펩타이드 결합에 의해 연결되는 모든 쇄의 아미노산이다. 펩타이드는 일반적으로 30개 미만의 아미노산 잔기인 것으로 간주되나, 더 많은 아미노산을 포함할 수도 있다. 단백질은 30개 초과의 아미노산 잔기를 함유할 수 있는 중합체이다. 본 기술 분야에 공지되어 있고, 본 명세서에서 이용되는 것으로서 용어 폴리펩타이드는 펩타이드, 단백질 또는 다수의 펩타이드 결합을 함유하는 임의의 길이의 아미노산의 임의의 다른 쇄(일반적으로 10개 이상의 아미노산을 함유)를 지칭할 수 있다. 코팅 배합물에서 이용되는 활성제는 혈관작용제, 신경활성제, 호르몬, 항응혈제, 면역조절제, 세포독성제, 항생제, 항바이러스제, 항원 및 항체와 같은 다양한 생물학적 활성 부류에 속할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 사용될 수 있는 활성제의 예는 성장 호르몬, 항체 및 이의 단편, 알킨, 사이클로스포린(예를 들어, 사이클로스포린 A), PPACK(D-페닐알라닐-L-프롤릴-L-아르기닌 클로로메틸 케톤), CMFDA(5-클로로메틸플루오레세인 다이아세테이트), 텍사스 레드, 클로피오그렐, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 글루카곤 유사 펩타이드 1(GLP-1), 그렐린, 부갑상선 호르몬(PTH), 인슐린 및 인슐린 유사체(예를 들어, 아스파르트(aspart) 인슐린 및 인슐린) 및 항체 및 이의 단편(인간화 또는 키메라 항체; F(ab), $F(ab)_2$ 또는 단쇄 항체만으로 또는 다른 폴리펩타이드에 융합된 것; 암 항원, 시토킨, 감염체, 염증 매개물질, 호르몬 및 세포 표면 항원에 대한 치료 또는 진단 단일클론 항체를 포함하나 이에 한정되지는 않음)을 비제한적인 방식으로 포함한다. 종양 항원에 대한 항체의 비제한적인 예는 항-SSX-241-49(활막성 육종, X 파괴점(breakpoint) 2), 항-NY-ESO-1(식도 종양 관련 항원), 항-PRAME(흑색종의 우선 발현된 항원), 항-PSMA(전립샘-특이적 막 항원), 항-Melan-A(흑색종 종양 관련 항원), 항티로시나제(흑색종 종양 관련 항원) 및 항-MOPC-21(골수종 형질세포 단백질)를 포함한다.

[0034] **미립자**

[0035] 본질적으로, 용어 "미립자"는 정확한 외부 또는 내부 구조와 관계없이 약 0.5-1000 ㎛의 직경을 갖는 입자를 지칭한다. 미립자의 넓은 카테고리 내에서, "미소구체"는 균일한 구 형상을 갖는 미립자를 지칭한다. 본 명세서에서 이용되는 것으로서 결정질 미립자는 결정의 내부 구조(외부 형태는 필요한 것이 아님)를 가지고, 공간 격자 내 원자의 규칙적인 배열을 갖는 미립자를 지칭한다. 이온화 가능한 결정질 표면은 전기 전하를 운반하는 추가 능력을 가지는 결정질 미립자를 지칭한다. 몇몇의 구체예에서, 미립자는 단일의 규칙적 형상의 결정일 수 있다. 다양한 바람직한 구체예에서, 미립자는 임의의 조합으로 불규칙 형상이고, 다공성이고, 내부 표면에 접근 가능한 용해된 활성제를 가지거나, 또는 복합 결정을 포함한다. 이러한 특성은 일반적으로 표면적 및 로딩 용량을 증가시킬 것이다. 이러한 특성은 유리한 공기 역학 특성에 기여할 수도 있고, 활성제가 미립자를 포함하는 건조 분말의 흡입에 의해 전달되는 경우 중요하다.

[0036] 바람직하게는, 결정질 미립자를 구성하는 화학 물질은 전달되는 활성제와 가역적으로 반응하고, 무독성이고, 설치류 및 인간에 의해 비대사성이다. 전술한 것에도 불구하고, 독성의 몇몇 수준은 예를 들어, 환자가 노출되는 물질의 양 또는 치료되어야 하는 조건의 가혹함에 따라 허용될 수 있다. 유사하게는, 물질이 완전하게 대사공학적으로 비활성이어야 함은 필요하지 않다. 또한, 바람직한 미립자의 결정질 구조는 활성제와의 코팅 또는 결합 공정에서 실질적으로 파괴되지 않는다. 결정질 미립자의 조성은 미립자 표면에 대한 활성제의 흡착을 유도하기 위해 어떠한 유형의 화학적 상호작용이 조작될 수 있는지를 결정한다.

[0037] 다수의 물질을 이용하여 결정질 미립자를 형성할 수 있다. 그러한 것으로서 미립자는 표면을 가지고, 이의 성질은 본 출원과 동일한 날짜에 출원되어 동시 계류중인 미국 특허 출원 제__/_____호(Attorney Docket No. 51300-00025) 및 2005년 9월 14일에 출원된 미국 가출원 제60/717,524호(각각은 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입됨)에 개시되어 있는 코팅 공정에서 조작될 수 있다. 결정질 미립자를 형성할 수 있는 대표적인 재료는 방향족 아미노산 또는 다이케토피페라진 및 모폴린 설페이트와 같은, 한정된 pH 범위에서 제한된 용해도를 갖는 화합물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0038] 본 발명에서 고려되는 것으로서 미립자의 특정한 예 중 하나는 다이케토피페라진(DKP) 미립자이다. 본 명세서에

서 논의되는 바와 같이, DKP 미립자는 활성제의 흡착을 용이하게 하기 위해 사용된다. 미국 특허 제5,352,461호 및 제5,503,852호(각각은 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입됨)는 낮은 pH에서 안정하고, 혈액 또는 소장의 pH에서 용해되는 다이케토피페라진 유도체, 예컨대, 3,6-비스[*N*-푸마릴-*N*-(n-부틸)아미노](푸마릴 다이케토피페라진 또는 FDKP로서도 지칭됨; 또한 (E)-3,6-비스[4-(*N*-카복시-2-프로페닐)아미도부틸]-2,5-다이케토피페라진으로 불림)로부터 다이케토피페라진(DKP)의 형성을 기반으로 하는 약물 전달 시스템을 기술한다. 다이케토모폴린 및 다이케토다이옥산(이에 한정되지 않음)을 포함하는, 다이케토피페라진 구조적 요소 또는 이의 치환 유도체 중 하나를 기반으로 하는 시스템은 바람직한 크기 분포 및 pH 범위뿐 아니라 양호한 페이로드 내구력을 갖는 미립자를 형성한다. 광범위한 안정하고, 재현성 있는 특성은 치환기의 적절한 조작에 의해 발생할 수 있다. 이 특허들은 활성제를 포함하는 미립자를 형성하기 위해 활성제의 존재 하에서의 DKP의 침전을 개시하였다. 다이케토피페라진 및 다이케토피페라진 미립자의 합성, 제조 및 용도에 관한 더 자세한 설명은 미국특허 제6,071,497호; 제6,331,318호; 제6,428,771호 및 미국특허공개 제20060040953호 및 제20060041133호에 개시되어 있고, 각각은 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입된다. 다이케토피페라진 입자를 포함하는 조성물은 미국특허 제6,991,779호 및 미국특허공개 제20040038865호에 개시되어 있고, 각각은 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입된다.

[0039] 본 발명에서 고려되는 다른 다이케토피페라진은 3,6-다이(4-아미노부틸)-2,5-다이케토피페라진; 3,6-다이(숙시닐-4-아미노부틸)-2,5-다이케토피페라진(숙시닐 다이케토피페라진 또는 SDKP); 3,6-다이(말레일-4-아미노부틸)-2,5-다이케토피페라진; 3,6-다이(시트라코닐-4-아미노부틸)-2-5-다이케토피페라진; 3,6-다이(글루타릴-4-아미노부틸)-2,5-다이케토피페라진; 3,6-다이(말로닐-4-아미노부틸)-2,5-다이케토피페라진; 3,6-다이(옥사릴-4-아미노부틸)-2,5-다이케토피페라진 및 이로부터의 유도체를 포함한다. 다이케토피페라진 염도 본 발명에서 이용될 수 있고, 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염, 예컨대, Na, K, Li, Mg, Ca, 암모늄 또는 모노-, 다이- 또는 트라이-알킬암모늄(트라이에틸아민, 부틸아민, 다이에탄올아민, 트라이에탄올아민 또는 피리딘 등으로부터 유도된 것)을 포함할 수 있다. 염은 모노-, 다이- 또는 혼합 염일 수 있다. 다이케토피페라진(R기가 1개 초과의 산 기를 함유)의 경우 고 차수 염도 고려된다. 본 발명의 다른 측면에서, 약물과 다이케토피페라진 사이의 염 결합을 형성하기 위해 제제의 염기 형과 다이케토피페라진을 혼합할 수 있고, 그 결과 약물은 다이케토피페라진의 반대 양이온(counter cation)이 된다. 약물 전달용 DKP 염은 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입되는 미국특허출원공개 제20060040953호에 더 자세하게 개시되어 있다.

[0040] 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입되는 미국특허 제6,444,226호 및 제6,652,885호는 활성제의 용액이 첨가된 수성 현탁액 중의 DKP의 미립자의 제조 및 제공 단계, 및 현탁액을 동결 건조하여 활성제의 코팅을 갖는 미립자를 얻는 중요한 단계를 기술한다. 이러한 제형화의 기초는 활성제를 이용한 미립자의 코팅이 동결건조에 의한 액체 매질의 제거에 의해 유도된다는 것이다(본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입되는 미국특허 제6,440,463호 참조). 종래 기술에서의 교시와 대조적으로, 본 발명은 용매의 제거 이전에 미립자와 활성제의 결합을 조절하기 위한 수단을 제공한다. 따라서, 벌크 물리적 방법(예를 들어, 여과 또는 침전) 또는 증발 방법(예를 들어, 동결건조 또는 분무 건조)에 의한 액체 매질의 제거는 필적할만한 로드를 일으킬 수 있다.

[0041] **활성제의 흡착의 촉진**

[0042] 결정질 미립자의 표면에 대해 활성제를 흡착시키는 것은 다양한 용액 조건 하에서 용액 또는 유체 현탁액 내 활성제의 성질을 변화시키고, 이로써 미립자 표면에 대한 흡착을 촉진시키고, 용액에 잔존하는 활성제의 양을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 활성제에 대한 변경 또는 개질은 개질제, 예컨대, 카오트로프 및 코스모트로프, 염, 유기 물질, 예컨대, 알코올, 오스모라이트 및 계면활성제(이에 한정되지는 않음)를 이용하여 발생할 수 있다. 이 개질제는 활성제 그 자체는 화학적으로 변경되지 않으면서 이의 화학 전위 및 이의 구조, 가요성, 강성 또는 안정성을 변경하도록 활성제에 작용할 수 있다. 용어 "화학 전위"는 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 본 발명의 한 구체예에서, "화학 전위"는 예컨대, 미립자 상으로의 활성제의 흡착 또는 활성제와 용매 사이의 상호작용과 같은 화학 반응을 유도하기 위해 필요한 자유 에너지를 의미한다. 본 명세서에서 이용되는 것으로서 용어 "에너지적으로 선호되는"은 비코팅 미립자 또는 비결합 활성제 및/또는 활성제의 불용성 형태(응집물 또는 침전물 포함)의 자유 에너지 수준과 관련하여 미립자 상에 흡착된 상태의 활성제의 저하된 자유 에너지 수준을 지칭한다. 본 명세서에서 이용한 용어 "구조"는 활성제 분자의 2차 구조를 의미하고, 활성제 분자, 예컨대, 단백질의 알파 나선 구조, 베타 시트 구조, 또는 무작위 코일(무질서) 구조를 포함한다. 추가적으로, 용어 "구조"는 분자의 3차 및 4차 구조를 포함할 수도 있고(이에 한정되지는 않음), 분자의 자가 결합, 응집, 다량체화, 이합체화 등도 지칭할 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 것으로서 용어 "안정성"은 개질제의 존재 하에서 활성제의 구조의 안정 또는 불안정을 지칭한다.

[0043] 또한, 용액 또는 유체 현탁액 내 활성제의 성질의 변경은 활성제 및/또는 미립자의 소수성 성질, 수소결합 성질 및 정전기적 성질에 의한 상호작용에 영향을 줄 수 있다.

[0044] 소수성 상호작용은 물에서의 이의 불용성 때문에 수성 용액에서 비극성 기가 서로 결합하는 것이다. 소수성 상호작용은 (단일 분자, 2 또는 3개의 분자의 복합체 또는 더 큰 조립체의) 구조 안정화 및 동력학을 포함하는 다수의 분자 과정에 영향을 미칠 수 있고, 단백질-단백질 및 단백질-리간드 결합 과정에 중요한 기여를 할 수 있다. 이 상호작용은 단백질 폴딩의 초기 단계에서 역할을 하는 것으로 공지되어 있고, 복합 조립 및 자가 조립 현상(예를 들어, 막의 형성)에 포함된다.

[0045] 수소결합 상호작용은 분자들 사이의 특히 강한 쌍극자-쌍극자 힘이고, 극성 결합 내 수소 원자(예를 들어, H-F, H-O 또는 H-N)는 비공유 전자쌍(다른 분자 상의 전형적으로 F, O 또는 N 원자)을 갖는 이웃의 전기음성적 분자 또는 이온과의 인력을 경험할 수 있다. 수소결합은 물의 특유의 성질을 책임지고, 생물 분자의 조직에서, 특히 단백질 및 DNA의 구조에 영향을 미침에 있어서 매우 중요하다.

[0046] 정전기적 상호작용은 전하가 서로 가까워질수록 더 강해지는, 반대 전하 사이의 인력 또는 유사 전하 사이의 척력이다. 정전기적 상호작용은 이온 용액 내 하전체들 사이의 상호작용을 이해함에 있어서 중요한 성분을 구성한다. 예를 들어, 용매에 분산되는 콜로이드 입자의 안정성은 척력의 정전기적 상호작용과 인력의 반데르 발스 상호작용 사이의 경쟁을 고려하여 설명될 수 있다. 또한 입자들 사이의 상호작용 및 응착을 고려하는 경우 정전기적 상호작용은 매우 중요하다.

[0047] **염**

[0048] 본 발명의 몇몇 구체예에서, 염화 나트륨(이에 한정되지는 않음)과 같은 염을 이용하여 활성제의 성질을 변경한다. 활성제, 예를 들어, PTH 및 GLP-1은 염의 존재 하에서 현저한 구조적 변화를 수행한다. 실시예 5(도 4D)에서 나타나는 바와 같이, 염의 존재는 펩타이드의 더 나선형인 구조를 촉진함으로써 PTH의 2차 구조를 증가시킨다. 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입되는 2006년 4월 14일에 출원된 미국 가특허출원 제60/744,882호에 개시된 바와 같이, 염은 또한 GLP-1의 구조에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 더 나아가, 염 및 다른 이온 화합물은 특히 용액의 pH와 단백질 또는 펩타이드의 pI의 차가 더 커지게 되는 경우, 특히 하전된 잔기에 결합함으로써 단백질 및 펩타이드를 안정화시키거나 또는 불안정화시킬 수 있다(문헌 [Antosiewiez J, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 238:415-436, 1994] 참조).

[0049] **카오트로프**

[0050] 본 기술 분야에서 널리 공지되어 있는 것으로서 카오트로프는 물과 약한 상호작용을 나타내고, 단백질 또는 펩타이드와 같은 분자를 불안정화시키는 이온이다. 이 화합물은 물의 수소결합 네트워크를 파괴하고, 이의 표면 장력을 감소시키고, 따라서 단백질 및 펩타이드의 보다 구조적인 자유 및 변성을 촉진한다. 카오트로프의 예는 NaSCN, $(CH_3)_3N$-HCl, Na_2NO_3 및 $NaClO_4$ 및 염화 세슘(CsCl)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0051] 한편, 코스모트로프 또는 리오트로프(lyotrope)는 물과 강한 상호작용을 나타내고, 일반적으로 단백질 및 펩타이드과 같은 거대 분자를 안정화시키는 이온이다. 이러한 안정화 효과는 물의 차수를 증가시키고, 이의 표면 장력을 증가시킴으로써 일어난다. 코스모트로프의 예는 시트르산 나트륨(Na Citrate) 및 황산 나트륨(Na_2SO_4)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0052] **알코올**

[0053] 본 발명에서 사용되는 활성제의 개질제의 다른 부류는 알코올이다. 알코올은 단백질 및 펩타이드의 원시 구조를 파괴할 수 있고, 또한 거대분자 내, 가장 특히 비구조화 단백질 및 폴리펩타이드 내의 α-나선형 구조를 안정화시키고, 유도할 수 있다. 이러한 알코올은 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 트라이플루오로에탄올(TFE) 및 헥사플루오로아이소프로판올(HFIP)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이 중, TFE 및 HFIP는 펩타이드 및 단백질 내 나선형 전이를 유도하기 위해 가장 유력한 알코올 중 두 개이다(문헌 [Hirota *et al.*, *Protein Sci.*, 6:416-421; 1997] 참조, 상기 문헌 내의 펩다이드 및 단백질 내 나선형 전이에 관한 모든 내용을 본 명세서에 참조에 의해 편입된다). 이 알코올은 용매의 수소결합 성질을 파괴하는 능력을 통해 단백질 및 펩타이드의 구조에 영향을 미칠 수 있다(문헌 [Eggers and Valentine, Proteins *Sci.*, 10:250-261; 2001] 참조, 단백질의 구조에 대한 알코올의 효과에 관한 모든 내용이 본 명세서에서 참조의 의해 편입된다).

[0054] **오스모라이트**

[0055] 미립자에 대한 활성제 친화력에 영향을 미치는 개질제의 다른 부류는 오스모라이트이다. 오스모라이트는 통상의 기술자에게 널리 공지된 것으로서, 유기체가 고 스트레스 상황(예컨대, 극한 온도 변화, 높은 염 환경 등)에서 그들의 거대분자를 안정화시키기 위해 대부분의 유기체의 세포에 의해 생성되는 소 화합물이다. 이들은 거대분자와 직접적으로 상호작용하지 않지만, 세포 환경 내 용매 성질을 변경함으로써 작용하고, 따라서 이의 존재는 단백질의 안정성을 간접적으로 개질시킨다. 이 화합물은 다양한 폴리올, 당, 폴리사카라이드, 유기 용매 및 다양한 아미노산과 이의 유도체를 포함한다. 오스모라이트의 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았지만, 이 화합물은 원시 상태에 비해 변성 상태의 화학 전위를 증가시키고, 이로써 원시 및 변성 앙상블 사이의 (양의) 깁스 에너지 차(DG)를 증가시킴으로써 유사하게 작용하는 것으로 추측된다(문헌 [Arakawa and Timasheff, *Biochemistry* 29:1914-1923;1990] 참조).

[0056] 본 발명에서 고려되는 것으로서 오스모라이트는 헥실렌-글리콜(Hex-Gly), 트레할로스(trehalose), 글리신, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 트라이메틸아민 N-옥사이드(TMAO), 만니톨 및 프롤린을 비제한적인 방식으로 포함한다.

[0057] **방법의 일반적인 설명**

[0058] 본 발명의 방법에서, 3 이상의 성분(1 이상의 활성제, (사전 형성된) 미립자 및 전술한 것으로서 1 이상의 활성제 개질제)을 액체 매질에서 조합한다. 이 시스템의 성분은 임의의 순서로 조합할 수 있다. 몇몇의 구체예에서는 이 혼합물이 미립자의 현탁액과 조합되기 이전에 개질제 및 활성제를 서로 조합한다. 다른 구체예에서는 활성제 및 미립자를 먼저 조합하고, 그 다음 개질제를 첨가한다. 몇몇의 구체예에서, 활성제 또는 개질제는 용액으로서 제공되고, 다른 성분 또는 성분들과 조합된다. 다른 구체예에서, 임의의 성분은 고체 형태로 제공되어, 용해될 수 있거나, 또는 미립자의 경우에는 다른 성분을 함유하는 액체 매질에 현탁될 수 있다. 추가 변형은 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0059] 미립자는 시스템의 다른 성분과 조합되기 이전에 형성되고, 그 자체는 현탁액으로서 존재한다. 그럼에도 불구하고, 미립자가 때때로 현탁되어 있는 액체 매질은 본 명세서에서 용매로서 지칭된다. 본 방법에서 이용되는 액체 매질은 대부분 수성이다. 그러나 일부 예에서는 액체 매질은 개질제가 물인 것보다 개질제로서 이용되는 유기 화합물, 예를 들어, 알코올을 더 포함할 수 있다.

[0060] 시스템의 모든 성분의 조립에 있어서, 활성제는 미립자의 표면에 흡착될 것이다. 본 발명의 매우 바람직한 구체예에서, 적어도 50, 60, 70, 80, 90, 95% 또는 실질적으로 모두의 시스템 내 활성제는 미립자에 최대 100%로 흡착될 것이다. 본 발명의 몇몇의 구체예에서, 미립자의 접근 가능한 표면적은 미립자 표면과 직접적으로 접촉되는 흡착된 모든 활성제에 대해 충분할 것이다. 즉, 코팅은 단일층이다. 그러나, 추가 상호작용이 존재할 수 있음을 이해하여야 한다. 일부 경우에서는, 예를 들어, 활성제의 자가 조립 또한 에너지적으로 선호되어 활성제의 다중 층이 입자를 코팅한다. 이들 층 중 임의의 층이 완전하거나 또는 코팅의 두께가 균일할 필요는 없다. 자가 회합(self-association)의 2가지 유형, 즉, 다량체화(multimerization) 및 응집을 고려할 수 있다. 다량체화는 특정한 분자 간 상호작용 및 고정된 화학량론을 특징으로 한다. 응집은 불특정한 분자 간 상호작용 및 비결정된 화학량론을 특징으로 한다. 다량체화 활성제는 다량체화 상태로 흡착될 수 있거나, 또는 단량체 또는 저 차수 다량체로 해리되고, 그 상태로 표면에 흡착될 수 있음을 이해하여야 한다. 다른 경우, 응집은 미립자 상으로 활성제를 적층시킬 수 있다.

[0061] 로딩된 미립자는 다양한 형태로 이용될 수 있는 약물 전달 조성물을 구성한다. 입자는 분말로서, 정제와 같은 고체 투약 형으로 이용될 수 있거나 또는 캡슐 내에 함유될 수 있거나 또는 액체 담체에 현탁될 수 있다. 일반적으로 로딩이 일어나는 액체 매질의 교환 및/또는 제거를 필요로 할 것이다. 이는 물리적 방법, 예컨대, 침전 또는 여과(이에 한정되지 않음) 및 증발 방법, 예컨대, 동결건조 또는 분무 건조(이에 한정되지 않음)를 포함하는 다양한 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. 이 기술은 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 용매는 분무 건조에 의해 제거된다. 다이케토피페라진 미립자를 분무 건조하는 방법은 예를 들어, 2006년 2월 22일에 출원된 미국 가특허출원 제60/776,605호(다이케토피페라진 미립자의 분무 건조에 관한 모든 내용이 본 명세서에서 참조에 의해 편입됨)에 개시되어 있다.

[0062] 로딩이 실질적으로 완전하지 않은 경우, 용매 제거를 위해 물리적 방법을 이용하는 본 발명의 구체예는 전형적으로 비흡착 활성제를 놓아줄 것이지만, 예를 들어, 코팅이 단일층을 넘어서 진행하지 않는 것을 보장하는 데 유용할 수 있다. 역으로, 용매 제거를 위해 증발 건조를 이용하는 구체예는 몇몇의 경우에서, 입자상에 추가 활성제를 침착시켜 이의 손실을 피할 수 있지만, 포함되는 흡착 상호작용은 본 방법의 선행 단계에서 결합되는 분자에 의해 확립되는 상호작용과 상이할 수 있다. 다른 구체예에서, 증발에 의한 용매 제거는 실질적으로 모든

활성제가 이미 입자에 흡착되었던 경우를 포함하여, 활성제의 상당한 추가 침착을 일으키지 않는다.

실 시 예

[0063] 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 구체예를 증명하기 위해 포함된다. 통상의 기술자는 이하 실시예에서 개시된 기술이 본 발명의 실행에서 잘 작용하도록 본 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 따라서 이의 실행을 위해 바람직한 양식을 구성하는 것으로 고려될 수 있음을 이해하여야 한다. 특정한 메커니즘에 논의의 초점이 맞춰질 수 있지만, 복합 개질제는 활성제 또는 사실 입자 표면에 대해 복합 효과를 가질 수 있고, 이들 각각은 입자에 대한 활성제의 흡착을 촉진하는 데 기여할 수 있다. 그러나, 본 개시에 있어서, 통상의 기술자는 다수의 변경이 개시되어 있는 특정한 구체예에서 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어남 없이 여전히 동일한 또는 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해할 것이다.

[0064] 실시예 1

[0065] 실험 절차: 활성제/FDKP 미립자 흡착 연구 등

[0066] 활성제 인슐린, PTH, 그렐린 및 GLP-1은 American Peptide(캘리포니아주 써니베일) 또는 AnaSpec(캘리포니아주 산호세)로부터 구입하였거나 또는 직접 제조하였다(캘리포니아주 발렌시아의 MannKind Corporation). 다양한 pH 및 20℃(달리 기록하지 않았다면)에서 수성 시료를 분석하였다. 일반적으로 신선하게 시료를 제조하였고, FDKP 미립자의 첨가 이전에 특정한 첨가제(경우에 따라, 예를 들어, 염, pH 완충액 등)와 혼합하였다.

[0067] 현탁액 내 다이케토피페라진(DKP) 입자와 활성제의 결합은 흡착 연구를 수행함으로써 평가하였다. 흡착 연구에서 조사되는 변수는 활성제/푸마릴 다이케토피페라진(FDKP) 미립자 상호작용에 대한 정전기적 상호작용, 수소결합, 물 구조, 단백질 가요성 및 특정한 염-쌍 상호작용의 효과를 조사하였다. 또, 일부 통상의 단백질 안정화제는 FDKP 미립자 표면에 대한 활성제 흡착을 이용하여 간섭을 시험하였다.

[0068] 사전 형성된 FDKP 입자의 표면상에 활성제의 흡착을 촉진시키는 다양한 조건을 연구하였다. FDKP 미립자 현탁액 15 mg/mL을 3X pH 완충액 및 첨가제 또는 부형제의 3X 용액과 조합하였다. 최종 용액은 FDKP 미립자 농도 5 mg/mL 및 GLP-1 농도 0.25 mg/mL(5 중량%) 또는 PTH 농도 0.25 mg/mL(5 중량%) 또는 인슐린 농도 0.75 mg/mL(15 중량%) 또는 그렐린 농도 0.10 mg/mL(2 중량%)를 함유하였다. 현탁액을 여과하여 상청액 내 비결합 활성제를 제거하였다. 결합된 활성제를 갖는 FDKP 입자를 100 mM 중탄산 암모늄에 용해(재구성)시켰고, 여과하여 임의의 응집된 활성제 분자를 분리하였다. 상청액 및 재구성된 분획 내 활성제의 양을 HPLC로 정량하였다. 사용되는 조건이 염, 오스모라이트, 카오트로프 및 코스모트로프, 및 알코올과 같은 첨가제의 이용을 포함하는 일련의 실험을 수행하였다. 이하 이 연구의 결과를 기술한다.

[0069] 실시예 2

[0070] FDKP 입자상으로의 활성제의 흡착에 대한 카오트로프 및 코스모트로프의 효과

[0071] 소수성 메커니즘(낮은 pH에서)에 의한 FDKP 미립자 표면상으로의 활성제의 흡착을 조사하기 위해 물 및 단백질(카오트로프 및 코스모트로프)의 구조에 영향을 미치는 이온 종을 연구하였다. FDKP 입자상으로의 활성제의 로딩은 미립자 5 mg/mL 및 GLP-1 농도 0.25 mg/mL(5 중량%) 또는 PTH 농도 0.25 mg/mL(5 중량%) 또는 인슐린 농도 0.75 mg/mL(15 중량%)에서 수행하였다. 시료 내 카오트로프 또는 코스모트로프의 농도는 100 mM로 일정하게 유지하였고, pH는 2.0 내지 5.0로 변화시켰다. 카오트로프 또는 코스모트로프를 NaSCN, CsCl, Na_2SO_4, $(CH_3)_3N$-HCl, Na_2NO_3, Na 시트레이트 및 $NaClO_4$로부터 선택하였다. 대조군은 카오트로프 또는 코스모트로프를 첨가하지 않은 것을 의미한다.

[0072] 도 1A-1C은 다양한 카오트로프 또는 코스모트로프의 존재 하에서 pH의 함수로서 FDKP 미립자 표면상으로의 인슐린, GLP-1 및 PTH 각각에 대한 로딩 곡선을 도시한다. 낮은 pH(3.0)에서, 분석된 모든 카오트로프 및 코스모트로프는 미립자 표면에 대한 인슐린의 친화력을 개선하였고, 대조군에 비해 상당한 로딩을 보여주었다. pH 4에서, 이 효과는 관찰되지 않았다(도 1A). 높은 pH(5.0)에서, 카오트로프 및 코스모트로프는 대조군에 비해, 인슐린 단백질을 침전시킴으로써 미립자 표면에 대한 인슐린의 흡착을 방해하였다. 따라서 이 제제는 낮은 pH에서는 FDKP 입자에 대한 인슐린의 결합을 촉진하였지만, 높은 pH 조건에서는 거의 결합하지 않거나 또는 심지어 불리한 효과를 가진다.

[0073] 카오트로프 및 코스모트로프의 존재 하에서, GLP-1은 낮은 pH에서 더 큰 효과를 가지면서 pH 2.0-4.0에서 FDKP 미립자에 대한 개선된 친화력을 보여주었다(도 1B). 유사한 관찰이 미국 가출원 제60/744,882호에 개시되어 있

다. 그 문헌에는 GLP-1 펩타이드 대략 0.02-0.04 mg/mL(0.004 내지 0.008의 질량비에 해당함)이 NaSCN, $NaClO_4$, Na_2SO_4, $NaNO_3$ 및 Na 시트레이트의 존재 하에서 재구성된 미립자를 함유하지 않은 대조군 시료에서 검출되었음이 기록되어 있는데, 이는 낮은 비율의 GLP-1이 입자에 흡착되는 것보다 침전되었음을 나타낸다.

[0074] FDKP 미립자 표면에 대한 PTH의 친화력은 강한 카오트로프 NaSCN 및 $NaClO_4$의 존재 하에서 4.0 내지 약 4.5의 pH에서 더 컸다(도 1C).

[0075] 데이터는 카오트로프 및 코스모트로프 제제가 대부분의 특히 낮은 pH에서 FDKP 미립자 표면상에 활성제의 흡착을 촉진하는데 역할을 함을 입증한다. 이 개질제는 낮은 pH에서 더 큰 효과를 가지기 때문에, 미립자 표면이 덜 이온성인 경우, 흡착은 소수성 메커니즘으로부터 기인할 가능성이 있다. 높은 pH에서 관찰된 흡착의 감소는 카오트로프 및 코스모트로프 제제의 활성제의 소수성의 증가에 대한 영향과 함께, 입자의 더 고도로 하전된 표면으로부터 기인할 수 있다. 추가적으로, 이온 종으로서, 이 제제는 미립자에의 결합을 위한 활성제와 경쟁할 수 있거나 또는 활성제와 미립자 사이의 정전기적 상호작용을 파괴할 수 있다. 최종적으로 드바이 차폐(Debye shielding)가 더 크게 하전된 표면에 대한 흡착을 감소시키는 데 이용될 수 있음 또한 주목하여야 한다.

[0076] 실시예 3

[0077] FDKP 입자로의 활성제의 흡착에 대한 오스모라이트의 효과

[0078] 흡착에 대한 활성제의 중요성을 평가하기 위해, FDKP 입자로의 활성제의 결합에 대한 오스모라이트의 효과는 HPLC 분석에 의해 검사하였다. 도 2A-2C는 통상의 안정화제(오스모라이트)의 존재 하에서 pH의 함수로서, 인슐린(도 2A), GLP-1(도 2B) 및 그렐린(도 2C) 각각에 대한 FDKP 입자상으로의 로딩 곡선을 보여준다. FDKP 미립자상으로의 활성제의 로딩은 미립자 5 mg/mL 및 인슐린 농도 0.75 mg/mL(15 중량%) 또는 GLP-1 농도 0.25 mg/mL(5 중량%) 또는 그렐린 농도 0.10 mg/mL(2 중량%)에서 수행하였다. 시료 내 오스모라이트(안정화제)의 농도를 100 mM로 일정하게 유지하였고, pH를 약 2.0에서 약 5.0까지 변화하였다. 오스모라이트는 헥실렌-글리콜(Hex-Gly), 트레할로스, 글리신, PEG, TMAO, 만니톨 및 프롤린으로부터 선택되었고, 대조군은 오스모라이트가 없는 것을 의미한다.

[0079] 연구된 활성제 중에서, 인슐린은 3.0 내지 5.0의 pH 범위에 따라 오스모라이트(PEG, 글리신, 트레할로스, 만니톨 및 Hex-Gly)의 존재 하에서 현저하게 개선된 FDKP 입자 표면에 대한 친화력을 보여주었다(도 2A). 연구된 오스모라이트 중에서, PEG 및 프롤린은 2.0 내지 5.0의 pH 범위에 따라 FDKP 입자 표면상으로의 GLP-1의 흡착에 대한 친화력을 개선하였다. 오스모라이트 TMAO는 낮은 pH(2.0)에서 FDKP 미립자 표면상으로의 GLP-1의 결합 시에 PEG 또는 프롤린보다 더 효과적이었지만, pH 3.0 이상에서는 적당하게 불리하였다(도 2B). 그러나, 그렐린은 약 4.0 내지 5.0의 pH 범위에 따라 만니톨, PEG, 글리신, Hex-Gly 및 트레할로스 100 mM의 존재 하에서 대조군에 비해 미립자 표면에 대한 더 큰 친화력을 보여 주었다(도 2C).

[0080] 이 로딩 곡선은 오스모라이트가 FDKP 미립자 표면에 대한 활성제의 흡착을 향상시킬 수 있음을 제안하였다. 이 효과는 활성제를 안정화하는 개질제 능력(더 에너지적으로 선호되도록 흡착할 수 있게 함)으로부터 기인할 가능성이 있다.

[0081] 실시예 4

[0082] FDKP 입자에 대한 활성제의 친화력에 대한 알코올의 효과

[0083] 소수성 메커니즘에 의해 미립자 표면에 흡착되는 활성제에 대한 개질제의 효과를 평가함에 있어서, 알코올의 효과를 검사하였다. 수소결합 세기를 증가시켜 비구조화 펩타이드 및 단백질 내 나선형 구조를 도입하도록 공지되어 있는 알코올을 평가하여 FDKP 입자 표면으로의 활성제의 흡착에서 수행하는 역할을 결정하였다. GLP-1 및 그렐린과 같은 활성제를 분석하였다. FDKP 입자상으로의 활성제의 로딩은 미립자 5mg/mL 및 GLP-1 농도 0.25 mg/mL(5 중량%) 또는 그렐린 농도 0.10 mg/mL(2 중량%)에서 수행하였다. 각 알코올의 효과를 2.0 내지 5.0 범위의 pH에 대해 관찰하였다. 이용되는 알코올은 트라이플루오로에탄올(TFE) 및 헥사플루오로아이소프로판올(HFIP)이었다. 5%, 10%, 15% 또는 20% v/v를 포함하는 다양한 농도에서 각각의 알코올을 평가하였다.

[0084] 도 3A-3D는 각각의 알코올 및 각각의 활성제에 대한 pH 함수로서, 활성제의 FDKP 미립자 상으로의 로딩 곡선을 보여준다. pH 2.0-4.0에서, 그렐린 대 FDKP 입자의 질량비에 의해 증명되는 바와 같이, HFIP 및 TFE의 존재 하에서 그렐린은 모든 테스트 농도(5%, 10%, 15% 및 20%)에서 미립자 표면에 대해 더 크게 개선된 친화력을 보여주었다(도 3A-3B).

[0085] pH 2.0-5.0에서, HFIP 및 TFE의 존재 하에서 GLP-1은 표시한 농도(5% 및 10%)에서 미립자 표면에 대해 개선된 친화력을 보여주었다(도 3C-3D). TFE의 효과는 덜 현저하였고, 낮은 pH에서는 불리하였다. GLP-1의 일부가 침전하였음을 나타내는 실질적인 양의 GLP-1 펩타이드(0.13-0.19 mg/mL, 0.026 내지 0.038의 질량비에 해당함)가 pH 4.0에서 10% HFIP 및 TFE의 존재 하에서 재구성된 미립자 없는 대조군 시료 내에서 검출되었음을 주목하여야 한다. 그러나, 낮은 pH(2.0-3.0)에서, 10% HFIP 또는 TFE의 존재 하에서 재구성된 미립자 없는 대조군에서 검출된 GLP-1 펩타이드의 양은 현저하게 감소하였다. pH 3.0에서, GLP-1 펩타이드 0 내지 0.02 mg/mL(0 내지 0.004의 질량비에 해당함)가 검출되었지만, pH 2.0에서 대조군 시료의 경우 GLP-1이 검출되지 않았다. pH가 3.0으로 감소함에 따라 침전은 점점 부수적인 성분이 되지만, 도 3C-D에서의 질량비는 흡착 및 침전된 활성제 모두를 반영한다.

[0086] 데이터는 알코올이 FDKP 미립자 상으로의 활성제의 흡착을 개선할 수 있음을 보여주었다. 이러한 흡착의 증가는 알코올의 존재 하에서 활성제와 미립자의 표면 사이의 향상된 소수성 상호작용에 기인하는 것으로 생각된다.

[0087] 실시예 5

[0088] FDKP 입자로의 활성제의 흡착에 대한 염의 효과

[0089] 결합의 소수성 메커니즘을 더 해명하기 위해, HPLC 분석으로 미립자로의 활성제의 흡착에 대한 염의 효과를 관찰하였다.

[0090] FDKP 미립자 상으로의 활성제의 로딩은 0, 25, 50, 100, 250 및 500 mM NaCl의 존재 하에서 미립자 5mg/mL 및 인슐린 농도 0.75 mg/mL(15 중량%) 또는 GLP-1 농도 0.25 mg/mL(5 중량%) 또는 PTH 농도 0.25 mg/mL(5 중량%)로 수행하였다(도 4A-4C). 또한 FDKP 입자상으로의 PTH의 로딩을 1000 mM NaCl에서 평가하였다. pH 및 NaCl 농도의 함수로서 재구성된 미립자 없는 대조군 시료에서 검출된 활성제의 양을 평가하였다. 20 mM 인산 칼륨/20 mM 아세트산 칼륨 혼합물로 pH를 조절하였다.

[0091] 도 4A에서 관찰되는 바와 같이, FDKP 입자상으로의 인슐린의 증가된 결합(흡착)은 약 2.5 내지 약 3.5의 pH에서 100-500 mM의 높은 염 농도에서 증명되었다. 약 4.0 내지 약 5.0의 pH에서, 테스트된 모든 염 농도의 경우 FDKP 입자에 대한 인슐린의 흡착의 감소가 관찰되었다.

[0092] 약 2.0 내지 약 3.5의 pH에서, FDKP 입자에 대한 GLP-1의 향상된 결합(흡착)은 테스트된 모든 염 농도에서 증명되었다(도 4B). pH 4.0 및 더 높은 pH에서, 결합의 감소 또한 기록되었다.

[0093] 활성제로서 PTH를 이용하는 유사한 연구는 약 2.0 내지 약 3.5의 pH에서 250 내지 1000 mM의 높은 염 농도에서 FDKP 입자에 대한 PTH의 향상된 결합을 보여주었다(도 4C). 약 3.5 내지 약 5.0의 pH에서 미립자에 대한 PTH의 결합은 염의 존재 하에서 감소하였다.

[0094] 흡착이 선호되지 않는 낮은 pH에서, 염의 첨가는 미립자 표면에 대한 이의 친화력을 증가시키도록 활성제의 화학 전위를 개질할 수 있다. 이러한 결합의 향상은 소수성 메커니즘으로부터 기인하는 것 같다. 더 나아가, 데이터는 pH가 증가함에 따라, 염 농도가 증가하면서 흡착이 감소함을 나타내었다. pH가 증가하면서 미립자 표면이 더 하전 됨에 따라, 가정된 소수성 메커니즘은 활성제의 흡착의 촉진 시에 덜 효과적인 것으로 예측될 수 있다. 이 감소는 또한 미립자의 표면 상 결합 부위에 대해 경쟁적인 염으로부터 기인하였을 수 있다. 드바이 차폐 또한 관찰되는 감소된 흡착에 기여할 수 있음을 주목해야 한다.

[0095] 데이터는 또한 염이 활성제의 구조를 개질시킬 수 있음을 보여주었다. 예를 들어, PTH를 이용하는 원편광 이색성 측정은 염 농도가 증가함에 따라, 펩타이드의 2차 구조가 더 나선형인 형태를 선택하였음을 보여주었다(도 4D). 이는 PTH의 구조에서의 변화가 낮은 pH에서 미립자 표면에 대한 이의 결합을 촉진할 수 있음을 제안하였다.

[0096] 수용액에서, 염의 존재는 또한 미립자의 표면상에 염료 텍사스 레드를 분배하는 것으로 나타났다.

[0097] 실시예 6

[0098] FDKP 입자로의 사이클로스포린 A 흡착에 대한 효과

[0099] 활성제로서 사이클로스포린 A를 이용하여 세포 외 및 세포 내 모두에서 FDKP 입자 상으로의 소수성 소 분자의 흡착에 대한 효과를 조사하였다. 흡착은 활성제의 용해도를 개질시킴으로써 촉진되었다.

[0100] 소수성 분자가 미립자에 어떻게 흡착될 수 있는 지를 보여주기 위해 사이클로스포린 A, 친유성 환형 폴리펩타이

드를 연구하였다. 또, 사이클로스포린 A(분자량 1202.61)의 크기를 이용하여 소 화합물에 대한 미립자의 로딩 용량을 증명하였다.

[0101] 로딩을 완성하기 위해, 용매/반용매 방법을 사용하였다. 이 방법론의 기초 원리는 용매(메탄올)에서 화합물을 용해시키고, 용액의 외부 및 미립자의 표면상으로 화합물을 유도하기 위해 반용매(물)를 이용하는 것이다. 이 용매/반용매 접근법을 이용하여, 사이클로스포린 A는 미립자의 표면상에 성공적으로 로딩되었다.

[0102] 용해도 프로파일을 결정하기 위한 예비 실험에서, 사이클로스포린 A를 메탄올 ㎖당 10 ㎎으로 용해하였고, 반용매의 농도(10-90% H_2O in 10% 증분)를 변화시키면서 1 ㎎/mL에서 이의 용해도를 HPLC로 분석하였다. 메탄올만을 함유하는 시료와 사이클로스포린 A 피크 면적을 비교하여 침전에 대한 손실 퍼센트를 결정하였다. 용해도가 60% H_2O 미만으로 대부분 유지되었음이 관찰되었다. 70% H_2O에서, 제제의 상당한 부분이 불용성이었고, 80-90% H_2O은 5% 미만의 용해도를 유지하였다.

[0103] 입자 로딩을 평가하기 위해, FDKP 미립자를 사이클로스포린 A의 메탄올 용액에 현탁시켰다. 물을 60, 80 및 90%의 최종 농도까지 단계적으로 첨가하였다. 시료의 반을 펠렛화하였고, 다른 반은 동결건조하였다. 각 반을 최종 비율이 20%의 FDKP 미립자/사이클로스포린 A, 20%의 0.5 M 암모늄 바이카보네이트(AmBicarb) 및 60%의 모든 메탄올 미립자 및 사이클로스포린 A의 용해에 필요한 농도)가 되도록 재용해시켰다. 각각의 사이클로스포린 A 함량은 HPLC로 분석하고, 비교하여 입자에 흡착되었던 비율을 결정하였다. 결과를 도 5A에 나타낸다. 60% H_2O에서, 약 20%의 사이클로스포린 A가 입자에 결합되었음을 관찰하였다. 80% 및 90% H_2O에서, 로드는 각각 약 90% 및 95%이고, 이는 FDKP 미립자에 대한 사이클로스포린 A의 강한 결합을 나타낸다.

[0104] 사이클로스포린 A에 대한 미립자의 로딩 용량은 모든 사이클로스포린 A가 흡착되었다는 가정 하에 회수된 고체의 최종 함량이 2% 내지 20%가 되도록 사이클로스포린 A의 입력량을 변화시킴으로써 90% 반용매 수준에서 분석하였다. 입력량이 이 범위에 걸쳐 증가함에 따라 미립자에 결합된 이용가능한 사이클로스포린 A의 퍼센트가 입력량의 50% 내지 95%가 증가하였음을 관찰하였다(도 5B). 사이클로스포린 A의 용해도가 90% H_2O에서 0.05 ㎎/mL 임을 고려하면, 이 결과가 불용성 사이클로스포린 A의 실질적으로 모두가 석출된 것이 아니라 입자에 흡착되었음을 나타냄을 주목하여야 한다.

[0105] 실시예 7

[0106] 사이클로스포린 A/DKP 입자의 폐 흡입

[0107] 사이클로스포린 A/FDKP 미립자의 약물동력학을 평가하기 위해, 사이클로스포린 A의 플라즈마 농도를 폐 흡입 또는 정맥 내 주사를 통해 사이클로스포린 A/FDKP 미립자의 다양한 제제를 투여한 암컷 스프라그 다울리(Sprague Dawley) 랫트로 측정하였다. 상기 실시예에서 기술된 바와 같이 0.05, 0.10 또는 0.20의 최대 질량 비 및 90% 반용매에서 제조되는 사이클로스포린 A/FDKP 미립자를 이용하여 이 연구를 수행하였다. 이는 5%, 10% 및 20% 로드로서 지칭된다.

[0108] 2.5 ㎎ 사이클로스포린 A/FDKP 미립자의 1회 투약이 폐 흡입 또는 정맥 내 주사를 통해 8 그룹의 랫트에 전달되었다. 투약 전(시간 0) 및 5, 20, 40, 60, 240, 480분 및 투약 후 24시간에서 각 그룹에 대한 투약 일에서 혈액 시료를 채취하였다. 각 시점에서, 대략 100 mL의 전혈을 측면의 꼬리 정맥으로부터 세포동결 용기(cryovial) 내로 수집하였다, 뒤집어서 얼음에 저장하였다. 혈액 시료를 4000 rpm에서 원심분리하였고, 분석될 때까지 -80℃에서 저장되었던 96-웰 플레이트 내로 대략 40 ㎕ 플라즈마를 피펫팅하였다.

[0109] 도 6에 도시된 바와 같이, 폐 흡입을 통한 FDKP 미립자/사이클로스포린 A 2.5 ㎎의 투여는 암컷 스프라그 다울리 랫트의 투약 후 24시간에서 최대 혈청 사이클로스포린 수준을 초래하였다. 10% 로드가 이 시점에서 32.4 ng/mL의 $C_{최대}$를 달성하였다. FDKP 미립자 2.5 ㎎/사이클로스포린 A 0.1 mL를 정맥 내 주사를 투여한 동물은 투약 후 24시간까지 사이클로스포린의 최소 수준 결과를 보여주었다. 정맥 내 및 폐 흡입 군 모두의 경우 FDKP 미립자 수준은 투약 후 20분에서 피크였고, 4시간 내에 기준선 수준으로 되돌아감을 관찰하였다.

[0110] 전체적으로, 데이터는 사이클로스포린 A/FDKP 미립자의 생물학적 이용가능성을 보여준다. 240분에서의 단일 피크가 이례적임을 주목하여야 한다. 치료된 모든 동물의 경우, 육안 및 현미경 관찰에 의해 결정되는 바와 같은 병리학은 정상이었다.

[0111] 다른 언급이 없는 한, 본 상세한 설명 및 청구항에서 이용된 성분의 양, 분자량과 같은 특성, 반응 조건 등을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 있어서 용어 "약"에 의해 변동 가능한 것으로 이해하여야 한다. 따라서, 반

하는 지시가 없는 한, 이하 상세한 설명 및 첨부된 청구항에서 기재된 수치 변수는 본 발명에서 추구하는 목적하는 특성에 따라 변화가능한 근사치이다. 적어도 그리고 본 특허 청구범위의 균등범위의 출원을 제한하는 시도로서가 아니라, 각각의 수치 변수는 적어도 보고된 여러 유의성 있는 숫자의 견지에서 통상의 라운딩 기법을 적용하여 해석되어야 한다. 본 발명의 넓은 범위가 기재된 수치 범위와 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 구체적 실시예에 기재된 수치는 가능한 정확하게 기재된다. 그러나, 어떤 수치도 본질적으로 각각의 시험 측정시 나타나는 표준 편차로부터 필수적으로 발생하는 특정 에러를 포함한다.

[0112] 본 명세서에서 다른 언급이 없는 한, 또는 문맥에 의해 명확히 모순되지 않는 한, 본 발명을 기술하는 문맥에서 (특히 하기 청구항의 문맥에서) 이용되는 용어 "하나의" 및 "상기" 및 유사한 표현은 단수 및 복수 모두를 나타내는 것으로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 수치 범위의 상술은 단지 그 범위 내에 있는 각각의 분리된 수치를 개별적으로 언급하는 방법의 속기를 위한 것이다. 본 명세서에서 다른 언급이 없는 한, 각 개별적인 수치는 마치 본 명세서에서 개별적으로 언급된 것처럼 본 명세서에 통합되어 있다. 본 명세서에서 다른 언급이 없는 한, 또는 문액에 의해 명확히 모순되지 않는 한, 본 명세서에서 기술한 모든 방법은 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 임의의 그리고 모든 실시예 또는 예시적 용어(예를 들어, "과 같은", "예컨대")의 사용은, 단지 본 발명을 더 명백하게 하기 위한 것이며, 본 발명의 청구범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서 내의 어떠한 용어도 본 발명의 실행에 필수적인 임의의 비주장된 구성요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0113] 청구항에서 사용된 용어 "또는"은, 양자택일만을 의미하거나 또는 양자택일이 서로 배타적인 것을 명백하지 나타내지 않는 한, 본원이 단지 양자택일 및 "및/또는"을 의미하는 정의를 지지함에도 불구하고, "및/또는"을 의미하기 위해 사용될 것이다.

[0114] 본 명세서에서 개시된 본 발명의 대체 구성요소 또는 구체예의 군이 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 각 군의 요소는 개별적으로 또는 상기 군의 다른 요소 또는 본 명세서에서 개시된 다른 구성요소와의 조합으로 지칭되거나 주장될 수 있다. 편의성 및/또는 특허성을 이유로, 군의 하나 이상의 요소가 군에 삽입되거나 군에서 삭제될 수 있다고 예상된다. 이러한 삽입 또는 삭제가 발생할 때, 본 명세서는 개질되어 첨부된 청구항에서 사용된 임의의 그리고 모든 마쿠쉬 군의 기재 사항을 실행하는 군을 포함하는 것으로 간주한다.

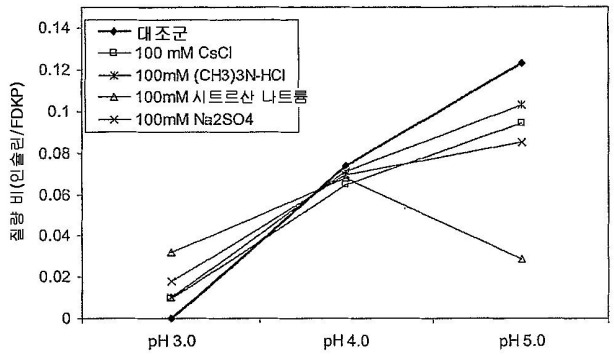
[0115] 이 발명의 바람직한 구체예는 본 발명을 수행함에 있어 본 발명자가 알고 있는 최상의 모드를 포함하여 본 명세서에서 기술된다. 물론, 이러한 바람직한 구체예의 개질은 상기의 것을 읽음으로써 당업자에게 명백해질 것이다. 본 발명자는 당업자들이 적절한 개질을 활용하는 것을 기대하며, 본 발명자는 본 발명이 본 명세서에서 구체적으로 기술한 것 이상으로 실행될 것을 기대한다. 따라서, 본 발명은 적용되는 법에 의해 허가되는 한 첨부된 청구항에 언급된 내용의 모든 개질 및 균등물을 포함한다. 또한, 본 명세서에서 다른 언급이 없거나 또는 문맥에 의해 명확히 모순되지 않는 한, 이들의 가능한 모든 개질 내에서 상기 구성요소의 임의의 조합도 본 발명에 포함된다.

[0116] 더 나아가, 본 명세서 전체에 걸친 참조문헌들은 특허 되었거나 공개되었다. 상기 인용된 각 참고문헌 및 공개물은 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 개별적으로 편입된다.

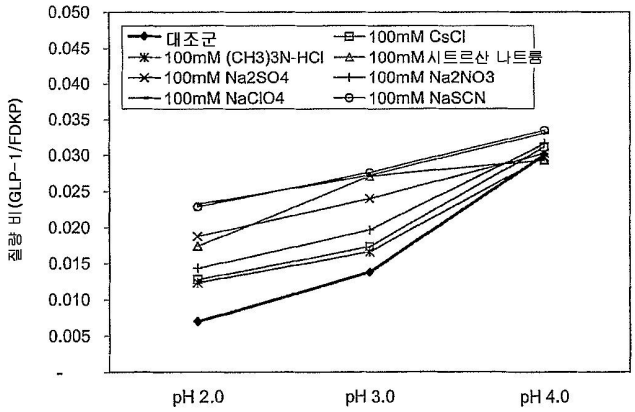
[0117] 마지막으로, 본 명세서에서 개시된 본 발명의 구체예는 본 발명의 원리를 설명하기 위한 것으로 이해되어야 한다. 적용 가능한 기타 개질은 본 발명의 범위 내이다. 따라서, 실시예를 통해, 본 발명의 대체 구성이 본 명세서의 교시에 따라 사용될 수 있으며, 이들로써 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 상세하게 기재 및 도시된 내용으로 제한되는 것은 아니다.

도면

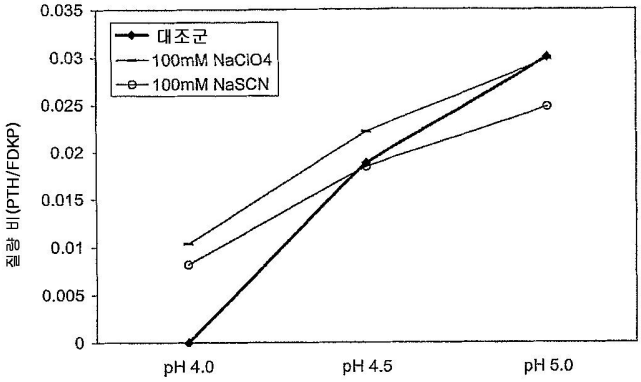
도면1A



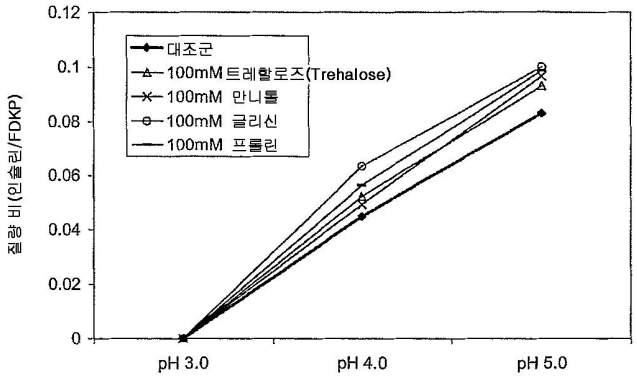
도면1B



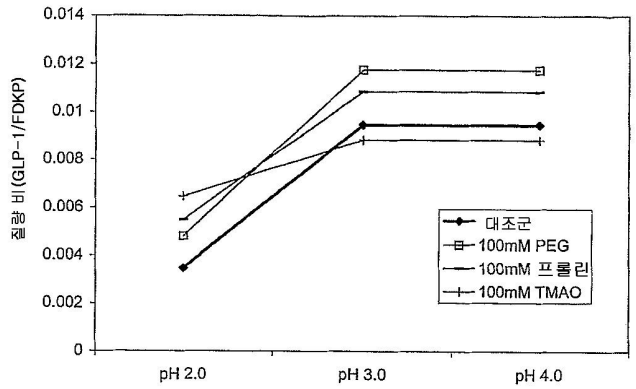
도면1C



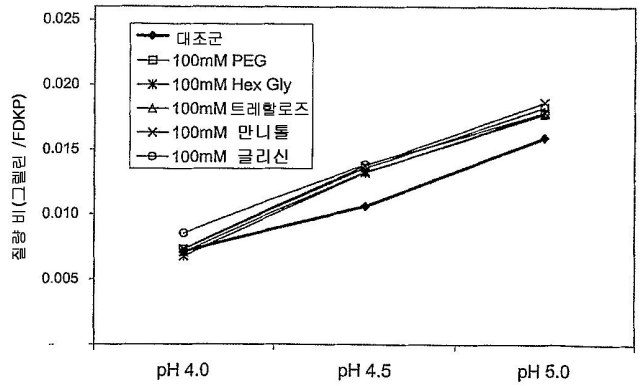
도면2A



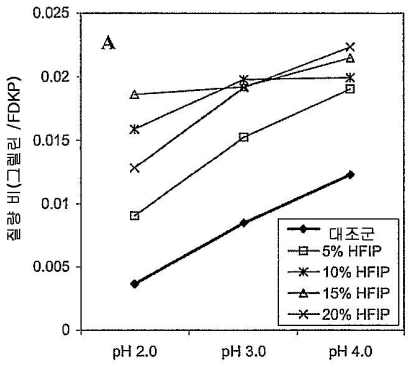
도면2B



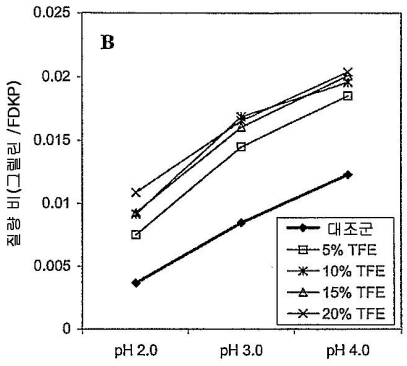
도면2C



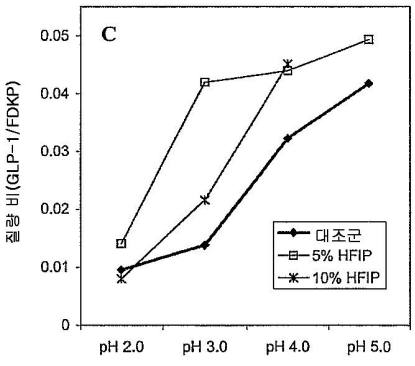
도면3A



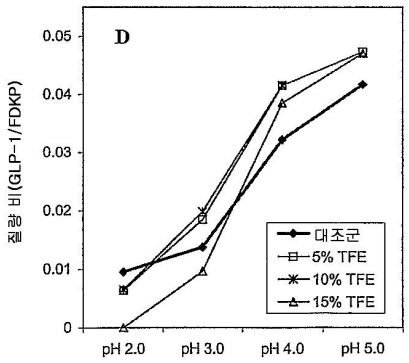
도면3B



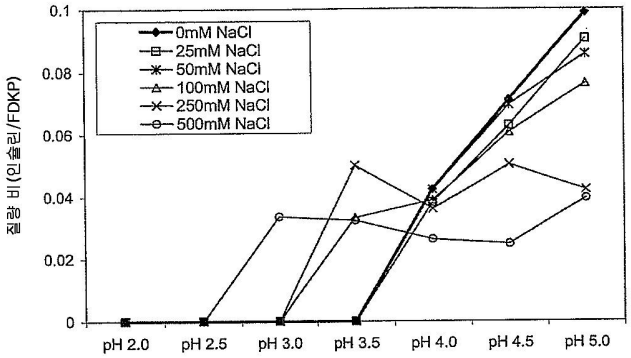
도면3C



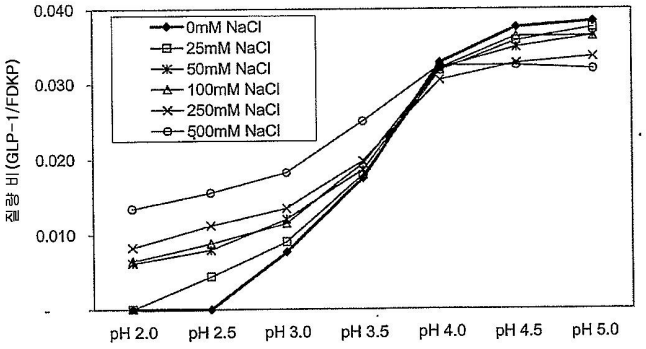
도면3D



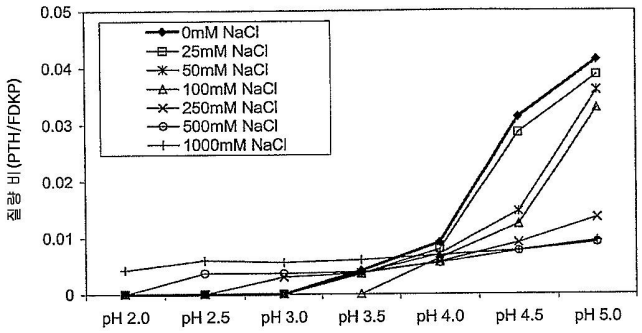
도면4A



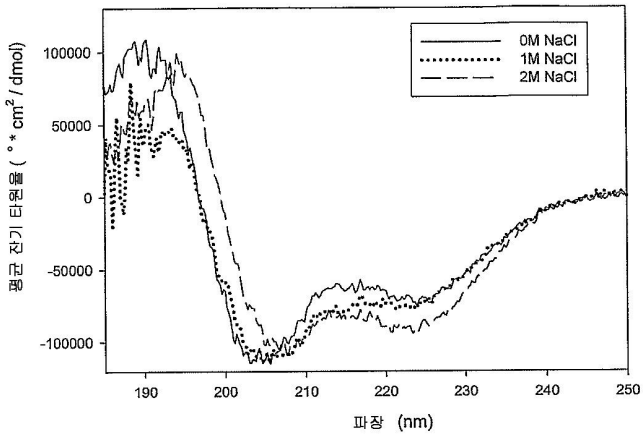
도면4B



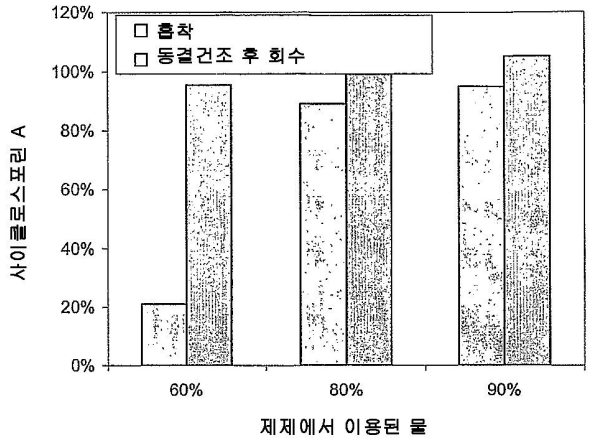
도면4C



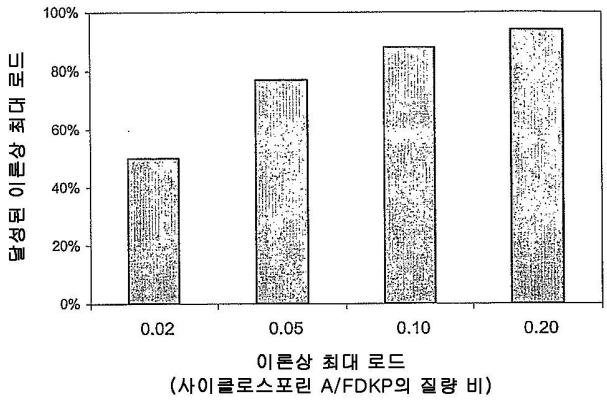
도면4D



도면5A



도면5B



도면6

수컷 스프라그 다울리(Sprague Dawley) 랫트에 단일 폐 흡입 또는
정맥 내 주사를 통해 투여되는 사이클로스포린/FDKP를 이용하는 약동학 연구

