



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년06월09일
(11) 등록번호 10-1040415
(24) 등록일자 2011년06월02일

(51) Int. Cl.

A61K 9/22 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7023967

(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년04월15일

심사청구일자 2006년11월15일

(85) 번역문제출일자 2006년11월15일

(65) 공개번호 10-2007-0011506

(43) 공개일자 2007년01월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/011547

(87) 국제공개번호 WO 2005/110425

국제공개일자 2005년11월24일

(56) 선행기술조사문헌

미국공개특허공보 2003/0003074

(73) 특허권자

알케르메스, 인코포레이티드

미국 매사추세츠 캄브릿지 시드니 스트리트 88 (우: 02139)

아밀린 파마슈티칼스, 인크.

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 타운센터 드라이브 9360

(72) 발명자

라이트, 스티븐, 지.

미국 45243 오하이오 메데라 주니퍼뷰 레인 7012

크리스틴선, 트로이

미국 45040 오하이오 마손 찰스톤 릿지 드라이브 8573

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

남상선

전체 청구항 수 : 총 15 항

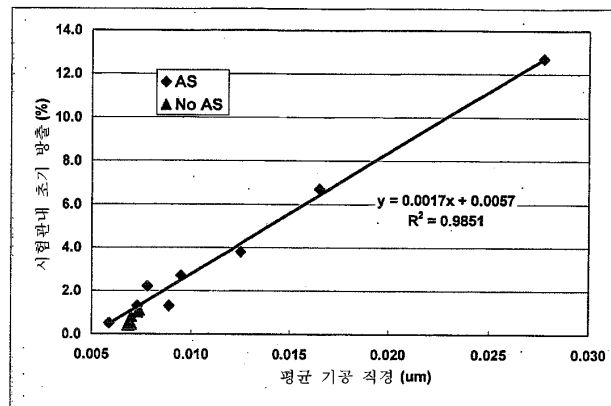
심사관 : 한정희

(54) 중합체 기재 지속적 방출 방법

(57) 요약

본 발명은 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출 조성물, 및 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출 조성물의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 이러한 지속적 방출 조성물은 생물학적 활성 폴리펩티드 및 당이 내부에 분산된 생적합성 중합체를 포함한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

예, 테안, 와이.

미국 02035 매사추세츠 폭스보로 스피루세 스트리트 22

릭키, 미첼, 이.

미국 45142 오하이오 모로우 오스세오라 로드 5705

햇즈, 조이세, 엠.

미국 45429 오하이오 신시네티 파인코브 코우트 8219

쿠말, 라제쉬

미국 01801 매사추세츠 우번 #36 로쿠스트 스트리트 111

콘스탄티노, 헨리, 알.

미국 98021 워싱턴 우드인빌레 156 애브뉴 엔이 14447

파인맨, 마크

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 타운센터 드라이브 9360 아밀런 파마슈티칼스, 인크. (내)

로켄스가드, 데이비드

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 타운센터 드라이브 9360 아밀런 파마슈티칼스, 인크. (내)

웅, 존

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 타운센터 드라이브 9360 아밀런 파마슈티칼스, 인크. (내)

스미스, 크리스틴

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 타운센터 드라이브 9360 아밀런 파마슈티칼스, 인크. (내)

특허청구의 범위

청구항 1

생물학적 활성 폴리펩티드를 방출 기간 동안 지속적으로 방출시키기 위한 미세입자 형태의 조성물로서,

조성물 전체의 중량을 기준으로, 5 중량%의 엑센딘-4 및 2 중량%의 수크로오스가 분산된 3 내지 25 중량%의 생적합성 중합체를 포함하며,

조성물의 전체 기공 용적이 수은 압입 기공측정법을 이용하여 측정되는 경우 0.1mL/g 이하여서, 방출 기간 동안의 엑센딘-4의 평균 혈청 농도 (C_{ave})에 대한 방출 기간 동안의 엑센딘-4의 최대 혈청 농도 (C_{max})의 비율이 3 이하인 방출 프로필을 제공하며,

상기 생적합성 중합체는 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리(락타이드-코-글리콜라이드), 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 이의 배합물 및 이의 공중합체로부터 선택되는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 생적합성 중합체가 1:1의 락타이드:글리콜라이드 비를 갖는 정제된 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)인 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 생적합성 중합체가 1:1의 락타이드:글리콜라이드 비 및 45 내지 64 kD의 분자량을 갖는 정제된 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)인 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 조성물로부터 엑센딘-4이 방출되는 속도를 변화시키는 추가의 부형제를 포함하지 않는 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 4항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관 내 엑센딘-4의 초기 방출이 0.5% 미만인 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 4항 중 어느 한 항에 있어서, 타입 II 당뇨병 치료를 위한 제약학적으로 수용가능한 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 타입 II 당뇨병 치료를 위한 제약학적으로 수용가능한 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

폴리펩티드의 지속적 방출을 위한 미세입자를 제조하는 방법으로서,

(a) 엑센딘-4 및 수크로오스를 포함하는 수성 상을 생적합성 중합체 및 중합체용 용매를 포함하는 오일 상과 혼합하여 혼합물을 형성시키는 단계로서,

상기 생적합성 중합체는 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리(락타이드-코-글리콜라이드), 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 이의 배합물 및 이의 공중합체로부터 선택되는 단계;

(b) 상기 단계 a)로부터의 혼합물의 유중수 에멀션을 형성시키는 단계로서, 내부 에멀션 점적 크기가 0.5 마이크로미터 미만인 단계;

(c) 코아세르베이션 체제를 에멀션에 첨가하여 초기 미세입자를 형성시키는 단계로서, 상기 코아세르베이션 체제는 1:1 내지 1.5:1의 실리콘 오일 대 중합체 용매 비가 달성되는 양으로 첨가되는 실리콘 오일인 단계;

(d) 초기 미세입자를 켄칭 용매(quench solvent)로 전달하여 미세입자를 경화시키는 단계;

(e) 경화된 미세입자를 수거하는 단계; 및

(f) 경화된 미세입자를 건조시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 생적합성 중합체가 오일 상 내에 10 중량% 이하로 존재하는 방법.

청구항 25

제 23항에 있어서, 생적합성 중합체가 정제된 50:50 DL PLG 4A 중합체이고, 중합체 용매가 메틸렌 클로라이드인 방법.

청구항 26

제 23항에 있어서, 단계 b)의 내부 에멀션 점적 크기가 0.2 마이크론 미만인 방법.

청구항 27

제 23항에 있어서, 실리콘 오일 대 중합체 용매 비가 1.5:1인 방법.

청구항 28

제 23항에 있어서, 단계 c)에서, 코아세르베이션 제제를 3 내지 5분의 시간에 걸쳐 에멀션에 첨가하는 방법.

청구항 29

제 23항에 있어서, 단계 d)에서, 켄칭 용매가 헵탄/에탄올 혼합물인 방법.

청구항 30

제 23항에 있어서, 미세입자의 전체 기공 용적이 수은 압입 기공측정법을 이용하여 측정되는 경우 0.1mL/g 이하로서, 방출 기간 동안의 엑센딘-4의 평균 혈청 농도 (C_{ave})에 대한 방출 기간 동안의 엑센딘-4의 최대 혈청 농도 (C_{max})의 비율이 3 이하인 방출 프로필을 제공하는 방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

명세서

[0001] 발명의 배경

[0002] 본원에서 폴리펩티드로서 총칭하고 있는 많은 단백질 및 펩티드는 생체내 생물학적 활성을 나타내며 약물로서 유용하다. 많은 질병 또는 질환은 지속된 수준의 약물을 투여하여 가장 효과적인 예방 및/또는 치료 효과를 제공하는 것을 필요로 한다. 지속된 수준은 종종 빈번한 피하 주사에 의한 생물학적 활성 폴리펩티드의 투여에 의해 이루어지며, 이러한 투여는 약물 수준의 변동 및 낮은 환자 만족도를 초래한다.

[0003] 대안적인 방법으로서, 약물을 캡슐화하는 생분해성 물질, 예컨대, 중합체가 지속적인 전달 시스템으로서 사용될

수 있다. 예를 들어, 미세입자 또는 마이크로담체 형태의 생분해성 중합체를 사용하면 약물의 방출을 조절해서 보다 일정하고 지속적인 수준으로 약물을 제공하며 환자의 만족도를 개선시킬 수 있도록 중합체의 고유의 생분해성을 이용함으로써 약물을 지속적으로 방출시킬 수 있다.

[0004] 그러나, 이들 지속적 방출 계획은 종종 약물을 초기에 많이 방출하고 그 후에는 소량으로 방출하여, 치료 범위를 벗어나는 혈청 약물 수준 및 약물의 불량한 생체이용도를 초래한다. 또한, 중합체의 존재, 생리학적 온도 및 지속적 방출 조성물에 대한 신체 반응은 약물을 변경 (예를 들어, 분해, 응집)시켜서, 약물의 요구되는 방출 프로필을 방해할 수 있다.

[0005] 또한, 지속적 방출 조성물을 형성시키는데 사용된 방법은 약물의 불안정성 및 가공 단계의 분해 효과에 기인해서 약물 활성의 상실을 초래할 수 있다. 분해 효과는 약물이 폴리펩티드인 경우에 특히 문제이다.

[0006] 따라서, 전달된 폴리펩티드의 양이 치료 수준에 있으며 요구된 방출 기간 동안 활성 및 효능을 유지하는 지속된 양상으로 생물학적 활성 폴리펩티드를 투여하는 수단에 대한 요구가 여전하다. 이러한 문제를 해결하기 위한 많은 연구가 개발되고 있지만, 새로운 해결책이 요구되고 있다.

[0007] 발명의 요약

[0008] 본 발명은 우수한 방출 프로필 (예컨대, 약 3 이하의 C_{ave} 에 대한 C_{max} 비율에 특징이 있는 방출 프로필)이 제조 공정에서 실리콘 오일 대 중합체 비율을 최적화하여 작은 기공 용적을 달성함으로써 몇 가지 성분을 함유하는 제형으로 달성될 수 있다는 발명에 관한 것이다. 본 발명은 약제, 예컨대, 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출을 위한 조성물, 및 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출을 위한 조성물을 형성시키고 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 지속적 방출 조성물은 생적합성 중합체, 약제, 예컨대, 생물학적 활성 폴리펩티드, 및 당을 포함한다. 폴리펩티드 및 당은 바람직하게는 중합체에 분산된다. 폴리펩티드 및 당은 개별적으로 또는 바람직하게는 함께 분산될 수 있다. 지속적 방출 조성물은 적합하며 지속적인 방출 프로필을 나타낸다. 특정의 구체예에서, 방출 프로필은 약 3 이하의 C_{ave} 에 대한 C_{max} 비율을 지니는 것으로 특성화된다. 바람직한 구체예에서, 생물학적 활성 폴리펩티드는 항당뇨병성 또는 당조절성 폴리펩티드, 예컨대, GLP-1, GLP-2, 엑센딘-3 (exendin-3), 엑센딘-4 및 이의 유사체, 유도체 또는 효능제, 바람직하게는, 엑센딘-4이다. 당은 바람직하게는 수크로오스, 만니톨, 또는 이의 조합물이다. 바람직한 조합물은 엑센딘-4 및 수크로오스 및/또는 만니톨을 포함한다.

[0009] 또한, 또는 대안적으로, 지속적 방출 조성물은 생적합성 중합체, 약제, 예컨대, 생물학적 활성 폴리펩티드 및 당을 포함하며, 여기서 상기 조성물은 약 0.1mL/g 이하의 전체 기공 용적을 지닌다. 특정의 구체예에서, 전체 기공 용적은 수은 압입 공극 측정기 (mercury intrusion porosimetry)를 사용함으로써 측정된다.

[0010] 부가적으로 또는 대안적으로, 지속적 방출 조성물은 생적합성 중합체, 약 3중량% 내지 5중량%의 엑센딘-4 및 약 2 중량%의 수크로오스를 필수적으로 하여 구성되거나, 대안적으로는, 상기 성분 및 함량을 포함하여 구성된다. 생적합성 중합체는 바람직하게는 폴리 락타이드 코글리콜라이드 중합체이다.

[0011] 본 발명은 또한 생물학적 활성 약제, 예컨대, 폴리펩티드의 지속적 방출을 위한 조성물을 형성시키는 방법으로, 물, 약제, 예컨대, 수용성 폴리펩티드, 및 당을 포함하는 수성상을 생적합성 중합체 및 중합체용 용매를 포함하는 오일상과 혼합하여 혼합물을 형성시키고; 혼합물을 예를 들어, 초음파처리 또는 균질화시켜 유중수 에멀션을 형성시키고; 실리콘 오일을 혼합물에 첨가하여 초기 미세입자를 형성시키고; 초기 미세입자를 킨칭 용매 (quench solvent)에 옮겨 미세입자를 경화시키고; 경화된 미세입자를 수거하고; 경화된 미세입자를 건조시키는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 특정의 구체예에서, 실리콘 오일은 약 1.5:1의 실리콘 오일 대 중합체 용매 비가 달성되기에 충분한 양으로 첨가된다. 추가적으로 또는 대안적으로는, 중합체는 약 10% w/v 이하로 오일상에 존재한다.

[0012] 약제 또는 폴리펩티드, 예를 들어, 엑센딘-4는 본원에서 기재된 조성물에 최종 조성물의 전체 중량을 기준으로 약 0.01% w/w 내지 약 10% w/w의 농도로 존재할 수 있다. 또한, 당, 예를 들어, 수크로오스는 조성물 전체 중량을 기준으로 약 0.01% w/w 내지 5% w/w의 농도로 존재한다.

[0013] 본 발명의 조성물은 주사, 이식 (예를 들어, 피하, 근육내, 복강내, 두개내 (intracranially), 및 피내 (intradermally)), 점막 투여 (예를 들어, 비내, 질내, 폐내, 또는 좌제 수단으로), 또는 동계 (in situ) 전달 (예를 들어, 관장제 또는 에어로졸 스트레이)에 의해서 사람 또는 그 밖의 동물에게 투여될 수 있다.

[0014] 지속적 방출 조성물이 호르몬, 특히, 항당뇨병성 또는 당조절성 펩티드, 예를 들어, GLP-1, GLP-2, 엑센딘-3,

엑센딘-4 또는 이의 효능제, 유사체 또는 유도체를 포함하는 경우, 조성물은 치료학적 유효량으로 투여되어 당뇨병, 내당력 손상 (impaired glucose tolerance: IGT), 비만, 심혈관(CV) 질환 또는 상기 폴리펩티드 또는 이의 유도체, 유사체 또는 효능제중 어느 하나에 의해서 치료될 수 있는 그 밖의 질환을 치료한다.

[0015] 본 발명의 지속적 방출 조성물중의 당의 사용은 포함된 생물학적 활성 폴리펩티드, 예를 들어, 항당뇨병성 또는 당조절성 펩티드의 생체이용성을 개선시키며, 지속적 방출 조성물을 제형하는데 함유되거나 사용되는 폴리펩티드와 그 밖의 성분의 불안정성 및/또는 화학적 상호작용에 기인한 활성의 상실을 최소화하면서, 우수한 방출 프로필을 유지시킨다.

[0016] 본원에 기재된 지속적 방출 제형의 이점은 반복된 투여의 필요성을 제거하여 환자의 만족 및 허용을 향상시키고, 요구되는 방출 프로필을 제공함으로써 활성제 의 혈중 농도의 변동을 제거하여 치료학적 이점을 향상시키고, 이들 변동을 감소시킴으로써 치료학적 이점을 제공하는데 요구되는 생물학적 활성 폴리펩티드의 전체 양을 현저하게 감소시킨다.

[0017] 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본원에 기재된 지속적 방출 조성물의 시험관내 방출과 평균 기공 직경 사이의 관계를 나타내는 그래프이다 (A.S.=암모늄 설페이트).

[0019] 도 2는 미세입자로부터의 엑센딘-4의 시험관내 방출에 대한 다공성의 효과 및 가공 조건, 즉, 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드의 비율이 형성된 미세입자의 다공성에 주는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0020] 도 3A 내지 도 3B는 본원에 기재된 소정의 미세입자 제형에 대한 극저온 SEM의 스캔이다.

[0021] 도 4A 내지 도 4D는 본원에 기재된 소정의 미세입자 제형에 대한 극저온 SEM의 스캔이다.

[0022] 도 5는 본원에 기재된 미세입자 제형의 경우의 % 잔류 에탄올 및 메틸렌 클로라이드 대 Tg의 플롯이다.

[0023] 도 6은 제형 2-1(3% 엑센딘-4 및 2% 수크로오스), 제형 1(3% 엑센딘-4 단독) 및 제형 4(3% 엑센딘-4 및 0.5% 암모늄 설페이트)에 대한 대표적인 약동학적 곡선(농도, pg/ml v. 시간, 첫째 날 동안의 인셋 개시 농도를 나타내는 일수)이다.

[0024] 도 7은 세 미세입자 제형 2, 2-1 및 2-2에 대한 생체내 방출 프로필의 그래프이다.

[0025] 도 8은 미세입자 제형 5-1, 5-2 및 5-3에 대한 약동학적 데이터의 그래프이다.

[0026] 도 9는 공정 파라미터와 그러한 공정에 의해서 달성된 내부 에멀션 크기 사이의 관계를 예시하는 그래프이다.

[0027] 발명의 상세한 설명

[0028] 본 발명은 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출을 위한 조성물, 및 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출을 위한 상기 조성물의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 지속적 방출 조성물은 생적합성 중합체, 및 약제, 예컨대, 생물학적 활성 폴리펩티드, 및 당을 포함한다. 약제 및 당은 생적합성 중합체에 개별적으로 또는 바람직하게는 함께 분산된다. 특정의 구체예에서, 지속적 방출 조성물은 약 3 이하의 평균 혈청 농도(C_{ave})에 대한 최대 혈청 농도(C_{max})의 비율을 지니는 방출 프로필을 특징으로 한다.

[0029] 약제

[0030] 바람직한 구체예에서, 약제는 생물학적 활성 폴리펩티드, 예컨대, GLP-1, GLP-2, 엑센딘-3, 엑센딘-4 또는 이의 유사체, 유도체 또는 효능제를 포함하는 항당뇨병성 또는 당조절성 폴리펩티드이다. 더욱 특히, 폴리펩티드는 엑센딘-4이다. 그러나, 그 밖의 약제가 본 발명에서 발명한 이점을 나타낼 수 있다.

[0031] 본원에서 사용된 생물학적 활성 폴리펩티드는 총체적으로 생물학적 활성 단백질 및 펩티드 및 이의 약제학적으로 허용되는 염을 통칭하는 것이며, 이들이 생체내에서 방출되는 경우에 이들의 분자 수준에서 생물학적으로 활성적이어서, 생체내 요구되는 치료학적, 예방학적 및/또는 진단학적 성질을 지닌다. 전형적으로는, 폴리펩티드는 500 내지 200,000 달톤의 분자량을 지닌다.

[0032] 적합한 생물학적 활성 폴리펩티드는 글루카곤, 글루카곤 유사 펩티드, 예컨대, GLP-1, GLP-2 또는 그 밖의 GLP 유사체, 글루카곤 유사 펩티드의 유도체 또는 효능제, 엑센딘, 예컨대, 엑센딘-3 및 엑센딘-4, 이의 유도체, 효능제 및 유사체, 혈관활성 장내 펩티드(VIP), 면역글로불린, 항체, 시토킨(예, 림포킨, 모노킨, 케모킨), 인터루킨, 대식세포 활성화 인자, 인터페론, 에리트로포이에틴, 뉴클레아제, 종양괴사인자, 콜로니 자극 인자(예,

G-CSF), 인슐린, 효소 (예, 수퍼옥시드 디스무타제(superoxide dismutase), 플라스미노겐 활성화제, 등), 종양 억제제, 혈액 단백질, 호르몬, 및 호르몬 유사체 및 효능제 (예, 여포자극호르몬, 성장 호르몬, 부신피질자극호르몬, 황체형성호르몬 방출 호르몬 (luteinizing hormone releasing hormone: LHRH)), 백신 (예, 종양성, 박테리아성 및 바이러스성 항원), 항원, 혈액 응집인자, 성장인자(NGF 및 EGF), 가스트린, GRH, 항균 펩티드, 예컨대, 디펜신 (defensin), 엔케팔린, 브라디키닌 (bradykinin), 칼시토닌 및 상기된 모든 성분의 뮤테인, 유사체, 트렁케이션 (truncation), 삭제 및 치환 변이체 및 약제학적으로 허용되는 염을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0033] 엑센딘-4는 39 아미노산 폴리펩티드이다. 엑센딘-4의 아미노산 서열은 1995년 6월 13일자로 앵(Eng)에게 허여 되었으며, 이의 전체 내용이 본원에서 참조로 통합되고 있는 미국 특허 제5,424,286호에서 찾아볼 수 있다. AC2993 및 엑세네이티드 (exenatide)는 용어 엑센딘-4와 동의어이다. 엑센딘-4는 사람 및 동물에서 존재하여 낮은 혈당 농도(저혈당증)에서는 그러하지 않지만 상승된 혈당 농도에서 인슐린의 분비를 자극하는 것으로 밝혀 졌다. 이는 또한 글루카곤 분비를 억제하며, 위 배출을 늦추고, 음식의 흡수 및 체중에 영향을 주며, 그 밖의 작용을 하는 것으로 또한 밝혀졌다. 그러므로, 엑센딘-4 및 이의 유사체 및 효능제는 당뇨병, IGT, 및 비만 등의 치료에 유용할 수 있다.

지속적 방출 조성물의 중합체 매트릭스내에 함유되는 생물학적 활성 폴리펩티드의 양은 고려인자, 예컨대, 체중, 치료되는 상태, 사용된 중합체의 형태, 및 중합체로부터의 방출 속도가 고려되면서 본 기술분야에서 통상의 지식을 자에 의해서 결정될 수 있는 치료학적, 진단학적 또는 예방학적 유효량이다.

[0034] 지속적 방출 조성물은 일반적으로 약 0.01%(w/w) 내지 약 50%(w/w)의 약제, 예를 들어, 생물학적 활성 폴리펩티드(예컨대, 엑센딘-4)(조성물중의 전체 중량)를 함유한다. 예를 들어, 생물학적 활성 폴리펩티드(예컨대, 엑센딘-4)의 양은 조성물 전체 중량의 약 0.1%(w/w) 내지 약 30%(w/w)일 수 있다. 폴리펩티드의 양은 요구된 효과, 약제의 효능, 계획된 방출 수준, 및 폴리펩티드가 방출된 시간 간격에 따라 다양할 수 있다. 바람직하게는, 부하(loading)의 범위는 약 0.1%(w/w) 내지 약 10%(w/w), 예를 들어, 0.5%(w/w) 내지 약 5%(w/w)이다. 우수한 방출 프로파일은 약제, 예를 들어, 엑센딘-4가 약 3%(w/w)의 양으로 부하되는 경우에 얻어졌다.

[0035] **당**

[0036] 본원에 사용된 용어 당은 모노사카라이드, 디사카라이드 또는 올리고사카라이드 (약 3 내지 약 10의 모노사카라이드) 또는 이의 유도체이다. 예를 들어, 모노사카라이드의 당 알콜이 본원에서의 당의 정의에 포함되는 적합한 유도체이다. 그러므로, 예를 들어, 모노사카라이드 만노스에서 유도되는 당 알콜 만니톨이 본원에서 사용된 당의 정의에 포함된다.

[0037] 적합한 모노사카라이드는 글루코스, 프룩토스 및 만노스를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 본원에서 추가로 정의된 디사카라이드는 가수분해시에 두 모노사카라이드 분자를 생성시키는 화합물이다. 적합한 디사카라이드는 수크로오스, 락토오스 및 트레할로스를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 적합한 올리고사카라이드는 라피노스 및 아카르보스를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0038] 지속적 방출 조성물에 존재하는 당의 양은 지속적 방출 조성물 전체 중량의 약 0.01%(w/w) 내지 약 50%(w/w), 예컨대, 약 0.01%(w/w) 내지 약 10%(w/w), 예컨대, 약 0.1%(w/w) 내지 약 5%(w/w)의 범위일 수 있다. 우수한 방출 프로파일은 약 2%(w/w) 수크로오스를 포함하는 경우에 달성된다.

[0039] 대안적으로는, 지속적 방출 조성물에 존재하는 당의 양은 약제 또는 생물학적 활성 폴리펩티드와의 중량 비율이 고려될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 및 당은 약 10:1 내지 약 1: 10 w/w의 비로 존재할 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드 (예, 엑센딘-4) 대 당 (예, 수크로오스)의 비는 약 3:2(w/w)이다.

[0040] 둘 이상의 당의 조합이 또한 이용될 수 있다. 당의 조합이 이용되는 경우에 당의 양은 상기된 범위와 동일하다.

[0041] 폴리펩티드가 엑센딘-4인 경우에, 당은 바람직하게는 수크로오스, 만니톨 또는 이의 조합이다.

[0042] **중합체**

[0043] 본 발명의 지속적 방출 조성물을 형성시키는데 적합한 중합체는 생분해성 또는 비-생분해성 중합체 또는 이의 배합물 또는 공중합체일 수 있는 생적합성 중합체이다. 중합체는 이러한 중합체 및 중합체의 어떠한 분해 생성물도 수용자에게 비독성이며 또한 수용자의 신체에 현저하게 해롭거나 지향되지 않은 효과, 예컨대, 주사 부위

에서의 실질적인 면역학적 반응을 나타내지 않는 생적합성 중합체이다.

- [0044] 본원에서 정의된 용어 생분해성은 조성물이 생체내에서 분해 또는 침식되어 작은 단위 또는 화학종을 형성시키는 것을 의미한다. 분해는, 예를 들어, 효소적, 화학적 및 물리적 과정에 의해서 유도될 수 있다. 적합한 생적합성, 생분해성 중합체는 예를 들어, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리(락타이드-코-글리콜라이드), 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리카르보네이트, 폴리에스테르아미드, 폴리안하이드라이드 (polyanhydrides), 폴리아미노산, 폴리오르토에스테르, 폴리시아노아크릴레이트, 폴리(디옥사논), 폴리(p-디옥사논), 폴리(알킬렌 알킬레이트), 공중합체 또는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리오르토에스테르, 생분해성 폴리우레탄, 이의 배합물 및 이의 공중합체를 포함한다.
- [0045] 적합한 생적합성, 비생분해성 중합체는 폴리아크릴레이트, 에틸렌-비닐 아세테이트 및 그 밖의 아실 치환된 셀룰로오스 아세테이트의 중합체, 비-분해성 폴리우레탄, 폴리스티렌, 폴리비닐클로라이드, 폴리비닐 플루오라이드, 폴리(비닐 이미다졸), 클로로셀포네이트 폴리올레핀, 폴리에틸렌 옥사이드, 이의 배합물 및 이의 공중합체로 이루어진 군으로 부터 선택된 비-생분해성 중합체를 포함한다.
- [0046] 본 발명에서 사용된 중합체에 대한 허용되는 분자량은 요구된 중합체 분해 속도, 물리적인 성질, 예컨대, 기계적인 강도, 말단기 화학 및 용매 중의 중합체 용해 속도와 같은 인자가 고려되면서 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에 의해서 측정될 수 있다. 전형적으로는, 분자량의 허용 가능한 범위는 약 2,000 달톤 내지 약 2,000,000 달톤이다. 바람직한 구체예에서, 중합체는 생분해성 중합체 또는 공중합체이다. 더욱 바람직한 구체예에서, 중합체는 락타이드:글리콜라이드의 비가 약 1:1이며 분자량이 약 10,000 달톤 내지 약 90,000 달톤인 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(이하, "PLG"라 칭함)이다. 더욱 더 바람직한 구체예에서, 본 발명에 사용된 PLG의 분자량은 약 30,000 달톤 내지 약 70,000 달톤, 예컨대, 약 50,000 내지 약 60,000 달톤이다.
- [0047] PLG는 산을 에스테르화함으로써 얻어질 수 있는 바와 같은 산 말단기 또는 차단된 말단기를 지닐 수 있다. 우수한 결과는 산 말단기를 지니는 PLG에 의해서 얻어졌다.
- [0048] 중합체는 또한 중합체 고유의 점성을 근거로 하여 선택될 수 있다. 적합한 고유 점성은 약 0.06 내지 1.0dL/g, 예컨대, 약 0.2 내지 0.6dL/g, 더욱 바람직하게는 약 0.3 내지 0.5dL/g를 포함한다. 3 내지 4주내에 분해되는 바람직한 중합체가 선택된다. 적합한 중합체는 상표명 메디소브® (Medisorb®), 예컨대, 5050DL 3A 또는 5050 DL 4A로 시판되는 것들로 알케르메스, 인코포레이티드로부터 구매할 수 있다. 레조머® (Resomer®) RG503 및 503H와 같은 비링거 인겔하임 레조머® PLG (Boehringer Ingelheim Resomer® PLG)가 또한 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 지속적 방출 조성물은 많은 형태, 예컨대, 필름, 펠릿, 실린더, 디스크 또는 미세입자로 형성될 수 있다. 본원에 정의된 미세입자는 본원에서 분산되거나 용해된 생물학적 활성 폴리펩티드를 지니며 약 1 mm 미만의 직경을 지니는 중합체 성분을 포함한다. 미세입자는 구형, 비-구형 또는 불규칙적인 형상을 지닐 수 있다. 전형적으로는, 미세입자는 주사에 적합한 크기일 것이다. 미세입자의 전형적인 크기 범위는 1000 마이크로미터 이하이다. 특히 바람직한 구체예에서, 미세입자는 직경 약 1 내지 약 180 마이크로미터의 범위이다.
- [0050] **추가 부형제**
- [0051] 본 기술분야에 공지된 바와 같이 추가 부형제가 청구된 발명의 제형에 추가될 수 있는 것이 가능하지만, 본 발명의 놀라운 발견은 우수한 방출 프로필이 본원에 기재된 간단한 제형에 의해서 달성될 수 있다는 것이다. 그러한 추가 부형제는 약제의 방출 속도를 증가시키거나 감소시킬 것이다. 방출 속도를 실질적으로 증가시킬 수 있는 성분은 기공 형성제 및 중합체의 분해를 촉진시킬 수 있는 부형제를 포함한다. 예를 들어, 중합체 가수분해 속도는 비-중성 pH에서 증가한다. 따라서, 산성 또는 염기성 부형제, 예컨대, 무기산 또는 무기 염기가 미세입자를 형성시키는 데 사용된 중합체 용액에 첨가되어 중합체 침식 속도를 변경시킬 수 있다. 방출 속도를 실질적으로 감소시키는 성분은 약제의 수용성을 감소시키는 부형제를 포함한다.
- [0052] 본원에 기재된 지속적 방출 제형의 바람직한 구체예는 생적합성 중합체, 약제 및 당으로 필수적으로 구성된다. 용어 "필수적으로 구성"은 제형으로부터 활성 약제의 방출 속도를 실질적으로 증가시키는 성분의 부재를 의미한다. 약제의 방출의 속도를 실질적으로 증가시키거나 감소시키는 것으로 예측되지 않는 추가 부형제의 예는 추가의 활성제 및 불활성 성분을 포함한다.
- [0053] 또 다른 구체예에서, 제형은 생적합성 중합체, 약제 및 당으로 구성된다. 용어 "으로 구성"은 열거된 성분 또는 구성 성분 이외의 성분 또는 구성 성분 및 공정으로부터의 잔류 수준의 출발물질, 용매, 등의 부재를 의미한다.

다.

- [0054] 수성상중의 완충제, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트, 포스페이트 또는 그 밖의 생물학적 생적합성 완충제가, 양호 내지는 우수한 생체이용성을 갖는 약제, 예를 들어, 액센딘-4를 지닌 지속적 방출 제형을 달성하는데 요구되지 않았다는 것은 놀라운 발견이었다. 염석 염이 약제, 예를 들어, 액센딘-4의 방출을 조절하는데 요구되지 않았다는 것이 또한 놀라운 발견이었다. 그러므로, 본 발명의 조성물은 완충액 및/또는 염석 염이 실질적으로 (또는 완전하게) 부재하는 본원에 기재된 조성물을 포함한다.
- [0055] 대안적으로, 또는 추가적으로, 본 발명의 지속적 방출 조성물은 낮은 기공도를 지닌다. 그러한 구체예에서, 지속적 방출 조성물은 생적합성 중합체, 생물학적 활성 폴리펩티드 및 당을 포함하며, 그러한 조성물은 약 0.1mL/g 이하의 전체 기공 용적을 지닌다. 특정의 구체예에서, 전체 기공 용적은 예를 들어 이하 보다 구체적으로 기재되고 있는 바와 같이 수은 압입 공극측정법으로 측정된다.
- [0056] **투여**
- [0057] 본 발명의 조성물은 본 기술분야에 일반적으로 공지된 방법으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 주사, 이식 (예, 피하, 근육내, 복강내, 두개내 및 피내), 점막 투여 (예를 들어, 비내, 질내, 폐내, 또는 좌제 수단으로), 또는 동일계(in situ) 전달 (예를 들어, 관장제 또는 에어로졸 스트레이)에 의해서 환자 (예, 그러한 약제를 필요로 하는 사람) 또는 그 밖의 동물에게 투여될 수 있다.
- [0058] 지속적 방출 조성물은 요구된 기간 동안 요구된 치료학적 수준을 달성시키는 투여 스케줄에 의해서 투여될 수 있다. 예를 들어, 지속적 방출 조성물이 투여되고, 전달되는 약물의 수준이 기준선으로 회귀될 때까지 환자가 모니터링할 수 있다. 기준선에 회귀된 후에, 지속적 방출 조성물이 다시 투여될 수 있다. 대안적으로는, 지속적 방출 조성물의 후속 투여는 환자에서 기준선에 도달하기 전에 수행될 수 있다.
- [0059] 예를 들어, 지속적 방출 조성물이 호르몬, 특히, 항당뇨병성 또는 당조절성 펩티드, 예를 들어, GLP-1, GLP-2, 액센딘-3, 액센딘-4 또는 이의 효능제, 유사체, 또는 유도체를 포함하는 경우, 조성물은 치료학적 유효량으로 투여되어 당뇨병, IGT, 비만, 심혈관(CV) 질환 또는 상기 폴리펩티드 또는 이의 유도체, 유사체 또는 효능제중 어느 하나에 의해서 치료될 수 있는 그 밖의 질환을 치료한다.
- [0060] 본 발명의 지속적 방출 조성물을 투여함으로써 치료될 수 있는 그 밖의 질환은 인슐린이 혼입된 지속적 방출 조성물로 치료될 수 있는 타입 I 당뇨병 및 타입 II 당뇨병을 포함한다. 또한, 혼입된 폴리펩티드가 FSH 또는 이의 유사체인 경우, 지속적 방출 조성물은 불임을 치료하는데 이용될 수 있다. 다른 예에서, 지속적 방출 조성물은 혼입된 폴리펩티드가 베타 인터페론 또는 이의 뮤테인인 경우 다발성 경화증을 치료하는데 사용될 수 있다. 알 수 있는 바와 같이, 지속적 방출 조성물은 주어진 폴리펩티드의 투여에 반응하는 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0061] 추가의 구체예에서, 본 발명의 지속적 방출 조성물은 코르티코스테로이드와 동시투여될 수 있다. 본 발명의 지속적 방출 조성물과 코르티코스테로이드의 동시투여는 지속적 방출 조성물의 생물학적 활성 폴리펩티드의 생이용성을 추가로 증가시킬 수 있다. 지속적 방출 조성물과 함께 코르티코스테로이드의 동시투여는 다쉬(Dasch) 등에 의해서 발명의 명칭 "지속적 방출 조성물의 방출 프로필을 변경시키는 방법(Method of Modifying the Release Profile of Sustained Release Compositions)"으로 출원된 미국특허출원 60/419,430호에 기재되어 있으며, 본원에서는 상기 특허원의 모든 내용을 참조로 인용하였다.
- [0062] 본원에 정의된 바와 같은 코르티코스테로이드는 글루코코르티코이드라 칭하는 스테로이드성 항염증제를 나타낸다.
- [0063] 적합한 코르티코스테로이드는 21-아세톡시프레그네놀론, 알클로메타손(Alclometasone), 알게스톤(Algestone), 암시노니드(Amcinonide), 베클로메타손(Beclomethasone), 베타메타손(Betamethasone), 부데소니드(Budesonide), 클로로프레드니손(Chloroprednisone), 클로벤타솔(Clobetasol), 클로벤타손(Clobetasone), 클로코르톨론(Clocortolone), 클로프레드놀(Cloprednol), 코르티코르테론(Corticosterone), 코르티손(Cortisone), 코르티바솔(Cortivazol), 데플라자코르트(Deflazacort), 데소니드(Desonide), 데소시메타손(Desoximetasone), 텍사메타손(Dexamethasone), 디스플로라손(Disflorasone), 디플루코르톨론(Diflucortolone), 디플루프레드네이트(Difluprednate), 에녹솔론(Enoxolone), 플루아자코르트(Fluazacort), 플루클로로니드(Flucloronide), 플루메타손(Flumethasone), 플루니솔리드(Flunisolide), 플루시놀론 아세토니드(Flucinolone Acetonide), 플루오시노니드(Fluocinonide), 플루오코르틴 부틸(Fluocortin Butyl), 플루코르톨론(Flucortolone), 플루오로메톨론(Fluorometholone), 플루페롤론 아세테이트(Fluperolone Acetate), 플루프레드니덴 아세테이트(Fluprednidene

Acetate), 플루프레드니솔론(Fluprednisolone), 플루란드레놀리드(Flurandrenolide), 플루티카손 프로피오네이트(Fluticasone Propionate), 포르모코르탈(Formocortol), 할시노니드(Halcinonide), 할로베타솔 프로피오네이트(Halobetasol Propionate), 할로메타손(Halometasone), 할로프레돈 아세테이트(Halopredone Acetate), 히드로코르타메이트(Hydrocortamate), 히드로코르티손(Hydrocortisone), 로테프레드놀 에타보네이트(Loteprednol Etabonate), 마지프레돈(Mazipredone), 메드리손(Medrysone), 메프레드니손(Meprednisone), 메틸프레드니솔론(Methylprednisolone), 모메타손 플루오에이트(Mometasone Furoate), 파라메타손(Paramethasone), 프레드니카르베이트(Prednicarbate), 프레드니솔론(Prednisolone), 프레드니솔론 25 - 디에틸아미노-아세테이트(Prednisolone 25 - Diethylamino-acetate), 프레드니솔론 나트륨 포스페이트(Prednisolone Sodium Phosphate), 프레드니손(Prednisone), 프레드니발(Prednival), 프레드닐리덴(Prednylidene), 리벡솔론(Rimexolone), 틱소코르톨(Tixocortol), 트리암시놀론(Triamcinolone) (모든 형태), 예를 들어, 트리암시놀론 아세토니드(Triamcinolone Acetonide), 트리암시놀론 아세토니드 21-오익 산 메틸 에스테르(Triamcinolone Acetonide 21-oic acid methyl ester), 트리암시놀론 베네토니드(Triamcinolone Benetonide), 트리암시놀론 헥스아세토니드(Triamcinolone Hexacetonide), 트리암시놀론 디아세테이트(Triamcinolone Diacetate), 이의 약제학적으로 허용되는 혼합물 및 이의 염 및 이의 유도체 및 유사체를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

- [0064] 한 가지 구체예에서, 코르티코스테로이드는 혼입된 생적합성 중합체와 생물학적 활성 폴리펩티드 약제를 포함하는 지속적 방출 조성물내로 함께 혼입될 수 있다.
- [0065] 또 다른 구체예에서, 코르티코스테로이드는 제 2의 생적합성 중합체내로 별도로 혼입될 수 있다. 제 2의 생적합성 중합체는 혼입된 생물학적 활성 폴리펩티드 약제를 지니는 제 1의 생적합성 중합체와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0066] 또 다른 구체예에서, 코르티코스테로이드는 비캡슐화된 상태로 존재할 수 있지만, 지속적 방출 조성물과 함께 혼합될 수도 있다. 예를 들어, 코르티코스테로이드는 지속적 방출 조성물을 전달하는데 사용된 비히클에 용해될 수 있다. 또한, 코르티코스테로이드는 적절한 비히클에 현탁된 고형물로서 존재할 수 있다. 또한, 코르티코스테로이드는 지속적 방출 조성물과 함께 혼합되는 분말로서 존재할 수 있다.
- [0067] 코르티코스테로이드는 지속적 방출 조성물로부터 생물학적 활성 폴리펩티드의 생체이용도를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다는 것이 이해된다. 증가된 생체이용도는 특정의 제형에 대한 투여 2일 후부터 시작해서 방출 사이클 마지막 종료되는 기간 동안 코르티코스테로이드 부재하의 투여와 비교하여, 코르티코스테로이드 동시 투여에 대한 지속적 방출 조성물로부터의 생물학적 활성 폴리펩티드의 생체이용도의 증가를 나타낸다.
- [0068] 본원에서 사용된 용어 환자는 사람, 예컨대, 약제 또는 치료, 예방 또는 진단 방법을 필요로 하는 사람을 나타낸다.
- [0069] 본원에 정의된 바와 같이, 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출은 폴리펩티드 용액의 직접 투여 후에 생물학적으로 현저한 양의 폴리펩티드가 이용될 수 있는 기간보다 긴 기간에 걸쳐서 본 발명의 지속적 방출 조성물로부터 폴리펩티드의 방출이 발생하는 것이다. 지속적 방출은 약 1 주 이상 동안, 예컨대, 약 2 주 이상 동안, 약 3 주 이상 동안 또는 약 4 주 이상 동안 발생하는 방출이 바람직하다. 지속적 방출은 비교적 일정하거나 변화되는 방출 속도로의 연속적 또는 불연속적 방출일 수 있다. 방출의 연속성 및 방출 수준은 사용된 중합체 조성(예, 단량체 비, 분자량, 블록 조성, 및 다양한 중합체의 조합)의 형태, 폴리펩티드 부하, 및/또는 목적하는 효과를 생성시키는 부형제의 선택에 의해 영향을 받을 수 있다.
- [0070] 본원에 사용된 용어, 치료학적 유효량, 예방학적 유효량 또는 진단학적 유효량은 투여 후의 요구된 생물학적 반응을 유도하는데 요구된 지속적 방출 조성물의 양이다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 C_{max} 는 모니터링되는 방출 기간 동안 발생하는 약물의 최대 혈청 농도이다.
- [0072] 본원에 사용된 용어 C_{ave} 는 방출 프로파일의 곡선(AUC) 아래의 면적을 방출 기간으로 나누어 계산된 약물의 평균 혈청 농도이다.
- [0073] C_{ave} 에 대한 C_{max} 의 비율이 약 3 또는 그 미만인 것이 바람직하다. 이러한 프로파일은 특히 항당뇨병성 또는 당조절성 폴리펩티드, 예컨대, 상기된 것들의 경우에 바람직하다. 약 3 또는 그 미만의 비율은 치료 범위의 C_{ave} 를 제공하면서 보다 높은 비율로부터 유발될 수 있는 약물 부작용을 회피한다.
- [0074] 본원에서 사용된 용어 생체이용도는 순환계에 도달하는 치료제의 양을 의미한다. 생체이용도는 투여 후부터 시

작해서 소정의 시점에서 종료될 때까지의 기간하에 특정 폴리펩티드의 방출 프로필에 대해 계산된 곡선하 면적(AUV)으로 정의된다. 본 기술 분야에서 이해되는 바와 같이, 방출 프로필은 소정의 시점(X-축)에서 대상내의 생물학적 활성 약제의 혈청 수준(Y-축)을 그래프로 나타냄으로써 나타낸다. 생체이용도는 종종 지속적 방출 조성물의 투여 후 특정 폴리펩티드에 대해 달성된 생체이용도를 동일한 양의 약물의 정맥내 투여 후의 특정 폴리펩티드에 대해 달성된 생체이용도로 나누고 100을 곱한 생체이용도 %으로 나타낸다.

[0075] 방출 프로필의 변화는 생물학적 활성 폴리펩티드 약제의 존재에 대한 환자 혈청의 적절한 약동학적 모니터링에 의해서 확인될 수 있다. 예를 들어, 본 기술 분야에 공지된 특성의 항체-기재 시험 (예, ELISA 및 IRMA)이 환자 혈청중의 특성의 생물학적 활성 폴리펩티드 약제의 농도를 측정하는데 사용될 수 있다. 그러한 시험의 예는 엑센딘-4에 대해서 본원에서 기재하고 있다.

[0076] 환자에서의 약제의 치료학적 효과를 모니터링 하는 환자에 대한 약동학적 모니터링은 방출된 약제의 생물학적 활성의 보유를 확인하는데 사용될 수 있다. 약동학적 효과를 모니터링하는 방법은 광범위하게 이용 가능한 기술에 의해서 투여되는 생물학적 활성 폴리펩티드를 기초로 선택될 수 있다.

[0077] 제조

[0078] 본 발명의 지속적 방출 조성물 (중합체/생물학적 활성 폴리펩티드 매트릭스), 특히 본원에 기재된 낮은 기공도의 조성물을 형성시키는 많은 방법이 공지되어 있다. 미세입자 형성의 일부 방법에 대한 상세한 과정이 실시예에 기재되어 있다. 바람직한 구체예에서, 생물학적 활성 폴리펩티드의 지속적 방출을 위한 조성물을 형성시키는 본 발명의 방법은 물, 약제, 예컨대, 수용성 폴리펩티드, 및 당을 포함하는 수성상을 생적합성 중합체 및 중합체용 용매를 포함하는 오일상과 혼합함으로써 혼합물을 형성시키고; 유중수 에멀션을 형성시키고; 코아세르베이션제, 예를 들어, 실리콘 오일, 식물성 오일 또는 무기 오일을 상기 혼합물에 첨가하여 초기 미세입자를 형성시키고; 초기 미세입자를 킨칭 용매 (quench solvent)에 옮겨서 미세입자를 경화시키고; 경화된 미세입자를 건조시킴을 포함한다. 이러한 과정은 일반적으로 본원에서 유중수 과정 (W/O/O)이라 칭한다.

[0079] 바람직하게는, 중합체는 약 3%w/w 내지 약 25% w/w, 바람직하게는 약 4% w/w 내지 약 15% w/w, 예컨대, 약 5% w/w 내지 약 10% w/w 범위의 농도로 오일상에 존재할 수 있다. 우수한 결과는 본원에서 오일상중에 6% w/w의 PLG 농도를 이용함으로써 얻어졌다.

[0080] 중합체는 일반적으로 중합체 용매와 혼합된다. 중합체가 PLG, 예컨대, 본원에서 바람직한 중합체인 경우에, 중합체는 PLG용 용매에 첨가된다. 이러한 용매는 본 기술분야에 공지되어 있다. 바람직한 용매는 메틸렌 클로라이드이다.

[0081] 약제 및 당은 수성상에, 바람직하게는 동일한 수성상에 첨가된다. 약제의 농도는 바람직하게는, 10 내지 100mg/g, 바람직하게는, 50 내지 100mg/g이다. 당의 농도는 바람직하게는, 10 내지 50mg/g 및 30 내지 50mg/g이다.

[0082] 두 상은 혼합되어 에멀션을 형성한다. 에멀션은 내부 에멀션 점적의 크기가 약 1 마이크론 미만, 바람직하게는 약 0.7 마이크론 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.5 마이크론 미만, 예컨대 약 0.4 마이크론이 되도록 형성되는 것이 바람직하다. 소니케이터(sonicator) 및 균질화기(homogenizer)가 그러한 에멀션을 형성시키는데 사용될 수 있다.

[0083] 본원에 사용된 코아세르베이션 제제(coacervation agent)는 중합체 용액(중합체 및 용매)이 용이하게 용해되지 않아서 중합체 용액과는 구분되는 상을 형성하는 오일을 의미한다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 코아세르베이션 제제는 실리콘 오일, 식물성 오일 및 무기 오일을 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다. 특성의 구체예에서, 코아세르베이션 제제는 실리콘 오일이며, 약 0.75:1 내지 약 2:1의 실리콘 오일 대 중합체 용매 비를 달성하기에 충분한 양으로 첨가된다. 특성의 구체예에서, 실리콘 오일 대 중합체의 비는 약 1:1 내지 약 1.5:1이다. 바람직한 구체예에서, 실리콘 오일 대 중합체의 비는 약 1.5:1이다.

[0084] 생성되는 혼합물은 중합체 비-용매를 포함하는 킨칭액(quench solvent)에 첨가된다. 중합체 비-용매는 일반적으로 본 기술 분야에 공지되어 있다. 특히 바람직한 킨칭액은 헵탄/에탄올 용매계를 포함한다.

[0085] 고형 약물은 또한 상기된 공정의 변화된 공정을 이용함으로써 캡슐화될 수 있다. 이러한 변화된 공정은 고형물/오일/오일 (S/O/O)라 칭할 수 있다.

[0086] 예를 들어, 고형물 엑센딘-4는 6% PLG를 함유하는 메틸렌 클로라이드에 현탁되며, 얼음상에서 약 4 분 동안 초

음파처리된다. 후속 공정은 W/O/O 방법과 유사한 방법으로 수행된다.

[0087] 본 발명을 하기 실시예로 보다 구체적으로 기재하고자 한다.

[0088] **실시예**

[0089] 미세입자 제조 I

[0090] 본원에 기재된 지속적 방출 조성물을 상 분리 방법으로 제조하였다. 1 kg 배치 크기에 있어서 액센딘-4 및 수크로오스를 함유하는 미세입자에 대한 일반적인 공정은 하기에 기술되어 있다.

[0091] **A. 내부 유중수 에멀션 형성**

[0092] 유중수 에멀션을 균질화기로 생성시켰다. 적합한 균질화기는 스위스 키네마티카 AG (Kinematica AG)사의 인라인 메가트론 균질화기 MT-V 3-65 F/FF/FF (Megatron homogenizer MT-V 3-65 F/FF/FF)를 포함한다. 에멀션의 수성 상을 액센딘-4 및 부형제, 예컨대, 수크로오스를 물에 용해시킴으로써 제조하였다. 생성 용액중의 약물의 농도는 약 50mg/g 내지 약 100mg/g일 수 있다. 예를 들어, 약물이 액센딘-4인 경우에, 용액중의 약물의 농도는 물 600g 당 약 30g 내지 약 60g일 수 있다. 특정의 구체예에서, 50g 액센딘-4 및 20g 수크로오스를 600g 관류 용수 (water for irrigation: WFI)에 용해시켰다. 상기된 특정의 양은 사용된 액센딘-4의 로트(lot)에 특이적인 펩티드 함량 강도를 보상하는 조절 없이 공칭(nominal) 부하를 나타낸다. 에멀션의 오일상을 PLGA 중합체 (예, 930g의 정제된 50:50 DL4A PLGA((Alkermes, Inc.))를 메틸렌 클로라이드 (14.6 kg 또는 6% w/w)에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0093] 수성 상을 오일상에 첨가하여 오버헤드 믹서로 약 3분 동안 혼합하여 조악한 에멀션을 형성시켰다. 이어서, 조악한 에멀션을 실온에서 약 10,000rpm으로 균질화시켰다. 이러한 균질화는 1 마이크론 미만의 내부 에멀션 점적 크기를 생성시켰다. 내부 에멀션 형성은 임의의 적합한 수단을 사용하여 달성될 수 있는 것으로 이해된다. 에멀션 형성에 적합한 수단은 상기된 균질화 및 초음파처리를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0094] **B. 코아세르베이트 형성**

[0095] 코아세르베이션 단계는 실리콘 오일(21.8 kg의 디메티콘, NF, 350 cs)를 약 5분에 걸쳐서 내부 에멀션에 첨가함으로써 수행되었다. 이는 1.5:1의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드 비와 동일하다. 중합체 용액으로부터 메틸렌 클로라이드를 실리콘 오일 내로 분배시키고, 액센딘-4를 함유하는 수성 상 주위에 중합체를 침전시켜 마이크로캡슐화를 유도하였다. 형성된 초기 미소구체는 연질이며 경화를 필요로 하였다. 빈번하게는, 초기 미소구체는 미소구체 경화 단계를 진행시키기 전에 단기간, 예를 들어, 약 1 분 내지 약 5 분 동안 정지시켰다.

[0096] **C. 미소구체 경화 및 세정**

[0097] 초기 미소구체를 이어서 헵탄/에탄올 용매 혼합물에 즉각적으로 옮겼다. 요구된 헵탄/에탄올 혼합물의 용적은 미소구체 배치 크기, 전형적으로는 16:1 비의 메틸렌 클로라이드 대 헵탄/에탄올 용매를 기초로 결정될 수 있다. 본 실시예에서, 3℃로 냉각된 교반 탱크중의 약 210kg 헵탄 및 23kg 에탄올을 사용하였다. 이러한 용매 혼합물은 미소구체로부터 추가의 메틸렌 클로라이드를 추출해냄으로써 미소구체를 경화시켰다. 이러한 경화 단계는 또한 켄칭이라 칭할 수 있다. 3℃에서 1 시간 동안의 켄칭 후에, 용매 혼합물을 경사분리하고 새로운 헵탄(13kg)을 3℃에서 첨가하고 1 시간 동안 유지시켜서 미소구체 표면상의 잔류 실리콘 오일, 에탄올 및 메틸렌 클로라이드를 세정하거나 수거 단계로 직접 펌핑하였다.

[0098] **D. 미소구체의 건조 및 수거**

[0099] 켄칭 또는 경사분리/세정 단계의 마지막에서, 미소구체를 12" 스웨코 파르마셉 필터/드라이어 모델 PH12Y6(12" Sweco Pharmasep Filter/Dryer Model PH12Y6)에 옮기고 수거하였다. 필터/드라이어는 20 마이크론 다층 수거 스크린을 사용하며 수거 및 건조동안 스크린을 진동시키는 모터에 연결된다. 헵탄 (3℃에서 6kg)으로 최종 세정을 수행하여 최대 라인 전달을 수행하고, 과량의 실리콘 오일을 제거하였다. 미소구체를 이어서 하기 스케줄에 따라서 조절된 속도로 질소 가스로 일정하게 퍼징하면서 진공하에 건조시켰다: 3℃에서 6 시간; 41℃로 상승시키면서 6 시간; 41℃에서 84 시간.

[0100] 건조를 완결시킨 후에, 미소구체를 수거용기로 배출시키고, 150μm 시브(sieve)를 통해 시빙하고, 충전할 때까지 -20℃에서 저장하였다.

[0101] 본원에서 제조되는 모든 미세입자 제형의 경우, 제조된 제형에 존재하는 폴리펩티드, 예를 들어, 액센딘-4 및

부형제의 양은 지속적 방출 조성물의 최종 중량을 기준으로 %(w/w)로서 표시된다. %(w/w)는 명시된 경우를 제외하고는 공칭(nominal) 백분율이다.

[0102] 미세입자 제조 II

[0103] A. 내부 유증수 에멀션 형성

[0104] 유증수 에멀션을 소니케이터를 사용하여 형성시켰다. 적합한 소니케이터는 소닉 엔드 머티리얼스 인코포레이티드(Sonics and Materials Inc., Newton, CT)사의 제품으로서 모델 CV33 프로브 헤드가 구비된 바이브라셀 VCX 750(Vibracell VCX 750)를 포함한다. 에멀션의 수성상은 엑센딘-4 및 부형제, 예컨대, 수크로오스를 물에 용해시킴으로써 제조하였다. 생성된 용액중의 약물의 농도는 약 50mg/ml 내지 약 100mg/ml일 수 있다. 예를 들어, 약물이 엑센딘-4인 경우, 용액중의 약물의 농도는 65.5g의 물 당 약 3.28g 내지 약 6.55g일 수 있다. 특정의 구체예에서, 5.46g의 엑센딘-4 및 2.18g의 수크로오스를 65.5g의 관유용수 또는 WFI에 용해시켰다. 상기된 특정 양은 성분의 필터 무균화시의 손실을 보상하기 위해서 목표 부하에 4% 과량을 나타낸다. 에멀션의 오일상은 PLGA 중합체(예, 97.7g의 정제된 50:50 DL4A PLGA(Alkermes, Inc.))를 메틸렌 클로라이드(1539g 또는 6% w/v)에 용해시킴으로써 제조하였다.

[0105] 수성상을 이어서 약 3 분에 걸쳐서 오일상에 첨가하면서 주위 온도에서 100% 진폭으로 초음파처리하였다. 수성상을 초음파 영역내의 초음파 프로브 아래에 부가된, 5psig의 1" HPLC 튜브 단부(ID=20/1000")가 구비된 1/4" 스테인리스강 튜브를 통해서 펌핑하였다. 반응기를 이어서 1400 내지 1600rpm으로 교반하면서, 100% 진폭에서 2 분 동안 추가로 초음파처리한 후에, 30초 동안 유지시키고, 이어서 1분 더 초음파처리하였다. 이러한 처리는 0.5 마이크론 미만의 내부 에멀션 점적 크기를 생성시켰다. 내부 에멀션 형성은 임의의 적합한 수단을 사용함으로써 달성될 수 있는 것으로 이해된다. 에멀션의 형성에 적합한 수단은 상기된 바와 같은 초음파처리 및 균질화를 포함하지만, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0106] B. 코아세르베이트 형성

[0107] 코아세르베이션 단계는 실리콘 오일(2294g의 디메티콘, NF, 350 cs)를 약 3 내지 5분 기간에 걸쳐서 내부 에멀션에 첨가함으로써 수행되었다. 이러한 첨가는 1.5:1의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드 비와 동일하다.

[0108] 중합체 용액으로부터 메틸렌 클로라이드를 실리콘 오일 내로 분배시키고, 엑센딘-4를 함유하는 수성 상 주위에 중합체를 침전시켜 마이크로캡슐화를 유도하였다. 형성된 초기 미소구체는 연질이며 경화를 필요로 하였다. 빈번하게는, 초기 미소구체는 미소구체 경화 단계를 진행시키기 전에 단기간, 예를 들어, 약 1 분 내지 약 5 분 동안 정치시켰다.

[0109] C. 미소구체 경화 및 세정

[0110] 초기 미소구체를 이어서 헵탄/에탄올 용매 혼합물에 즉각적으로 옮겼다. 요구된 헵탄/에탄올 혼합물의 용적은 미소구체 배치 크기를 기초로 결정될 수 있다. 본 실시예에서, 3℃로 냉각된 교반 탱크(350 내지 450rpm)중의 약 22kg 헵탄 및 2448g 에탄올을 사용하였다. 이러한 용매 혼합물은 미소구체로부터 추가의 메틸렌 클로라이드를 추출해냄으로써 미소구체를 경화시켰다. 이러한 경화 단계는 또한 켄칭이라 칭할 수 있다. 3℃에서 1 시간 동안의 켄칭 후에, 용매 혼합물을 경사분리하고 새로운 헵탄(13kg)을 3℃에서 첨가하고 1 시간 동안 고정시켜서 미소구체 표면상의 잔류 실리콘 오일, 에탄올 및 메틸렌 클로라이드를 세정하였다.

[0111] D. 미소구체의 건조 및 수거

[0112] 세정 단계의 마지막 부분에서, 미소구체를 데드-엔드 필터(dead-end filter)로서 작용한 콘형 건조 챔버 내부의 6" 직경, 20 마이크론 다층 스크린상에 옮기고 수거하였다. 헵탄(4℃에서 6kg)으로 최종 세정을 수행하여 최대 라인 전달을 보장하였다. 미소구체를 이어서 하기 스케줄에 따라서 조절된 속도로 질소 가스로 일정하게 퍼징하면서 건조시켰다: 3℃에서 18 시간; 25℃에서 24시간; 35℃에서 6 시간; 및 38℃에서 42 시간.

[0113] 건조를 완료시킨 후에, 미소구체를 건조 콘에 부착된 테플론/스테인리스강 무균화된 수거 용기로 배출시켰다. 수거 용기는 밀봉되며, 건조 콘으로부터 제거되고, 충전할 때까지 -20±5℃에서 저장하였다. 세정을 위한 분리시에 콘에 잔류하는 물질을 약물 함량 분석을 위해서 취하였다. 수득량은 약 100g의 미소구체였다.

[0114] 본원에서 제조되는 모든 미세입자 제형의 경우, 제조된 제형에 존재하는 폴리펩티드, 예를 들어, 엑센딘-4 및 부형제의 양은 지속적 방출 조성물의 최종 중량을 기준으로 %(w/w)로서 표시된다. %(w/w)는 명시된 경우를 제외하고는 공칭 백분율이다.

- [0115] **중합체:**
- [0116] 사용에 적합한 특이적 PLG 중합체의 예가 하기 기재되어 있다. 하기 실시예에서 사용된 중합체 모두는 목록에 기재되어 있으며 모든 기재된 중합체는 미국 오하이오주 신시내티 소재의 알케르메스, 인코포레이티드 (Alkermes, Inc.)로부터 수득하였으며, 다음과 같이 기재될 수 있다:
- [0117] 폴리머 2A: 폴리(락타이드-코-글리콜라이드); 50:50 락타이드:글리콜라이드 비; 12.3 kD Mol. Wt.; IV=0.15 (dL/g).
- [0118] 중합체 4A: 폴리(락타이드-코-글리콜라이드); 50:50 락타이드:글리콜라이드 비; Mol. Wt. 45-64 kD; IV=0.45-0.47 (dL/g).
- [0119] PLG의 정제: PLG 매트릭스에 혼입되는 단백질 및 펩티드가 중합체의 제조후에 잔류하는 PLG 분해 생성물 또는 불순물과의 상호작용으로 인해서 바람직하게 않게 변화(예, 분해 또는 화학적으로 변화)될 수 있다는 것이 본 기술 분야[문헌예:Peptide Acylation by Poly(α -Hydroxy Esters) by Lucke et al., Pharmaceutical Research, Vol. 19, No. 2, p. 175-181, February 2002]에 공지되어 있다. 그러므로, 본원에서 기재된 주요 미세입자 제형의 제조에 사용된 PLG 중합체는 본 기술분야에서 인정되는 정제 방법으로 지속적 방출 조성물의 제조 전에 정제되었다.
- [0120] **특성화 방법:**
- [0121] 하기 특성화 방법이 활성 약제의 바람직한 방출 프로필을 제공하는 미세입자를 확인하기에 적합한 것으로 결정되었다.
- [0122] **SEM**
- [0123] SEM을 사용하여 미세입자의 입자 크기, 형태 및 표면 특징을 평가하였다. SEM 영상화는 퍼스날 SEM[®] 시스템(Personal SEM[®] system)(ASPEX[™], LLC)상에서 수행하였다. 모든 샘플을 스파툴라(spatula)를 통해서 탄소 이중면 테입으로 덮힌 표준 SEM 스템브(stub)에 침착시켰다. 모델 SC 7620 "미니" 스퍼터 코터(Model SC 7620 "Mini" Sputter Coater) (Energy Beam Sciences)를 사용하여 샘플을 18mA 방출 전류에서 약 90초 동안 Au로 스퍼터 코팅하였다. 모든 SEM 영상화는 약 250 내지 2500X의 배율 범위에 걸쳐서 20KeV 전자 빔을 사용하여 수행하였다.
- [0124] **극저온 SEM**
- [0125] 미세입자의 단면을 극저온 SEM을 사용하여 연구하였다. 미세입자 샘플을 히스토 프렙[®] 용액(HISTO PREP[®] Solution (Fischer))과 혼합하고, 극저온용기(cryostat)에서 -20℃로 밤새 유지시켰다. 경화된 미세입자를 글라스 커버 슬립에 올려놓고, 금속 나이프를 이용하여 절단(section)하였다. 절단된 입자를 알루미늄 스템브상에 설치하고, 백금 및 팔라듐으로 스퍼터 코팅하고, 주사전자 현미경(Scanning Electron Microscope)(Phillips 525M)하에 관찰하였다. 단면의 가시관찰은 미세입자에 대한 기공도를 측정하는 방법을 제공한다.
- [0126] **기공도 측정-수은 압입법**
- [0127] 미세입자층의 기공 용적 분포를 모델 수토포 IV 9500 모델 머큐리 인트루전 포로시메터(SutoPor IV 9500 Moden Mercury Intrusion Porosimeter) (Micromeritics, Norcross, GA)를 사용하여 측정하였다. 요약하면, 수은을 최대 압력 60,000Psia까지 단계적 방법으로 가압함으로써 침투도계(penetrometer)내의 공지된 양의 미세입자내로 들어가게 하였다. 다양한 압력에서 기공내로 압입된 수은의 용적을 측정하였다. 이러한 방법은 미세입자내의 기공의 분포를 측정한다. 즉, 압입되는 기공의 크기는 적용된 압력에 반비례한다. 액체-고체-증기 시스템에 대한 내부압 및 외부압의 평형은 워시번 방정식(Washburn equation)으로 기술될 수 있다. 적용된 압력 및 수은이 가압 유입되는 기공 크기 사이의 관계는 하기 식으로 기재된다:

$$D = \frac{-4\gamma \cos\theta}{P}$$

P

- [0128]
- [0129] 상기 식에서,
- [0130] D=기공 직경

- [0131] γ = 표면장력(일정)
- [0132] Θ = 접촉각(일정)
- [0133] P = 압력
- [0134] 따라서, 수은이 압입되는 기공의 크기는 적용된 압력에 반비례한다. 모든 기공이 모두 기밀 실린더인 것으로 가정하면, 평균 기공 직경($D=4V/A$)은 기공 용적($V=\pi D^2h/4$)을 기공 면적($A=\pi Dh$)으로 나눈으로써 계산될 수 있다.
- [0135] **잔류 용매**
- [0136] 단일 방법이 헵탄, 에탄올 및 메틸렌 클로라이드의 정량에 사용되었다. 장치는 Rtx 1301, 30 cm x 0.53mm 컬럼이 구비된 HP 5890 시리즈 2 가스 크로마토그래프(HP 5890 Series 2 gas chromatograph)로 구성되었다. 약 130mg의 미세입자를 10ml의 N,N-디메틸포름아미드에 용해시켰다. 프로필 아세테이트를 내부 표준으로서 사용하였다. 샘플 제조물을 0.03%만큼 낮은 메틸렌 클로라이드의 농도가 정량될 수 있도록 조정하였다.
- [0137] 미세입자 **제조**
- [0138] 표 1에 기재된 미세입자 배치를 상기된 바와 같이 4A 중합체 및 1.5:1 또는 1:1의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드의 비를 사용하여 100g 스케일로 제조하였으며, 상기 실리콘 오일은 350 cs의 점도를 지녔다. 제형에 사용된 엑센딘-4 및 부형제의 양이 또한 표 1에 기재되어 있다.

[0139] 표 1

제형 번호	제형	시험관내 방출(%)	주의
02-019-147(#1)	0% 수크로오스, 0% AS	0.40	1.5:1 Si.오일:MeCl ₂
02-019-167(#2)	2% 수크로오스 (F16)	0.40	1.5:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-160(#2-1)	2% 수크로오스 (F16)	0.44	1.5:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-164(#2-2)	2% 수크로오스 (F16)	0.45	1.5:1 Si.오일: MeCl ₂
02-030-08(#2-3)	2% 수크로오스 (F16)	0.80	1:1 Si.오일: MeCl ₂
02-030-01(#2-4)	2% 수크로오스 (F16)	1.0	1:1 Si.오일: MeCl ₂
02-030-04(#2-5)	2% 수크로오스 (F16)	1.1	1:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-136(#3-1)	2% 수크로오스, 0.5% AS (F14)	1.3	50:50 켄칭
02-019-115(#3-2)	2% 수크로오스, 0.5% AS (F14)	2.2	1.5:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-170(#4)	0% 수크로오스, 0.5% AS	3.8	1.5:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-133A(#3-3)	2% 수크로오스, 0.5% AS (F14)	12.7	100% 헵탄 켄칭
02-019-185(#5) (5% 약물 부하)	2% 수크로오스 (F17)	0.5	5% 약물 부하, 1.5:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-64 (#3-4)	2% 수크로오스, 0.5% AS (F14)	0.5	1.5:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-10(#3-5)	2% 수크로오스, 0.5% AS (F14)	1.30	1:1 Si.오일: MeCl ₂
02-001-196(#3-6)	2% 수크로오스, 0.5% AS (F14)	2.70	1:1 Si.오일: MeCl ₂
02-019-24(#3-7)	2% 수크로오스, 0.5% AS (F14)	6.70	1:1 Si.오일: MeCl ₂

[0140]

[0141] * #5의 기공도를 제외하고는 모든 제형이 3% 약물 부하를 지녔다.

[0142] 수은 압입 기공측정법으로부터 얻은 전체 압입 용적 및 계산된 평균 기공 직경이 표 2에 기재되어 있다. 평균 기공 직경과 시험관내 방출 사이의 관계가 도 1에 도시되어 있다.

[0143] 표 2

제형 번호	전체 기공 용적 (mL/g)	시험관내 방출(%)	평균 기공 직경 (μm)
02-019-147(#1)	0.033	0.40	0.0068
02-019-167(#2)	0.035	0.40	0.0069
02-019-160(#2-1)	0.037	0.44	0.0070
02-019-164(#2-2)	0.035	0.45	0.0070
02-030-08(#2-3)	0.036	0.80	0.0070
02-030-01(#2-4)	0.038	1.0	0.0073
02-030-04(#2-5)	0.039	1.1	0.0074
02-019-136(#3-1)	0.041	1.3	0.0073
02-019-115(#3-2)	0.039	2.2	0.0078
02-019-170(#4)	0.067	3.8	0.0125
02-019-133A(#3-3)	0.513	12.7	0.0277
02-019-64 (#3-4)	0.030	0.5	0.0060
02-019-10(#3-5)	0.060	1.30	0.0090
02-001-196(#3-6)	0.060	2.70	0.0100
02-019-24(#3-7)	0.180	6.70	0.0170

[0144]

[0145]

도 1은 시험관내 초기 방출에 대한 암모늄 설페이트의 효과를 나타낸다. 이러한 데이터는 시험관내 초기 방출이 미세입자 기공 직경에 관련되어 있음을 나타낸다. 암모늄 설페이트로 제조된 제형은 일정한 기공도 및 방출을 나타내는 암모늄 설페이트가 없는 제형과는 달리 변화되는 시험관내 방출 수준 및 다양한 기공도를 나타냈다. 미세입자의 제조 동안에, 수성상중의 암모늄 설페이트의 존재는 내부-에멀전의 제조 동안 약물로부터 염석될 수 있다. 침전물의 마이크로-환경에서의 차이는 기공도에서의 차이에 대한 원인이 되며, 그로 인해서 초기 방출에서의 변화에 원인이 된다. 이러한 효과는 암모늄 설페이트가 없이 제조된 제형에서는 관찰되지 않았다. 수크로오스 및 액센딘-4로 제조된 제형은 액센딘-4, 수크로오스 및 암모늄 설페이트를 지닌 제형에 비해서 더욱 바람직하며 일정한 수준의 초기 방출을 나타낸다.

[0146]

도 2는 추가로 시험관내 방출에 대한 기공도의 영향을 입증하고 있으며, 가공 조건, 즉, 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드의 비가 형성된 미세입자의 기공도에 주는 영향을 입증하고 있다. 요약하면, 1:1의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드 비를 이용하여 제조된 미세입자 제형(표 1의 제형 2-4 및 2-5)은 1.5:1의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드 비로 제조된 동일한 제형(표 1의 제형 2, 2-1 및 2-2) 보다 더 높은 초기 방출을 나타낸다. 도 2는 높은 비의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드가 더 낮은 초기 방출을 초래하는 더 낮은 기공도를 초래함을 제시하고 있다.

[0147]

극저온 SEM

[0148]

극저온 SEM 분석을 표 1의 타입 2, 3 및 5의 제형에 대해서 상기된 바와 같이 수행하였다. 도 3A 내지 3B는 선택된 타입 2의 제형(제형 2-2, 도 3A) 및 타입 5의 제형(5% 액센딘-4, 2% 수크로오스, 도 3B)에 대한 현미경사진의 스캔이다. 도 4A 내지 4D는 표 1의 각각의 제형 3-4, 3-5, 3-6 및 3-7에 대한 현미경사진의 스캔이다. 또한 초기 방출에서의 가변성에 원인이 될 수 있는 암모늄 설페이트의 사용에 의해서 나타난 기공도의 변화가 도 4A 내지 4D의 극저온 SEM 단면에서 볼 수 있다.

[0149]

잔류 용매 수준

[0150]

주어진 제형에서의 잔류 용매의 수준은 제형의 Tg에 영향을 줄 수 있다. 잔류 용매 수준은 표 1의 타입 2 및 5의 미세입자 제형에 대해서 측정되었다. 단일의 방법이 헵탄, 에탄올 및 메틸렌 클로라이드의 정량을 위해서 사용되었다. 장치는 Rtx 1301, 30 cm x 0.53mm 컬럼이 있는 HP 5890 시리즈 2 가스 크로마토그래프(HP 5890

Series 2 gas chromatograph)로 구성되었다. 약 130mg의 미세입자가 10ml의 N,N-디메틸포름아미드에 용해되었다. 프로필 아세테이트를 내부 표준으로서 사용하였다. 샘플 제조물을 0.03%만큼 낮은 메틸렌 클로라이드의 농도가 정량되도록 조정하였다.

[0151] 도 5는 표 1의 타입 2 및 5의 제형(3 또는 5% 엑센딘-4, 2% 수크로오스)에 대한 % 잔류 에탄올 및 메틸렌 클로라이드의 플롯이다. 도 5는 잔류 용매의 양이 증가함에 따라서 Tg가 감소함을 나타내고 있다.

[0152] **3% 엑센딘-4 및 2% 수크로오스를 지니는 미세입자의 제조**

[0153] 미세입자 제형에서의 암모늄 설페이트의 존재에 의해서 도입되는 기공도에서의 변화 및 초기 방출에 현저하게 영향을 주는 특성으로서 기공도의 확인을 고려하여, 암모늄 설페이트가 추가의 발견에서는 추구되지 않았다.

[0154] **내부 에멀션 점적 크기의 영향**

[0155] 하기 연구를 수행하여 상이한 공정 파라미터를 이용함으로써 생성된 미소구체의 24 시간 시험관내 방출 및 생성되는 에멀션의 안정성 뿐만 아니라 내부 에멀션을 형성시키는데 있어서의 공정 파라미터의 영향을 측정하였다. 수성상과 용매상의 내부 에멀션은 100g 규모의 경우 상기된 바와 같이 초음파처리하거나, 36/4 제너레이터가 장착된 MT5000 균질화기(Kinematic AG, Switzerland)을 저속(10,800 rpm) 또는 고속 (21,300rpm)으로 사용하는 균질화에 의해서 형성시켰다. 상이한 기술에 의해서 내부 에멀션을 형성시킨 후에, 분취물을 제거하기 전에 5, 15 또는 60분 동안 오버헤드 교반기로 온화하게 교반시키면서 반응기에 에멀션을 유지시켰다. 지정된 유지시간 후에, 내부 에멀션을 상기된 바와 같이 미세입자로 가공한 다음, 24 시간 시험관내 방출을 각각의 배치에 대해서 하기된 바와 같이 측정하였다.

[0156] **내부 에멀션 점적 크기 특성화는 호리바 입자 크기 분석기(Horiba particle size analyzer)를 사용함으로써 측정될 수 있다**

[0157] 내부 에멀션 분취물을 유리 피펫을 사용하여 반응기로부터 취하였다. 전달 피펫을 사용하여, 약 30방울의 내부 에멀션을 20cc 스크류-캡 신틸레이션 바이알내의 약 10ml의 6% 메디소르브®(Medisorb®) 50:50 4A PLG 중합체 용액에 첨가한 다음 혼합하였다. 6% 메디소르브® 50:50 4A PLG 중합체 용액은 또한 참조 블랭크 용액으로서 가능하였다. 약 9ml의 이러한 희석된 에멀션 샘플을 클린 10ml 호리바 샘플 홀더(clean 10 ml Horiba sample holder)에 옮겼다. 커버를 샘플 홀더에 위치시키고 중합체 용매의 신속한 증발을 방지하였다. 제조된 샘플을 블루 바(blue bar)(Lamp) 당 0.65% 내지 0.90%의 허용 가능한 투과 판독 범위 % 내에 있었다. 0.94 내지 0.001로 설정된 상대 굴절율을 프로그램 설정에서 선택하였다. 샘플을 호리바 입자 크기 분석기, 예컨대, 모델 LA 910으로 점적 크기에 대해서 측정하였다. 공정 파라미터와 연관된 데이터, 5, 15 및 60분 유지시간에 걸쳐서 달성된 내부 에멀션 크기, 및 생성되는 24시간 시험관내 방출 결과(괄호)가 도 9에 도시되어 있다.

[0158] **미소구체 특성화**

[0159] 엑센딘-4 미소구체는 약물 함량, 입자 크기, 잔류 용매, 초기 시험관내 방출, 및 래트에서의 PK 특성에 대해서 통상적으로 특성화되었다. 약물은 선택된 배치에서의 캡슐화후 엑센딘-4 순도의 예비 평가를 얻도록 추출되었다.

[0160] **시험관내 초기 방출**

[0161] 엑센딘-4의 초기 방출은 방출 완충액(10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.4)중의 1 시간 후의 엑센딘-4의 농도를 측정함으로써 측정하였다.

[0162] 150±5mg의 미소구체를 실온에서 5.0ml의 10mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.4 완충액에 넣고, 약 30초 동안 볼텍싱하여 용액을 현탁시키고, 1 시간 동안 37℃ 공기 챔버에 넣었다. 1 시간 후에, 샘플을 챔버로부터 분리하고, 몇 회 거꾸로 하여 혼합한 다음, 10분 동안 3500rpm에서 원심분리하였다. 상청액을 분리하고, 하기 조건을 이용하여 HPLC에 의해서 즉시 분석하였다: 컬럼: TSK-GEL®, 7.8 mm x 30 cm, 5 m (TSOH BIOSEP PART #08540); 컬럼 오븐 온도: 주위온도; 오토샘플러(Autosampler) 온도: 6℃; 유속: 0.8 mL/분; 검출: 280 nm; 주입 용적: 10 L; 이동상: 0.1 % TFA/리터 (v/v)와 함께 35% 아세토니트릴/65% 물; 가동시간: 약 20분. 엑센딘-4 벌크 약물로서, 30mM 아세테이트 완충액, pH 4.5중에 제조된 0.2mg/mL를 표준으로 사용하였다.

[0163] **동물 연구**

[0164] 본원에 기재된 모든 약동학적(PK) 연구는 체중 약500±50g인 성숙한 웅성 스프라그-다울리(Sprague-Dawley) 래

트에서 수행하였다.

[0165] 미세입자 제형의 PK 특성화의 경우, 각각의 동물에게 회석제(3% 카르복시메틸셀룰로오즈, 0.9% NaCl, 0.1% 트윈 20(Tween 20))에 현탁된 미세입자를 견갑골 사이 영역에 피하 주사하였다. 일반적으로, 용량은 0.75mL의 주사 용적으로 래트당 약 1.0mg 엑센딘-4로 하였다. 혈액 샘플을 꼬리 측동맥을 통해서 투여 후 0.5, 2, 4, 6, 10, 24 시간, 및 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 및 28일에 수거하였다. 혈액 샘플을 EDTA를 함유하는 마이크로테이너[®] 튜브 (MICROTAINER[®] tube)에 즉시 넣고, 약 2분 동안 약 14,000Xg에서 원심분리하였다. 혈장을 첨가제 없이 마이크로테이너[®] 튜브에 옮기고, 검정할 때까지 -70℃에서 저장하였다. IRMA를 사용하여 혈장 엑센딘 농도를 측정하였다.

[0166] 생체내 방출-IRMA

[0167] 혈장중의 엑센딘-4를 정량하는 방법은 고체상 모노클로날 항체 EXE4:2-8.4에 의해서 포착되고 방사성요오드화된 모노클로날 항체 GLP-1:3-3에 의해서 검출되는 분석물에 의한 샌드위치 면역검정이다. 결합된 수를 표준 보정 곡선으로부터 정량하였다. 이러한 검정은 전장(full length) 또는 무손상 엑센딘-4에 특이적이며, 엑센딘-4(3-39)를 검출하지 못한다. 전형적인 표준 곡선 범위는 트레이서(tracer) 항체의 에이지(age)에 따라 30pg/ml 내지 2000pg/ml이다.

[0168] 시험관내 및 생체내 방출

[0169] 제형 2, 2-1 및 2-2 (3% 엑센딘-4 및 2% 수크로오스)를 상기된 바와 같이 시험관내 초기 방출에 대해서 시험하였다. 시험관내 방출은 각각 0.4%, 0.4% 및 0.5%였다. 모든 세 개의 배치는 또한 C_{max} 0-1일에 대해서 1154 내지 1555pg/ml의 범위로 비교적 낮은 생체내 초기 방출을 나타냈다. 도 6은 3% 엑센딘-4 및 2% 수크로오스 (2-1) 및 3% 엑센딘-4 단독(1) 및 3% 엑센딘-4 및 0.5% 암모늄 설페이트(4)를 지니는 제형에 대한 대표적인 약동학적 곡선이다. 1.5:1 비의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드를 사용하였으며, 실리콘 오일의 점도는 350cs였다.

[0170] 도 6은 암모늄 설페이트를 함유하지 않는 제형이 낮은 초기 방출을 나타냄을 나타내고 있다. 엑센딘-4 단독을 지니는 제형이 적합한 초기 방출을 나타내기는 하지만, 캡슐화 후 약물 순도는 수크로오스와 함께 엑센딘-4를 지니는 제형에 비해서 감소되었다. 제형중의 당의 첨가는 약제의 분해를 감소시킨다.

[0171] 상기 비교된 세 가지의 제형 2, 2-1 및 2-2에 대한 생체내 방출 프로파일도 도 7에 도시되어 있다. 모든 세 개의 배치는 비교적 낮은 초기 방출에 이어서 "트로프(trough)"(약 4일 내지 17일에서 낮은 혈청 수준)를 나타낸 다음, 약 21일 내지 28일 까지에 걸쳐서 지속적 방출을 나타냈다. 낮은 초기 방출 및 방출 프로파일의 모양은 세 제형에 있어서 일관되었다.

[0172] 1:1 비의 실리콘 오일 대 메틸렌클로라이드를 이용한 제형

[0173] 표 1로부터의 제형 2-3, 2-4 및 2-5(3% 엑센딘-4, 2% 수크로오스)을 1:1 비의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드를 사용하여 제조하였다. 초기 방출은 표 1의 제형 2, 2-1 및 2-2(1.5:1의 실리콘 대 메틸렌 클로라이드 비를 갖는 3% 엑센딘-4, 2% 수크로오스)에 대한 경우 보다 이들 제형의 경우에 더 높았다. 특히, 1.5:1 비의 제형은 약 0.4%의 평균 초기 방출을 제공한 반면, 1:1 비 제형은 약 1.0%의 평균 초기 방출을 제공하였다. 동일한 경향이 생체내에서 관찰되었는데, 1:1 비의 경우에 래트에서의 C_{max} 0-1일은 2288±520pg/mL였지만, 1.5:1 비의 경우에 래트에서의 C_{max} 0-1일은 1300±221pg/mL이었다.

[0174] 증가된 약물 부하

[0175] 엑센딘-4의 부하를 4%로 증가시키면서 수크로오스를 2%로 유지시키면, 3% 부하의 경우와 동일한 범위로 시험관내 및 생체내 초기 방출을 조래하였다.

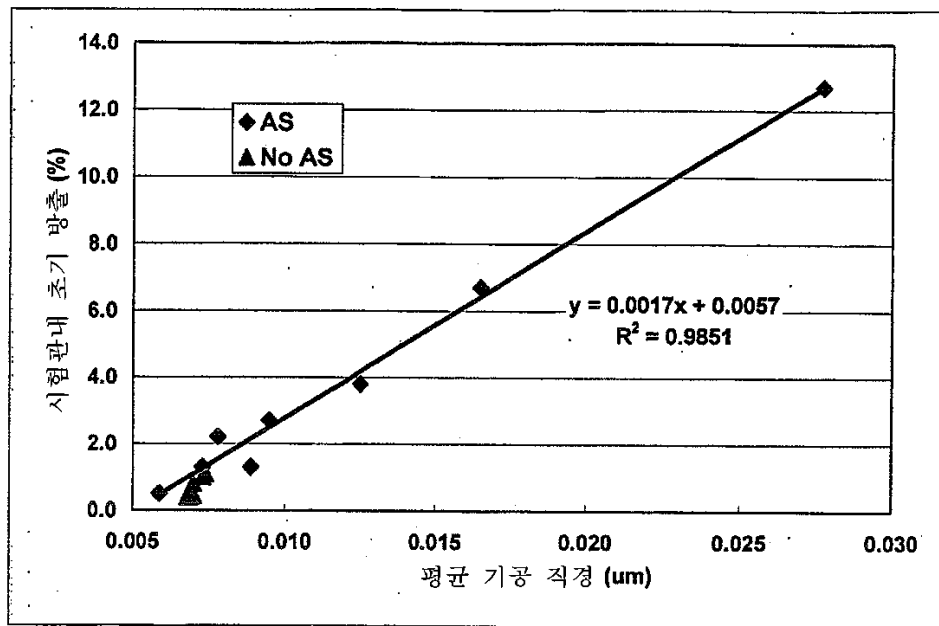
[0176] 표 1의 타입 5의 세 개의 제형을 제조하였다 (5% 약물 부하, 2% 수크로오스, 1.5:1의 실리콘 오일 대 메틸렌 클로라이드 비). 세 개의 배치 5-1, 5-2 및 5-3 모두는 0.2 내지 0.5% 범위의 낮은 시험관내 초기 방출을 나타냈다. 유사하게, 제형의 생체내 C_{max}는 일관되게 467pg/ml 내지 1267pg/ml의 낮은 범위였다. 도 8은 시험된 세 개의 배치에 대한 약동학적 데이터의 그래프이다. 2% 수크로오스를 지닌 3% 엑센딘-4 제형의 성향과 비교하는 경우, 5% 제형은 약 1일 및 2일째에 걸쳐서 보다 높은 혈청 약물 수준을 나타냈다. 5% 제형에 대한 나머지 프로파일은 트로프(trough)에 이어서 주로 21일 내지 28일에 걸쳐서 약물을 방출하는 3% 제형과 유사하였다.

[0177]

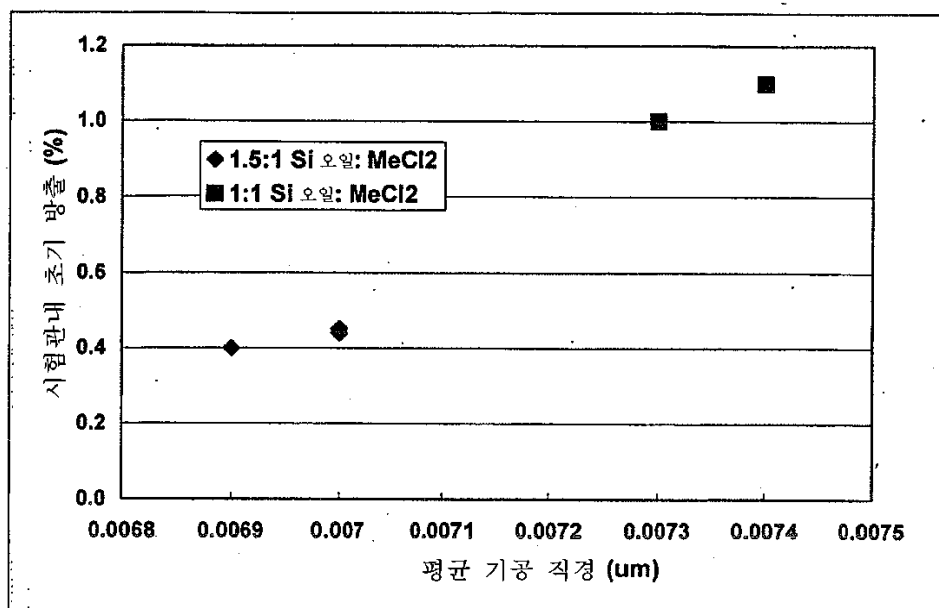
본 발명을 바람직한 구체예를 참조로 하여 특별히 기재하고 있지만, 본 기술분야의 전문가라면 첨부된 청구범위에 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 구체적인 사항에서 다양한 변화가 있을 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

도면

도면1



도면2



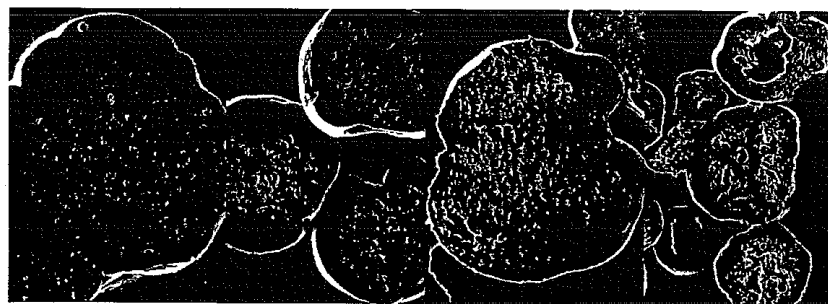
도면3



3A

3B

도면4



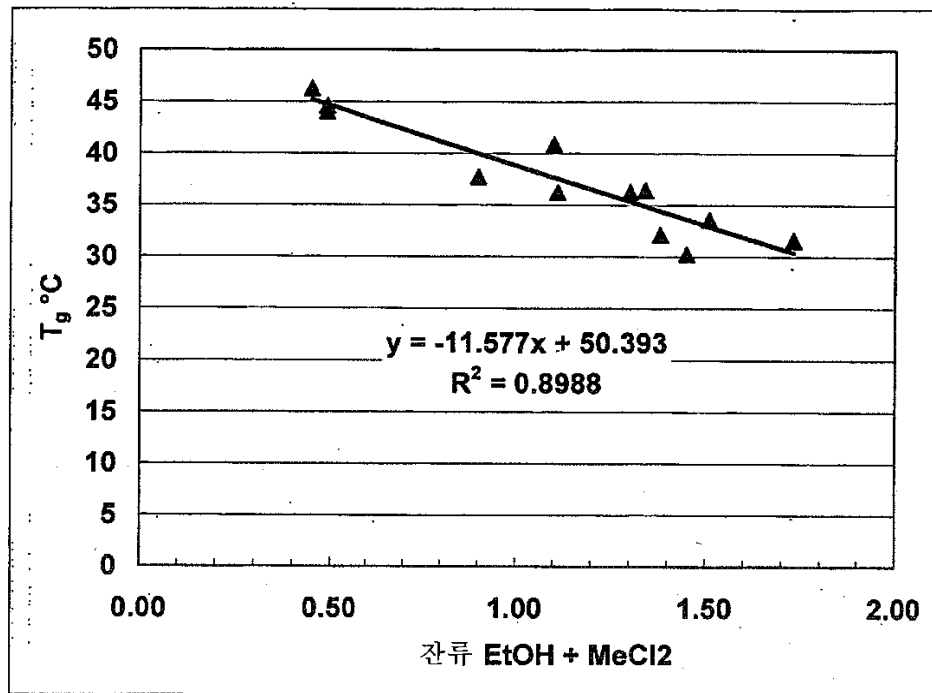
4A

4B

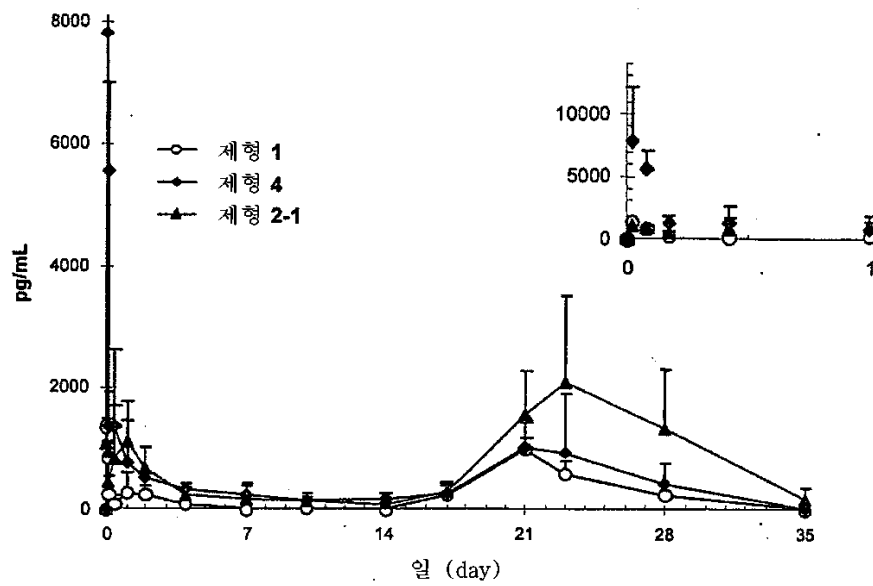
4C

4D

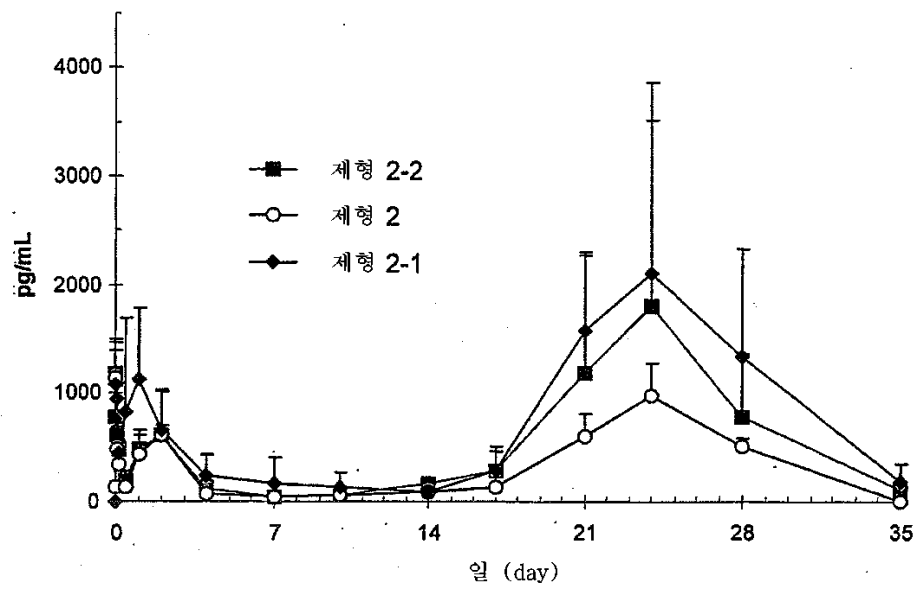
도면5



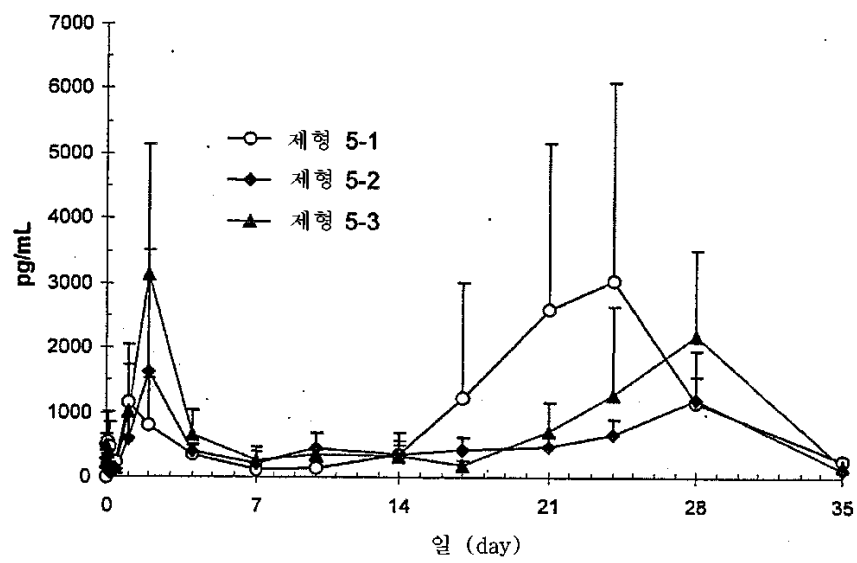
도면6



도면7



도면8



도면9

