

(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2010-524924
(P2010-524924A)

(43) 公表日 平成22年7月22日(2010.7.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 7 6
A 6 1 P 3/08 (2006.01)	A 6 1 P 3/08	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 K 9/52 (2006.01)	A 6 1 K 9/52	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-503980 (P2010-503980)
 (86) (22) 出願日 平成20年4月18日 (2008.4.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月10日 (2009.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2008/002216
 (87) 国際公開番号 W02008/130158
 (87) 国際公開日 平成20年10月30日 (2008.10.30)
 (31) 優先権主張番号 10-2007-0038467
 (32) 優先日 平成19年4月19日 (2007.4.19)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

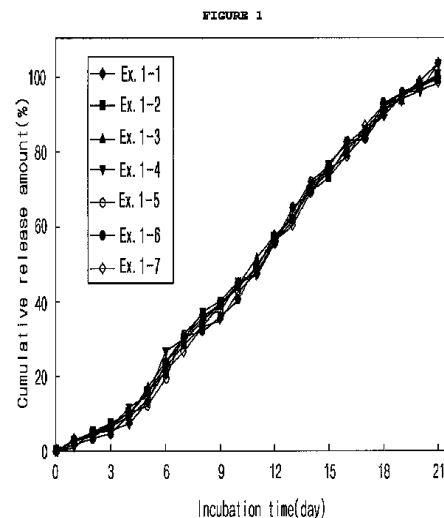
(71) 出願人 501187848
 ドン・ア・ファーム・カンパニー・リミテッド
 大韓民国、130-823 ソウル、ドン
 ダエムーング、ヨンドゥードン、25
 2
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 カク、ヒュン ヒ
 大韓民国 ソウル 138-769、ソン
 パーグ、ムンジョンードン、ファミリー
 アpartment #308-1004

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖調節ペプチドの制御放出に適した生分解性マイクロスフェア組成物及びその製造方法

(57) 【要約】

本発明は、糖調節ペプチドを生分解性高分子担体を含むマイクロスフェア内に封入して、糖調節ペプチドを持続制御放出するようにした生分解性高分子マイクロスフェア及び、その製造方法に関するものである。本発明によって製造された生分解性高分子マイクロスフェアは、初期過多放出がなく、0次放出パターンを有し、不完全な放出なしに糖調節ペプチドを持続的に放出するので、薬物の治療効果を高めることができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

制御された様式で糖調節ペプチドを放出することができる、生分解性マイクロスフェアであって、生分解性高分子担体と、それに封入された糖調節ペプチドを含む、前記生分解性マイクロスフェア。

【請求項 2】

糖調節ペプチドが、合成エキセンディン - 3、エキセンディン - 4 及びこれらの類似体及びアゴニストからなる群から選択される、請求項 1 に記載の生分解性マイクロスフェア。

【請求項 3】

糖調節ペプチドが、エキセンディン - 4 である、請求項 2 に記載の生分解性マイクロスフェア。

【請求項 4】

生分解性高分子が、ポリ - L - 乳酸、ポリ - D - 乳酸 - コ - グリコール酸、ポリ - L - 乳酸 - コ - グリコール酸およびポリ - D, L - 乳酸 - コ - グリコール酸からなる群から選択される、請求項 1 に記載の生分解性マイクロスフェア。

【請求項 5】

生分解性高分子が、ポリ - D, L - 乳酸 - コ - グリコール酸である、請求項 4 に記載の生分解性マイクロスフェア。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の生分解性マイクロスフェアの製造方法であって、高分子に有機溶媒を添加して高分子溶液を製造する工程（工程 1）；工程 1 の高分子溶液に糖調節ペプチドを分散し、薬物分散体を製造し、該薬物分散体に、アルコールまたはアルコールと有機酸との混合物を添加して、薬物分散溶液を製造する工程（工程 2）；及び工程 2 の薬物分散溶液からマイクロスフェアを製造する工程（工程 3）を含む、前記製造方法。

【請求項 7】

有機溶媒が、メチレンクロライド、エチルアセテートおよびクロロホルムからなる群から選択される、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】

工程 2 のアルコールが、メチルアルコールである、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 9】

工程 2 のアルコールが、アルコール：高分子溶液 = 1：1 ~ 1：6 の割合で用いられる、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 10】

工程 2 で製造された薬物分散溶液に対する添加剤をさらに含む、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 11】

添加剤が、ポリエチレングリコール、ラブラフィル、ラブラソール、中鎖トリグリセリド、レシチン、N - メチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロプロピルメチルセルロース、ツイーン、スパン、クレモフォア、ポロクサマー、ブリッジ、サンソフト 8 1 8 H からなる群から選択される、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

添加剤が、溶液の体積の 0.01 ~ 15% (w/v) の量で用いられる、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 13】

工程 3 が、工程 2 の薬物分散溶液を乳化剤を含む水溶液に分散させ、スターラーまたはホモジナイザーを用いてマイクロスフェアを形成し、凍結乾燥法または真空乾燥法で乾燥させることによって行われる、請求項 6 に記載の製造方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

乳化剤が、トリトン、ブリッジ、ポリビニルピロリドンおよびポリビニルアルコールからなる群から選択される、請求項 13 に記載の製造方法。

【請求項 15】

乳化剤が、メチレンクロライド、エチルアセテートおよびクロロホルムからなる群から選択される有機溶媒に飽和されている、請求項 13 に記載の製造方法。

【請求項 16】

工程 3 が、工程 2 の薬物分散溶液を噴霧乾燥器を用いて噴霧させることで行われる請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 17】

噴霧乾燥器が、薬物分散溶液の流入する温度を 115 ~ 125 に、放出される温度を 80 ~ 90 に設定されている、請求項 16 に記載の製造方法。

【請求項 18】

噴霧乾燥後、凍結乾燥または真空乾燥をさらに行う、請求項 16 に記載の製造方法。

【請求項 19】

生分解性高分子マイクロスフェアの製造方法であって、高分子に有機溶媒を添加して高分子溶液を製造する工程（工程 1）；

工程 1 の高分子溶液を、界面活性剤を含む糖調節ペプチド水溶液で乳化し、1 次乳化溶液を製造する工程（工程 2'）；及び

工程 2' の 1 次乳化溶液を、乳化剤を含む水溶液に分散させて、スターラー及びホモジナイザーで攪拌してマイクロスフェアを形成し、凍結乾燥法または真空乾燥法でマイクロスフェアを乾燥させる工程（工程 3'）

を含む、前記製造方法。

【請求項 20】

工程 1 の有機溶媒が、メチレンクロライド、エチルアセテート及びクロロホルムからなる群から選択される、請求項 19 に記載の製造方法。

【請求項 21】

界面活性剤が、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ラブラフィル、ラブラソール、中鎖トリグリセリド、レシチン、N - メチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロプロピルメチルセルロース、ツイーン、スパン、クレモフォア、ポロクサマー、ブリッジ及びサンソフト 818H からなる群から選択される、請求項 19 に記載の製造方法。

【請求項 22】

乳化剤が、トリトン、ブリッジ、ポリビニルピロリドンおよびポリビニルアルコールからなる群から選択される、請求項 19 に記載の製造方法。

【請求項 23】

乳化剤が、メチレンクロライド、エチルアセテートおよびクロロホルムからなる群から選択される有機溶媒に飽和されている、請求項 19 に記載の製造方法。

【請求項 24】

請求項 6 ~ 23 のいずれかに記載の製造方法によって製造された、糖調節ペプチドを制御放出するための生分解性高分子マイクロスフェア。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖調節ペプチドを生分解性高分子担体を含むマイクロスフェア内に封入して糖調節ペプチドを持続制御放出するようにした、生分解性高分子マイクロスフェア及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般的にタンパク質及びペプチド薬物は、大多数が経口投与時に胃の酸性環境下で活性

10

20

30

40

50

構造を失ったり酵素的分解によって破壊され、また胃または腸の粘膜で吸収される割合も非常に低い。そのため大部分のタンパク質及びペプチド薬物は、非経口投与、すなわち注射によって投与される。大部分の非経口投与されたタンパク質及びペプチド薬物は、生体内での短い半減期及び低い生体使用率のため、投与後にも反覆的に継続して注射しなければならず、数ヶ月間の長期間投与を要する場合が多い。このような問題点を解決するために、生体内で徐々に分解される性質を有した生分解性高分子担体内に薬物を封入して、高分子の分解が進行されるにつれて体内にタンパク質及びペプチド薬物を放出する生分解性高分子を使用した持続性、徐放性剤形の研究が活発に進行されている [Heller, J.等, Controlled release of water-soluble macromolecules from bioerodible hydrogels, *Bio materials*, 1983年, 第4巻, 262-266頁; Langer, R., *New methods of drug delivery*, *Science*, 1990年, 第249巻, 1527-1533頁; Langer, R., *Chem. Eng. Commun.*, 1980年, 第6巻, 1-48頁; Langer, R.S. and Peppas, N.A., *Biomaterials*, 1981年, 第2巻, 201-214頁; Heller, J., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1984年, 第1(1)巻, 39-90頁; Holland, S.J., Tighe, B.J. and Gould, P.L., *J. Controlled Release*, 1986年, 155-180頁]。

10

20

30

40

50

【0003】

現在、タンパク質及びペプチド薬物において、高分子担体で開発されて使用されている脂肪族ポリエステルは、すでにその生体適合性が認められてアメリカ食品医薬局 (FDA) によって承認を受け、薬物伝達用担体または手術用縫合糸などの用途で広く使用されている。脂肪族ポリエステルの具体的な例では、ポリ-L-乳酸、ポリグリコール酸、ポリ-D-乳酸-コ-グリコール酸、ポリ-L-乳酸-コ-グリコール酸、ポリ-D, L-乳酸-コ-グリコール酸 (以下「PLGA」とする)、ポリカプロラクトン、ポリバレロラクトン、ポリヒドロキシブチレート及びポリヒドロキシバレレートなどが含まれる [Peppas, L.B., *Int. J. Pharm.*, 1995年, 第116巻, 1-9頁]。

【0004】

最近、高分子量のペプチドやタンパク質など、新しい治療薬物が開発されるにつれて、これら薬物を高分子担体内に封入させて持続的に放出させようとする努力が多様に試みられているが、前述した脂肪族ポリエステルからなるマイクロスフェアにタンパク質薬物を封入した剤形の場合、薬物の初期過多放出 (initial burst effect)、または多くの要因の影響で一定期間の間、薬物の放出率が一定した速度に調節されず、封入された薬物が100%放出されないという不完全な放出 (Incomplete release) のような大きな難しさを有している。

【0005】

例えば、牛の血清アルブミン、リゾチームなどのモデルタンパク質薬物の場合、初期に多量の薬物が放出された後、最終放出量が50%前後で [Crotts, G. and Park, T.G., *J. Control. Release*, 1997年, 第44巻, 123-134頁; Leonard, N.B., Michael, L.H., Lee, M.M., *J. Pharm. Sci.*, 第84巻, 707-712頁]、組換え人間成長ホルモンを脂肪族ポリエステルを担体を使用してマイクロスフェアに封入した場合、30~50%のタンパク質薬物が初期に過多放出され、以後40~60%程度の量が放出されずにマイクロスフェア内に残っているということが報告された [Yan, C., 等, *J. Control. Release*, 1994年, 第32巻, 231-241頁; Kim, H.K. and Park, T.G., *Biotechnol. Bioeng.*, 1999年, 第65巻, 659-667頁]。

【0006】

このような薬物の初期過多放出は、マイクロスフェア表面及び孔に凝集または吸着していたタンパク質薬物が、初期に早い拡散によって放出が起きるからである。

【0007】

一方、タンパク質薬物がマイクロスフェアの製造工程中、水と有機溶媒による界面の影響で変性などによる非可逆的凝集が生じて不完全な放出が発生するようになり、このような現象は、タンパク質薬物の持続性伝達に大きな問題点となっている。このような界面の影響によるタンパク質薬物の変性を防止するために、界面活性剤 (例えば、非イオン系界面活性剤系列のツイーン、プルロニック F68 (Pluronic F68)、ブリッジ 35 (Brij 35)) と安定化剤 (例えば、マンニトール、ゼラチン、トレハロース (Trehalose)、カル

ボキシメチルセルロース)の使用が試みられていて、また一方では、水を排除した有機溶媒のみを使用してマイクロスフェアを製造することで、タンパク質変性の原因を除去したという報告がある [Gombotz, W. R., Healy, M., Brown, L., 米国特許第5019400号]。

【 0 0 0 8 】

また、一定期間の間、薬物放出率が一定速度に調節されないで、封入された薬物が 1 0 0 % 放出されないという不完全な放出問題を改善するため、分解速度が早い高分子と分解速度が遅い高分子を混合して、それらに薬物を封入する方法 [Ravivarapu, H. B., Burton, K., Deluca, P. P., Eur J Pharm Biopharm, 2000年, 第50(2)巻, 263-270頁; 韓国特許出願第1998-0062142号] 及び、薬物を分解速度が異なる二種類以上の高分子にそれぞれ封入して得たマイクロスフェアを適当な割合で混合して所望する期間の間、薬物が持続的に放出されるマイクロスフェア [米国特許第4897268号] を得る方法で研究が進行された。しかし、このような方法によるマイクロスフェア製造は、分解速度が早い高分子から由来した分解産物すなわち、乳酸とグリコール酸の影響によって pH が低くなり、分解速度が遅い高分子の分解がより早く進行して、それぞれの高分子に封入された薬物の放出速度の平均値とは異なる結果をもたらし、一つの剤形商品化のためにふたつ以上のマイクロスフェアを製造しなければならない工程上及び経済的に非効率的な短所がある [韓国特許出願第2000-0036178号]。

10

【 0 0 0 9 】

マイクロスフェアの一般的な製造方法は、相分離法 [米国特許第4673595号、韓国特許出願第2007-0031304号]、噴霧乾燥法 [韓国特許出願第2003-0023130号] そして、有機溶媒蒸発法 [米国特許第4389330号] が知られている。相分離法の場合、メチレンクロライド溶媒以外に、シリコンオイル、ヘプテン、エチルアルコールなどを一緒に使用しなければならないので、使用されたすべての有機溶媒を全て除去しなければならないなどの工程が複雑な短所を有していて、噴霧乾燥法の場合、高温で有機溶媒とともに 6 0 以上の高温で噴霧乾燥させることにより、タンパク質及びペプチドの変性をもたらす得る。したがって、一般的にタンパク質及びペプチドのマイクロスフェア製造には、有機溶媒蒸発法が最も多く使用されている。この方法では、薬物の封入率 (Encapsulation efficiency) が技術的に重要な部分であると言える [韓国特許出願第2003-0081179号]。

20

【 0 0 1 0 】

ゆえに、タンパク質あるいはペプチド含有徐放性マイクロスフェアを製造するにおいて、薬物の初期過多放出がなく、安定性放出期間に関係なく薬物放出を 0 次放出に維持しながら、薬物が 1 0 0 % 放出されないという不完全な放出なしに、製造方法が単純で、薬物の封入率が高く、封入された薬物の安定性が良く、経済的に効率的な製造方法が要求されている。

30

【 0 0 1 1 】

糖調節ペプチドは、インスリン依存性糖尿病、妊娠性糖尿病またはインスリン非依存性糖尿病の治療、肥満症の治療そして脂質代謝異常症の治療において、治療的な潜在力を有するとみられてきたペプチドの一分類群である [米国特許第6506724号]。例としては、エキセンディン - 3 (Exendin-3)、エキセンディン - 4 (Exendin-4) 及びこれらの類似体及びアゴニスト、またはグルカゴン、グルカゴン類似ペプチド (例えば、GLP - 1、GLP - 2) 及びこれらの類似体及びアゴニストを挙げることができる [韓国特許出願第2006-7015029号]。

40

【 0 0 1 2 】

エキセンディン - 4 は、3 9 個のアミノ酸で構成されたペプチドであり、ヘロデルマ・ホリヅム (Heloderma horridum) またはヘロデルマ・ススペクツム (Heloderma suspectum) というトカゲの唾腺から分離した生理活性ペプチドである。エキセンディン - 4 は、膵臓ベータ細胞によるインスリン分泌を促進させて、増加したグルカゴンの分泌を低めて、食欲を抑制して糖尿病及び肥満等の治療に有用である [Eng. J. 等, 1990年; Raufman, J. P. 1992年; Goeke, R. 1993; Thorens, B. 1993年]。

【 0 0 1 3 】

50

糖尿病の効果的な予防及び治療効果を提供するために、マイクロスフェアを通じた持続的なエキセンディン - 4 の伝達研究が進行された [韓国特許出願第2006-7023921号] 。しかし、相分離法による製造によって多くの有機溶媒使用及び除去のための複雑な工程、超音波工程の高エネルギーによる製造中のペプチド分解のような安定性問題、そして糖のような安定化剤及び放出率を好ましい特性として促進しようと放出率促進剤（例えば、無機酸及び無機塩）など、多くの賦形剤が使用されるなどの複雑で、非効率的な短所がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

したがって、本発明は、多くの有機溶媒を使用せず、超音波工程のような高エネルギー処理がなく、放出率促進剤を使用しない、複雑ではない方法で、糖調節ペプチドの初期過多放出がなく、0次放出を維持して、不完全な放出がなく、封入率が高くて、封入された糖調節ペプチドの安定性が高い、糖調節ペプチドを含む生分解性高分子マイクロスフェア及びその製造方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0015】

前記目的を達成するために本発明は、糖調節ペプチドを生分解性高分子担体を含むマイクロスフェア内に封入して、糖調節ペプチドを持続制御放出することができる糖調節ペプチド含有生分解性高分子マイクロスフェアを提供する。

【0016】

20

また、本発明は、前記生分解性高分子マイクロスフェアの製造方法を提供する。

【発明の効果】

【0017】

本発明による生分解性高分子マイクロスフェアは、エキセンディン - 4 徐放性製剤の初期過多放出がなく、0次放出を維持して、不完全な放出がなく、単純な製造工程で封入率が高くて、封入されたエキセンディン - 4 の安定性が良く、イン・ビトロ (in vitro) 及びイン・ビボ (in vivo) でマイクロスフェアからエキセンディン - 4 が3週以上持続的に放出されるようにする特徴を有する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

30

【図1】本発明の実施例1によって薬物分散体製造工程を経て製造されたマイクロスフェアのイン・ビトロでの放出パターン試験結果を示したグラフである。

【図2】本発明の実施例4～8で製造されたマイクロスフェアのイン・ビトロでの放出パターン試験結果を示したグラフである。

【図3】本発明の比較例1～2で製造されたマイクロスフェアのイン・ビトロでの放出パターン試験結果を示したグラフである。

【図4】本発明の実施例1-1で製造されたマイクロスフェアの実験動物での放出パターン試験結果を示したグラフである。

【図5】本発明の実施例1-1で製造されたマイクロスフェアでエキセンディン - 4 を抽出して、逆相高性能液体クロマトグラフィー (R P - H P L C) で分析したエキセンディン - 4 のクロマトグラムである。

40

【0019】

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

【0020】

本発明は、糖調節ペプチドを生分解性高分子担体を含むマイクロスフェア内に封入して、糖調節ペプチドを持続制御放出することができる生分解性高分子マイクロスフェアを提供する。

【0021】

本発明に使用できる糖調節ペプチドの例としては、天然型、組換えあるいは合成エキセ

50

ンディン - 3、エキセンディン - 4 及びこれらの類似体、アゴニスト、またはグルカゴン、グルカゴン類似ペプチド（例えば、GLP - 1、GLP - 2）及びこれらの類似体、アゴニストを挙げることができ、好ましくは、合成エキセンディン - 3、エキセンディン - 4 及びこれらの類似体、アゴニストを挙げることができ、最も好ましくは、合成エキセンディン - 4 を挙げることができる。

【0022】

マイクロスフェアでの糖調節ペプチドの含量は、用法用量、タンパク質特性によって適切に選択することができる。

【0023】

生分解性ポリエステル系高分子は、マイクロスフェアの形態を維持しながら内部に糖調節ペプチドを含み、高分子が徐々に分解されながら内部の糖調節ペプチドを放出する役割をし、その例としては、ポリ - L - 乳酸、ポリグリコール酸、ポリ - D - 乳酸 - コ - グリコール酸、ポリ - L - 乳酸 - コ - グリコール酸、ポリ - D, L - 乳酸 - コ - グリコール酸、ポリカプロラクトン、ポリバレロラクトン、ポリヒドロキシブチレートまたはポリヒドロキシバレートを挙げることができるが、必ずこれに限定されるのではなく、当該分野で通常使用される生分解性ポリエステル系高分子なら特別に制限されない。好ましくは、ポリ - L - 乳酸、ポリ - D - 乳酸 - コ - グリコール酸、ポリ - L - 乳酸 - コ - グリコール酸及びポリ - D, L - 乳酸 - コ - グリコール酸（PLGA）からなる群から選択される1種以上の高分子を挙げることができ、より好ましくは、ポリ - D, L - 乳酸 - コ - グリコール酸（PLGA）単独またはポリ - L - 乳酸を含んだ2種以上の混合高分子である。

10

20

【0024】

また、本発明は、前記糖調節ペプチドを持続制御放出することができる生分解性高分子マイクロスフェアの製造方法を提供する。

【0025】

本発明による生分解性高分子マイクロスフェアは、高分子に有機溶媒を添加して高分子溶液を製造する工程（工程1）；前記工程1で製造した高分子溶液に糖調節ペプチドを添加して糖調節ペプチドが高分子溶液に分散した薬物分散体を製造した後、アルコールまたはアルコールと有機酸の混合物を添加して薬物分散溶液を製造する工程（工程2）；及び前記工程2で製造された薬物分散溶液を使用してマイクロスフェアを製造する工程（工程3）とを含む方法で製造することができる。

30

【0026】

以下、前記製造方法を各工程別に具体的に説明する。

【0027】

まず、工程1は、高分子溶液を製造する工程である。

【0028】

工程1では、高分子に有機溶媒を添加して溶解させる。ここで使用される高分子には、生分解性高分子担体を使用することができ、好ましくは、生分解性ポリエステル系高分子を使用することができる。有機溶媒は、生分解性高分子担体に対する溶媒性と蒸発による除去容易性がともに優れた揮発性有機溶媒なら特別に制限されない。ここで、本発明に使用される有機溶媒は、高分子を溶解させる溶解剤の役割だけではなく、糖調節ペプチドを高分子溶液に均一に分散させる分散剤としても作用する。

40

【0029】

本発明の有機溶媒では、メチレンクロライド、エチルアセテート、クロロホルム、アセトン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドン、ジオキサソラン、テトラヒドロフラン、エチルアセテート、メチルエチルケトンまたはアセトニトリル及びこれらの混合溶媒等があり、メチレンクロライド、エチルアセテート、クロロホルムが好ましく、メチレンクロライドを使用することが最も好ましい。

【0030】

次に、工程2は、薬物分散溶液を製造する工程である。

50

【0031】

工程2では、有機溶媒に高分子が溶解された高分子溶液に糖調節ペプチドを添加して、薬物分散体を作る。糖調節ペプチドは、上述したとおりであり、好ましくは合成エキセンディン-4を添加して薬物分散体を作る。前記薬物分散体で、糖調節ペプチド：高分子（w/w）の割合は、糖調節ペプチドを溶解させることができる範囲で選択される。

【0032】

次に、得た薬物分散体にアルコールまたはアルコールと有機酸の混合物を添加して薬物分散体を溶解させる。アルコールまたはアルコールと有機酸の混合物は、高分子と糖調節ペプチドを同時に溶解することができる溶解剤として作用する。ここで、添加剤として安定化剤または界面活性剤をさらに添加することができる。

10

【0033】

本発明の製造方法において、薬物分散溶液を製造する工程では、高分子に有機溶媒を加えた後、糖調節ペプチドを添加後、アルコールまたはアルコールと有機酸の混合物を添加しなければならない前記製造方法の手順が非常に重要である。手順を変えて高分子に有機溶媒、アルコールまたはアルコールと有機酸の混合物の順序で添加した後、糖調節ペプチドを溶解させた溶液でマイクロスフェアを作ったり、高分子を有機溶媒に溶解させた溶液に糖調節ペプチドをアルコールまたはアルコールと有機酸の混合物に溶解させた溶液を添加して製造したりした溶液でマイクロスフェアを作る場合、不完全放出傾向を有するようになる。

【0034】

アルコールでは、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールなどがあるが、好ましくは前記生分解性高分子担体と糖調節ペプチドに対する溶解性が優れたアルコールであるメチルアルコールを使用することができる。薬物分散体を溶解させるために添加するアルコールは、薬物分散体を溶解させることができる最少用量で使用することが好ましく、添加用量はアルコールの種類によって適当な割合で選択することができる。メチルアルコールの場合、薬物分散体に対して1：1～6：1（薬物分散体：アルコール、v/v）の割合で添加して薬物分散体を完全に溶解させることが好ましく、3：1～4：1の割合で添加することがさらに好ましい。

20

【0035】

また、有機酸では、高分子担体及び糖調節ペプチドに対する溶解性を有したものであれば特に制限されない。例えば、シュウ酸、オキサロ酢酸、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸、酢酸、ブチル酸、パルミチン酸、酒石酸、アスコルビン酸、尿酸、スルホン酸、スルフィン酸、ギ酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、核酸等があるが、好ましくは、酢酸とギ酸、またはそれらの混合物が使用できる。添加する有機酸の用量は、アルコールと同様に有機酸の種類によって適当な割合で選択することができる。

30

【0036】

添加剤としては、薬物分散体を溶解させることができ、薬物分散体を溶解させることができる溶媒に対する溶解性を有したものに特別に制限されない。例えば、ポリエチレングリコール類（ソルトルHS-15（登録商標）、TPGS（登録商標）、ゲルシア（登録商標））、オイル類（ラブラフィル（登録商標）、ラブラソール（登録商標）、中鎖トリグリセリド（登録商標））、タンパク質類（レクチン）、界面活性剤（N-メチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ツイーン（登録商標）、スパン（登録商標）、クレモフォア（登録商標）、ポロキサマー（登録商標）、ブリッジ（登録商標）、サンソフト818H（登録商標））及びヒドロプロピルメチルセルロースなどを挙げることができ、使用量は、溶解剤での濃度で0.01～15%（w/v）、好ましくは0.1～12.5%（w/v）で使用する。

40

【0037】

次に、工程3は、前記工程2で製造された薬物分散溶液を使用してマイクロスフェアを製造する工程である。

【0038】

50

ここで、マイクロスフェアを製造する方法では、前記薬物分散溶液を乳化剤が溶解された水溶液に分散させて製造するか、噴霧乾燥器を使用して製造する方法を用いることができる。

【0039】

前記薬物分散溶液を乳化剤が溶解された水溶液に分散させてマイクロスフェアを製造する場合、スターラー及びホモジナイザーを使用してマイクロスフェアを形成及び乾燥させることにより製造することができる。ここで、使用される乳化剤は、有機溶媒に分散する親油性乳化剤または水溶液に分散する親水性乳化剤を使用することができる。親水性乳化剤の例としては、ツイーン、トリトン、ブリッジ、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどを挙げることができ、好ましくはポリビニルアルコールを挙げることができる。乳化剤は、有機溶媒が飽和されなかつたり飽和された形態で使用することができ、有機溶媒では、メチレンクロライド、エチルアセテート、クロロホルムが好ましく、メチレンクロライドを使用することが最も好ましい。前記乳化剤の使用量は、水溶液での濃度で0.01~5.0% (w/v)、好ましくは0.5~2% (w/v)で使用することができる。

10

【0040】

前記工程で乾燥は、凍結乾燥または真空乾燥が用いられ、凍結乾燥法でマイクロスフェアを製造する時は、遠心分離法を通じて、真空乾燥法でマイクロスフェアを製造する時は、真空フィルターシステムを通じてマイクロスフェアを回収した後、それぞれの乾燥法でマイクロスフェアを乾燥させることができる。

20

【0041】

このような方法で製造されたマイクロスフェアは、O/W型のマイクロスフェアが製造され、平均粒子サイズは、注射に相応しい5~70 μ m、好ましくは10~30 μ mを有する。ここで、粒子サイズは、薬物分散溶液であるオイル相と乳化剤が溶解された水溶液である水相の体積比を調節して多様に製造することができる。

【0042】

前記薬物分散溶液を噴霧乾燥器を使用してマイクロスフェアを製造する場合には、前記薬物分散溶液を噴霧乾燥器に入れて噴霧させることで直ちにマイクロスフェアを製造することができる。ここで効果的なマイクロスフェアの製造のために噴霧乾燥器に流入する温度と放出する温度は、それぞれ115~125、80~90であることが好ましい。以後、噴霧乾燥製造されたマイクロスフェアから残留溶媒を除去するために上述した凍結乾燥、真空乾燥のような乾燥過程をさらに経ることができる。

30

【0043】

また、本発明による生分解性高分子マイクロスフェアは、高分子に有機溶媒を添加して高分子溶液を製造する工程(工程1)；前記工程1で製造した高分子溶液に界面活性剤が含まれた糖調節ペプチド水溶液を添加して1次乳化溶液を製造する工程(工程2')；及び前記工程2'で製造された1次乳化溶液を使用してマイクロスフェアを製造する工程(工程3')とを含む方法で製造することができる。

【0044】

工程1では、高分子に有機溶媒を添加して溶解させる。ここで使用される高分子には、生分解性高分子担体を使用することができ、好ましくは生分解性ポリエステル系高分子を使用することができる。有機溶媒は、生分解性高分子担体に対する溶媒性と蒸発による除去容易性がともに優れた揮発性有機溶媒なら特別に制限されない。ここで、本発明に使用される有機溶媒は、高分子を溶解させる溶解剤の役割だけではなく糖調節ペプチドを高分子溶液に均一に分散させる分散剤としても作用する。

40

【0045】

本発明の有機溶媒では、メチレンクロライド、エチルアセテート、クロロホルム、アセトン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、ジオキサソラン、テトラヒドロフラン、エチルアセテート、メチルエチルケトンまたはアセトニトリル

50

及びこれらの混合溶媒等があり、メチレンクロライド、エチルアセテート、クロロホルムが好ましく、メチレンクロライドを使用することが最も好ましい。

【0046】

工程2'では、有機溶媒に高分子が溶解された高分子溶液に界面活性剤が含まれた糖調節ペプチド水溶液を添加した後、スターラーあるいはホモジナイザーを使用して1次乳化溶液を製造する。ここで、糖調節ペプチドには、合成エキセンディン-4を添加することが好ましい。高分子溶液に前記界面活性剤が含まれた糖調節ペプチド水溶液を添加する場合には、最終的にW/O/W型の二重乳化マイクロスフェアが形成される。

【0047】

前記工程2'で糖調節ペプチド水溶液に界面活性剤をさらに添加することができる。ここで添加する界面活性剤は、糖調節ペプチドを溶解させて水溶液を製造することができるものならどんな形態も可能であり、例えば、ツイーン、トリトン、ブリッジ、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどを使用することができる。

10

【0048】

工程3'では、前記工程2'で得られた1次乳化溶液を乳化剤が溶解された水溶液に分散させて、スターラー及びホモジナイザーを使用してマイクロスフェアを形成及び乾燥させることでマイクロスフェアを製造する。ここで、使用される乳化剤は、有機溶媒に分散する親油性乳化剤または水溶液に分散する親水性乳化剤を使用することができる。親水性乳化剤の例では、ツイーン、トリトン、ブリッジ、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどを挙げることができ、好ましくはポリビニルアルコールを挙げるができる。乳化剤は、有機溶媒が飽和されなかつたり飽和された形態で使用することができ、有機溶媒としては、メチレンクロライド、エチルアセテート、クロロホルムが好ましく、メチレンクロライドを使用することが最も好ましい。前記乳化剤の使用量は、水溶液での濃度で0.01~5.0%(w/v)、好ましくは、0.5~2%(w/v)で使用することができる。

20

【0049】

前記工程で乾燥は、凍結乾燥または真空乾燥を用いることができ、凍結乾燥法でマイクロスフェアを製造する時は遠心分離法を通じて、真空乾燥法でマイクロスフェアを製造する時は真空フィルターシステムを通じてマイクロスフェアを回収した後、それぞれの乾燥法でマイクロスフェアを乾燥させることができる。

30

【0050】

前記方法で製造されたマイクロスフェアは、エキセンディン-4徐放性製剤の初期過多放出がなく、0次放出を維持して、不完全な放出がなく、単純な製造工程で封入率が高く、封入されたエキセンディン-4の安定性が良く、イン・ビトロ及びイン・ビボのマイクロスフェアからエキセンディン-4が3週以上持続的に放出されるようにでき、エキセンディン-4徐放性製剤として有用に使用することができる。

【発明を実施するための形態】

【0051】

以下、本発明を実施例によってより詳細に説明する。但し、下記実施例は、本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が実施例によって限定されるのではない。

40

【0052】

<実施例1>高分子種類及び混合比によるマイクロスフェアの製造(O/W型)

高分子(ベーリンガーインゲルハイム社)300mgをメチレンクロライドに完全に溶解させて高分子溶液を製造し、エキセンディン-4(アメリカンペプタイド社)9mgを高分子溶液に入れてエキセンディン-4分散体を製造した。高分子は、下記表1に示したように1種の高分子または分子量や特性が異なる高分子2種を混合比を異にして製造した。高分子の種類及び混合比を異にして製造された薬物分散体にメチルアルコールを薬物分散体の割合で1:4(v/v)で添加して薬物分散溶液を製造した後、薬物分散溶液10mlをメチレンクロライドで飽和させた250mlのポリビニルアルコール1%水溶液(w/v)に注入してスターラーあるいはホモジナイザーを使用して乳化させてマイクロス

50

フェアを形成させた。このように形成したマイクロフェアを数時間、常温、常圧下で攪拌してメチレンクロライドを空气中に徐々に蒸発させながら硬化させてそれを遠心分離した後、蒸留水で洗浄した後、 -70 で凍結した後、adVantage (VirTis社, NY, 米国) モデルを使用して常温、 50 mTorr で3日間凍結乾燥して、最終的にO/W形態のエキセンディン-4が持続的に放出されるマイクロフェア剤形を製造した。

【0053】

【表1】

実施例	エキセンディン-4 (mg)	高分子 (mg)	高分子の種類	混合比
1-1	9	300	RG502H	1
1-2			RG502H:R202	90:10
1-3			RG502H:R202	80:20
1-4			RG502H:RG502	90:10
1-5			RG502H:RG502	80:20
1-6			RG502H:RG503	90:10
1-7			RG502H:RG503	80:20

10

【0054】

<実施例2> 薬物分散体に対するアルコールの割合によるマイクロフェアの製造 (O/W型)

20

高分子 (RG502H、ベーリンガーインゲルハイム社) 300 mg をメチレンクロライドに完全に溶解させて高分子溶液を製造して、エキセンディン-4 (アメリカンペプタイド社) 9 mg を高分子溶液に入れてエキセンディン-4分散体を製造した。このように製造された薬物分散体に、下記表2に示したようにメチルアルコールをエキセンディン-4分散体の割合で1:1~1:7 (v/v) 範囲で添加して薬物分散溶液を製造し、これを乳化させてマイクロフェアを製造、乾燥する工程は実施例1と同様に製造した。

【0055】

【表2】

実施例	メチルアルコール (体積)	エキセンディン-4 分散体 (体積)	薬物分散溶液の状態
2-1	1	1	溶液
2-2		2	溶液
2-3		3	溶液
1-1		4	溶液
2-4		5	溶液
2-5		6	溶液
2-6		7	分散体

30

【0056】

表2に示したように、薬物分散体に対するメチルアルコールの体積比が7以上の場合には、溶液を形成しないこともあることを確認した。

40

【0057】

<実施例3> 添加剤を含有した薬物分散溶液を使用したマイクロフェアの製造 (O/W型)

実施例1-1と同一の方法でマイクロフェアを製造した。但し、製造された薬物分散溶液に下記表3に示したように多様な添加剤を溶媒体積対比0.1または12.5%取って薬物分散溶液と混合して、混合有無を表3に示した。

【0058】

【表 3】

実施例	エキセンデ イン-4 (mg)	高分子 (mg)	添加剤	混合有無	
				0.1%	12.5%
3-1	9	300	ゾルトルHS-15	○	○
3-2			TPGS	○	○
3-3			ゲルシア	○	○
3-4			ラブラフィル	○	○
3-5			ラブラソール	○	○
3-6			中鎖トリグリセリド	○	○
3-7			レシチン	○	○
3-8			N-メチルピロリドン	○	○
3-9			ポリビニルピロリドン	○	○
3-10			ヒドロプロピルメチルセル ロース	○	○
3-11			ツイーン	○	○
3-12			スパン	○	○
3-13			クレモフォア	○	○
3-14			ポロクサマー	○	○
3-15			ブリッジ	○	○
3-16			サンソフト818H	○	○

10

【0059】

20

表3に示したように、薬物分散溶液に多様な添加剤が広い濃度範囲で混合することができることを確認した。

【0060】

<実施例4>有機溶媒で飽和されない乳化剤水溶液を使用したマイクロスフェアの製造(O/W型)

実施例1-1と同一の方法でマイクロスフェアを製造した。但し、製造された薬物分散溶液をメチレンクロライドが飽和されない250mlのポリビニルアルコール1%水溶液(w/v)に注入してスターラーあるいはホモジナイザーを使用して乳化させた。

【0061】

<実施例5>粒子サイズが異なるマイクロスフェアの製造(O/W型)

30

実施例1-1と同一の方法でマイクロスフェアを製造した。但し、メチレンクロライドで飽和させたポリビニルアルコール1%水溶液(w/v)と薬物分散溶液の体積比すなわち、水相対油相の体積比を表4に示したように異なるようにして粒子サイズが異なるマイクロスフェアを製造した。

【0062】

【表4】

実施例	エキセンデ イン-4 (mg)	高分子 (mg)	水相対油相の体積比
5-1	9	300	1:15
5-2			1:30
5-3			1:60

40

【0063】

<実施例6>乾燥方法によるマイクロスフェアの製造(O/W型)

実施例1-1と同一の方法で製造されたマイクロスフェアを数時間、常温、常圧下で攪拌してメチレンクロライドを空气中に徐々に蒸発させながら硬化させて、それを真空フィルターシステムでろ過、蒸留水で洗浄、マイクロスフェア以外の水を除去してサンプルを準備した後、最終乾燥は、adVantage(VirTis社, NY, 米国)モデルを使用して常温で50mTorrの圧力で3日間真空乾燥した。

【0064】

50

< 実施例 7 > 噴霧乾燥法を使用したマイクロスフェアの製造 (O/W 型)

実施例 1 - 1 と同一の方法で製造された薬物分散溶液を乳化剤水溶液と混合しないで分当り 2.5 ml で噴霧乾燥器 (Buchi Mini spray dryer, B-290) に注入しながら 0.7 mm ノズルを通じて 400 Nl/h で噴霧乾燥した。この噴霧乾燥製造されたマイクロスフェアから残留溶媒を除去するために、真空乾燥してエキセンディン - 4 が持続的に放出されるマイクロスフェア剤形を製造した。ここで、噴霧乾燥器に流入する温度と放出される温度は、それぞれ 120 ± 2 と 85 ± 2 であった。

【0065】

< 実施例 8 > 薬物水溶液を使用したマイクロスフェアの製造 (W/O/W 型)

高分子 (RG502H, ベーリンガーインゲルハイム社) 300 mg をメチレンクロライドに完全に溶解させて高分子溶液を製造して、エキセンディン - 4 (アメリカンペプタイド社) 9 mg を 0.3 ml のポリビニルアルコール 0.5% 水溶液 (w/v) に溶解させたエキセンディン - 4 水溶液を高分子溶液に入れて、ホモジナイザーを使用して 1 次乳化溶液を製造した。このように製造された 1 次乳化溶液 10 ml をメチレンクロライドで飽和させた 250 ml のポリビニルアルコール 1% 水溶液 (w/v) に注入して、スターラーあるいはホモジナイザーを使用して 2 次乳化させてマイクロスフェアを形成させた。このように形成されたマイクロスフェアを数時間、常温、常圧下で攪拌してメチレンクロライドを空气中に徐々に蒸発させながら硬化させて、それを遠心分離した後、蒸留水で洗浄した後、 -70 で凍結した後、adVantage (VirTis 社, NY, 米国) モデルを使用して常温、50 mTorr で 3 日間凍結乾燥して、最終的に W/O/W 形態のエキセンディン - 4 が持続的に放出されるマイクロスフェア剤形を製造した。

【0066】

< 比較例 1 > 薬物分散体過程を経ない O/W 型マイクロスフェアの製造 (1)

高分子 (RG502H, ベーリンガーインゲルハイム社) 300 mg をメチレンクロライドに完全に溶解した後、メチルアルコールをメチレンクロライド体積比 (メチルアルコール:メチレンクロライド、v/v) で 1:4 の割合で添加して高分子/メチレンクロライド/メチルアルコール溶液を製造した。この溶液にエキセンディン - 4 を 9:300 (エキセンディン - 4:高分子、w/w) の割合で取った後、高分子/メチレンクロライド/メチルアルコール溶液に入れて、薬物分散体過程を経ない薬物分散溶液を製造することを除き実施例 1 と同一の方法でマイクロスフェアを製造した。

【0067】

< 比較例 2 > 薬物分散体過程を経ない O/W 型マイクロスフェアの製造 (2)

エキセンディン - 4 9 mg をメチルアルコール 0.2 ml に完全に溶解した後、高分子 (RG502H, ベーリンガーインゲルハイム社) 300 mg を完全に溶解した 0.8 ml の高分子/メチレンクロライド溶液に先で製造したエキセンディン - 4/メチルアルコール溶液を添加してエキセンディン - 4 分散体を経ない薬物分散溶液を製造することを除き実施例 1 と同一の方法でマイクロスフェアを製造した。

【0068】

< 実験例 1 > マイクロスフェア内のエキセンディン - 4 の封入効率確認

実施例 1 及び 4 ~ 8 で製造されたエキセンディン - 4 含有マイクロスフェア 30 mg を取ってポリスチレン容器に入れて、0.5 ml の DMSO 溶液に十分に溶解させた後、1.5 ml の蒸留水を加えて 12 時間以上攪拌してエキセンディン - 4 を水相 (蒸留水) で抽出した。このように抽出されたエキセンディン - 4 の量を定量した後、封入効率を計算した。封入効率は、理論封入量に対する実際封入量の百分率である。

計算結果を表 5 に示した。

【0069】

10

20

30

40

【表 5】

実施例	封入効率 (%)
1-1	85
1-2	86
1-3	88
1-4	81
1-5	83
1-6	84
1-7	80
4	84
5-1	85
5-2	85
5-3	84
6	85
7	93
8	83

10

【0070】

表 5 に示したように、本発明によって製造されたマイクロスフェアの封入効率は、80% 以上であり、薬物の封入効率が非常に高いことを確認した。

【0071】

<実験例 2> マイクロスフェアの平均粒子サイズ測定

20

実施例 1 及び 4 ~ 8 で製造されたエキセンディン - 4 含有マイクロスフェア 30 mg を取って、ツイーン 20 が 0.02% (v/v) 入っている蒸留水 1 l に分散させた後、粒度分析機でマイクロスフェアの平均粒子サイズを測定した。測定結果を表 6 に示した。

【0072】

【表 6】

実施例	マイクロスフェアの平均粒子サイズ (μm)
1-1	22
1-2	16
1-3	18
1-4	16
1-5	19
1-6	22
1-7	21
4	26
5-1	8
5-2	25
5-3	65
6	21
7	59
8	16

30

40

【0073】

表 6 に示したように、本発明によって製造されたマイクロスフェアの平均粒子サイズは、8 ~ 65 μm であり、注射投与時に針の直径が小さな注射針も使用することができることを確認した。

【0074】

<実験例 3> 製造されたマイクロスフェアのイン・ビトロ放出

下記の条件で実施例及び比較例で製造されたエキセンディン - 4 含有マイクロスフェアのイン・ビトロエキセンディン - 4 放出特性評価を行なった。

【0075】

ポリスチレン容器内に 30 mg の乾燥したマイクロスフェアを 0.02% (w/v) の

50

ツイーン20を含んだ1.5mlのPBS(pH7.4)溶液で分散させた後、37で培養(Incubation)しながら時間経過によって遠心分離してマイクロスフェアを沈澱させて、上澄み液中の薬物の濃度を測定してマイクロスフェアから放出されるエキセンディン-4の量を測定した。沈澱させたマイクロスフェアは、また新しい緩衝溶液(PBS)に分散させて放出実験を継続した。培養日にしたがって測定されたマイクロスフェアから放出されるエキセンディン-4の放出量(%)を図1~図3に示した。

【0076】

図1及び図2は、それぞれ本発明によってエキセンディン分散体製造工程を経て製造された実施例1及び実施例4~8のエキセンディン-4含有マイクロスフェアのイン・ビトロ放出実験結果で、図3はエキセンディン分散体製造工程を経ない比較例1及び2のエキセンディン-4含有マイクロスフェアのイン・ビトロ放出実験結果であり、時間経過によってエキセンディン-4を含んだマイクロスフェアから放出されたエキセンディン-4の量を示したグラフである。

10

【0077】

図1及び図2に示したように、本発明によってエキセンディン分散体製造工程を経て製造されたマイクロスフェアは、初期過多放出がなく(1日で3%のエキセンディン-4が放出)21日間、0次放出されて不完全放出が起きないことを確認した。

【0078】

これと比較して図3に示したように、エキセンディン分散体製造工程を経ないで製造したマイクロスフェアの場合には、21日間に83%(比較例1)、49%(比較例2)のみ放出され、不完全な放出が起きることを確認した。

20

【0079】

したがって、本発明によって製造されたエキセンディン-4含有マイクロスフェアは、エキセンディン-4の初期過多放出がなく、0次放出を維持して、不完全な放出がなく、エキセンディン-4が3週以上持続的に放出されるので、エキセンディン-4徐放性製剤として有用に使用することができる。

【0080】

<実験例4>製造されたマイクロスフェアの薬物速度論的評価

下記の条件で実施例及び比較例で製造されたエキセンディン-4含有マイクロスフェアのイン・ビトロエキセンディン-4放出特性及び薬物速度論的評価を行なった。

30

【0081】

実施例1、4~8、及び比較例1~2で製造されたマイクロスフェアをエキセンディン-4の量を基準に、140µgを取って、1.5%CMC、0.5%ツイーン20、そして0.9%塩化ナトリウムを含んだ水溶性懸濁液に懸濁して各用量を5匹のスプラグ・ドリーラットにそれぞれ約0.2mlずつ皮下注射した。その後、適当な時間間隔で血液を採取して血清中のエキセンディン-4の量をELISAを使用して測定してマイクロスフェアから放出されるエキセンディン-4の放出量を測定して図4に示した。図4は、実施例1-1で製造されたマイクロスフェアの実験動物でのエキセンディン-4の放出パターンを示したグラフである。

【0082】

40

図4に示したように、本発明によって製造されたマイクロスフェアの実験動物でのエキセンディン-4の放出パターンは、図1のイン・ビトロ放出結果と類似に初期放出がなく、20日以上エキセンディン-4が0次で持続放出され、不完全な放出がないことを確認した。

【0083】

また、測定されたエキセンディン-4の放出量からWinNonlinプログラムを使用して実験動物で薬物動態学的パラメーターである血中最高濃度(C_{max})及びAUC_{0-14d}を計算して表7に示した。

【0084】

【表 7】

区分	C_{max} (ng/ml)	AUC_{0-14d} (day*ng/ml/mg/kg)
実施例 1-1	1.92±0.30	11.85±0.30
実施例 1-2	2.78±0.69	9.29±0.57
実施例 1-3	1.33±0.20	9.24±0.76
実施例 1-4	1.18±0.12	9.63±1.08
実施例 1-5	1.04±0.13	8.98±0.62
実施例 1-6	2.26±0.37	9.92±0.81
実施例 1-7	4.02±0.15	9.31±0.67
実施例 4	1.91±0.11	12.05±0.78
実施例 5-1	3.13±0.31	9.74±1.08
実施例 5-2	1.31±0.11	12.01±0.11
実施例 5-3	1.29±0.10	11.07±0.91
実施例 6	2.05±0.33	10.84±0.78
実施例 7	1.67±0.27	8.31±0.27
実施例 8	3.28±0.42	9.40±0.58
比較例 1	0.94±0.17	5.34±0.61
比較例 2	0.85±0.24	5.07±0.20

10

【0085】

表 7 に示すように、実施例 1-1 ~ 1-7、4、5-1 ~ 5-3、6 ~ 8 すべて C_{max} 及び AUC 測定値が比較例 1 及び 2 と比較して高く示されることが分かる。このことから、本発明の製造方法によって製造された高分子マイクロスフェアは、エキセンディン-4 の放出に優れていることが分かる。

20

【0086】

結論的に、図 4 及び表 7 の結果を参照すると、本発明は、エキセンディン-4 を 2 ~ 4 週以上持続的に放出するのみならず、エキセンディン-4 の放出程度も優秀であり、薬物が放出されない期間 (lag-phase) もない、優れたエキセンディン-4 含有生分解性高分子マイクロスフェア剤形を製造することができることが分かる。

【0087】

< 実験例 5 > エキセンディン-4 含有マイクロスフェア内のエキセンディン-4 の安定性評価

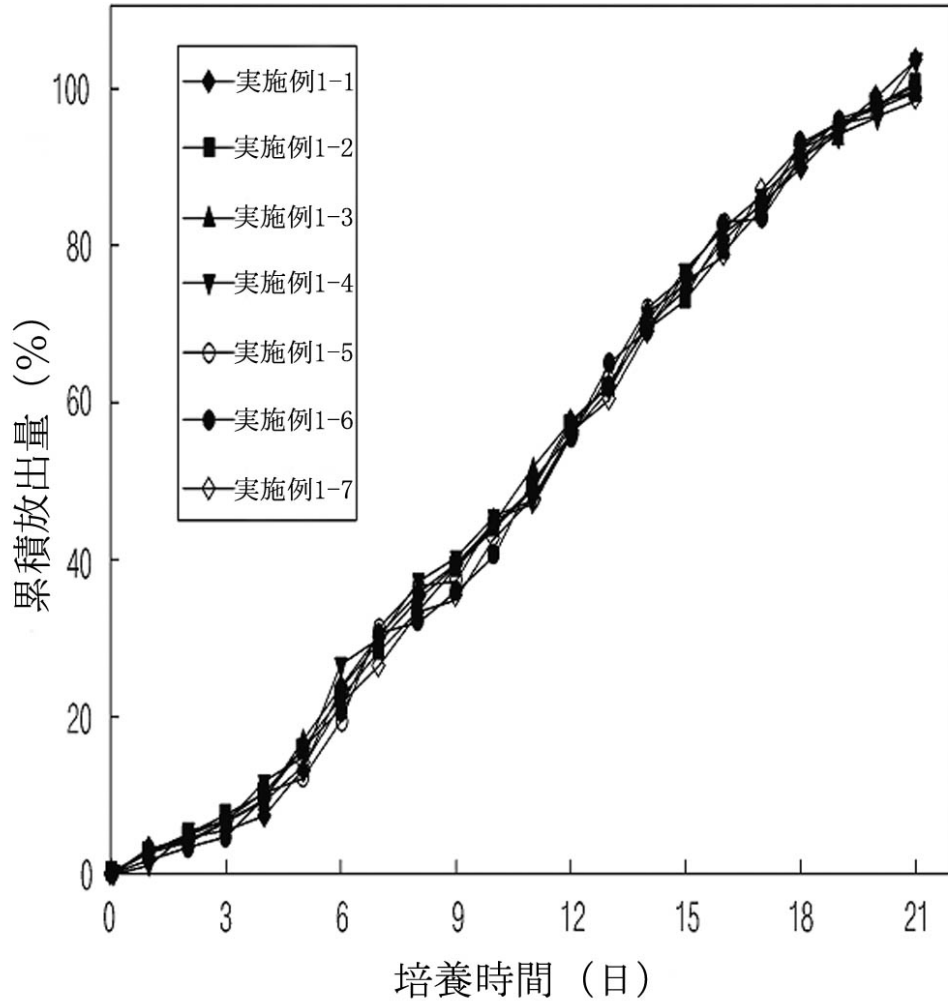
30

実施例 1-1 で製造されたエキセンディン-4 含有マイクロスフェア 10 mg を取ってポリスチレン容器に入れて、1 ml の DMSO 溶液に十分に溶解させた。この溶液を重炭酸アンモニウムで 1 / 5 希釈後、逆相高性能液体クロマトグラフィー分析 (RP-HPLC) を実施して、エキセンディン-4 のピーク及び検出時間を観察した。その結果を図 5 に示した。

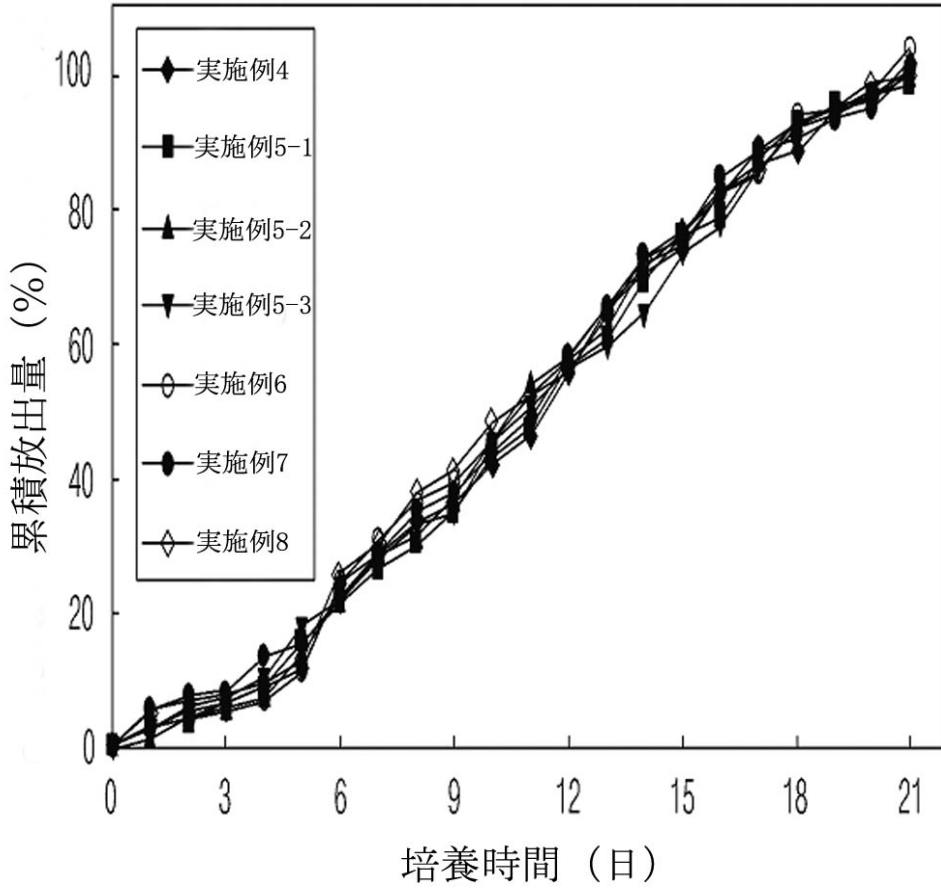
【0088】

図 5 は、実施例 1-1 で製造されたエキセンディン-4 含有マイクロスフェアで得られたエキセンディン-4 のクロマトグラムである。図 5 に示したように、エキセンディン-4 の単一ピークを確認することができ、維持時間も比較物質と一致することを確認した。

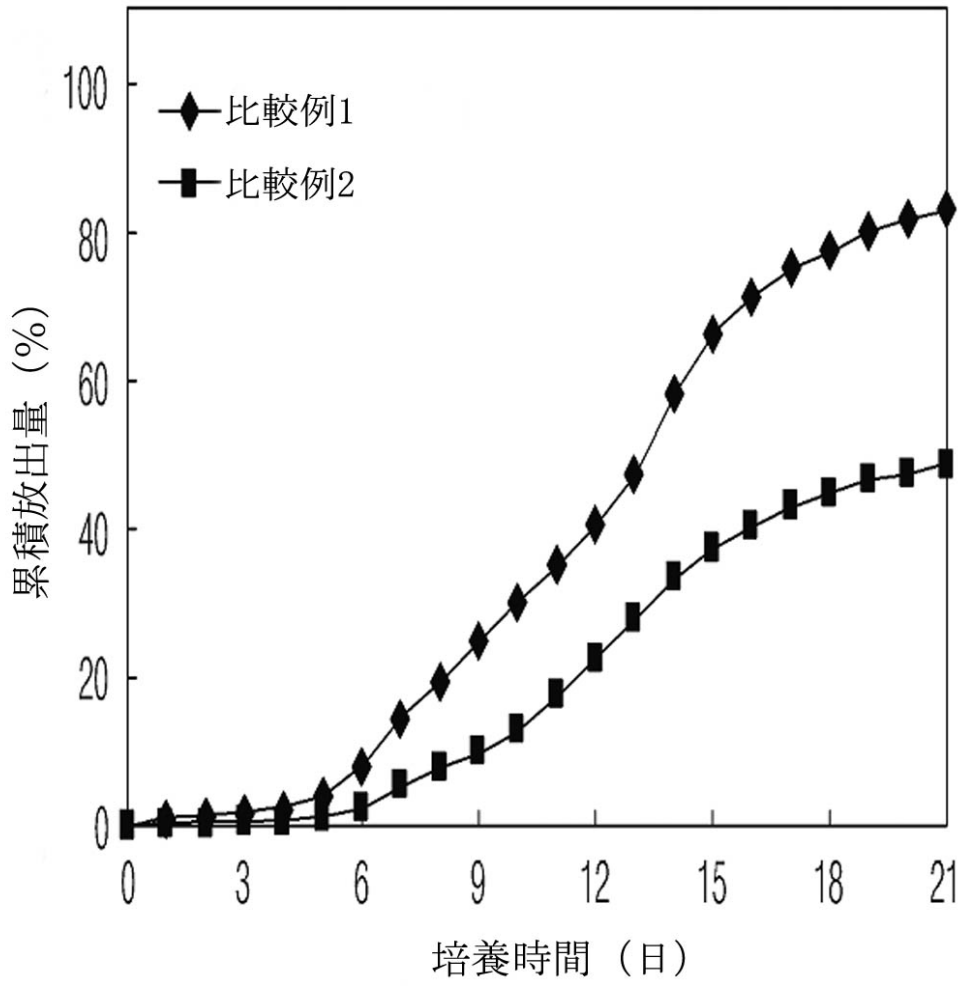
【 図 1 】



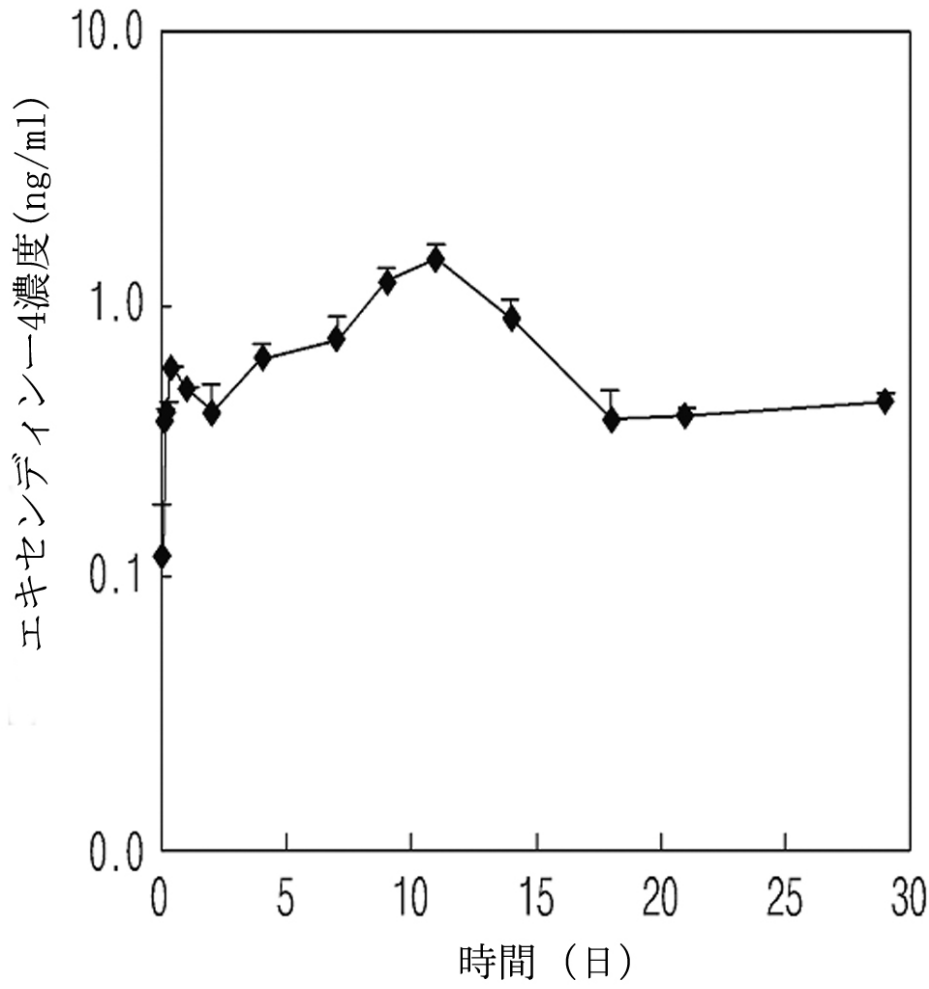
【 図 2 】



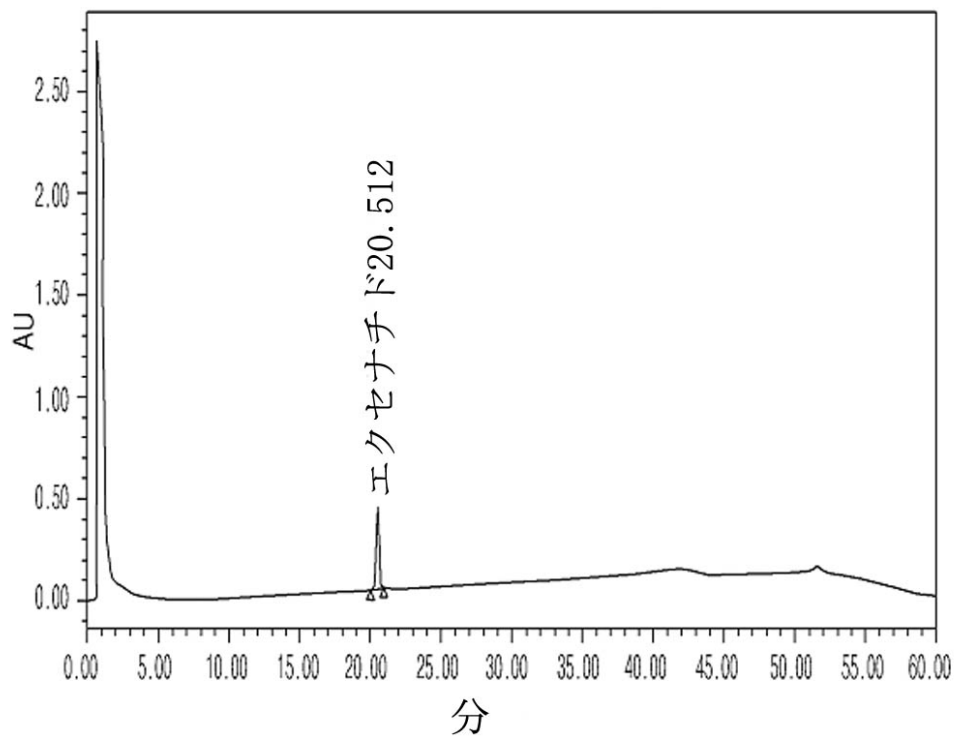
【 図 3 】





【図4】



【図5】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2008/002216
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 9/52(2006.01)i</i>		
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 8 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 practicable, search terms used) eKIPASS, STN (Caplus), Pubmed * Key words : glucose-controlling peptide, exendin, biodegradable polymer, microsphere, poly-L-lactic acid, glycolic acid, surfactant		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KR 10-0805208 B1 (PEPTRON CO., LTD.) 21 February 2008 See the abstract, claims, <162> in page 19 - <193> in page 21, and example 4.	1 - 26
X Y	WO 2005/102293 A1 (AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC. & ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS, INC.) 03 November 2005 See claims, line 27 in page 10 - line 16 in page 11, and exemplifications in pages 25-30.	1 - 5 6 - 26
X Y	WO 2005/110425 A1 (ALKERMES CONTROLLED THERAPEUTICS, INC.) 24 November 2005 See the abstract, claims, line 9 in page 8 - line 27 in page 9, and exemplifications in pages 17-21.	1 - 5 6 - 26
Y	KR 10-2003-0081179 A (PEPTRON CO., LTD.) 17 October 2003 See lines 20 - 26 in page 3, lines 22 in page 4 - line 6 in page 5, and examples.	6 - 26
Y	US 4389330 A (STOLLE RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION) 21 June 1983 See the abstract, column 3, examples 1-2 and claims.	6 - 26
A	WO 2005/009356 A2 (PR PHARMACEUTICALS) 03 February 2005 See the whole document.	1 - 26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "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 "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 14 JULY 2008 (14.07.2008)		Date of mailing of the international search report 14 JULY 2008 (14.07.2008)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, SUN HWA Telephone No. 82-42-481-5606 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2008/002216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-0805208 B1	21.02.2008	NONE	
WO 2005-102293 A1	03.11.2005	AU 2005-235100 A1 BR 200509946 A CA 2560874 A1 EP 1734935 A1 JP 2007-532682 T2 KR 10-2007-0031304 A NO 20065213 A US 2005-271702 A1 US 2006-110423 AA US 2007-0105416 A1	03.11.2005 25.09.2007 03.11.2005 27.12.2006 15.11.2007 19.03.2007 14.11.2006 08.12.2005 25.05.2006 10.05.2007
WO 2005-110425 A1	24.11.2005	AU 2004-319756 AA BR 200418702 A CA 2560981 AA CN 1968700 A EP 1734971 A1 JP 2007-532640 T2 KR 10-2007-0011506 A NO 20065217 A US 2007-166352 AA	24.11.2005 11.09.2007 24.11.2005 23.05.2007 27.12.2006 15.11.2007 24.01.2007 14.11.2006 19.07.2007
KR 10-2003-0081179 A	17.10.2003	NONE	
US 4389330 A	21.06.1983	AT 384557 B AT 399481 A AU 543059 B2 AU 1981-75942 A1 BE 890638 A1 CA 1142810 A1 CH 648494 A DE 3136606 A1 DE 3136606 C2 DK 156374 B DK 156374 C DK 376381 A FR 2491351 A1 FR 2491351 B1 GB 2088314 A1 GB 2088314 B2 HU 184884 B JP 57-093912 A2 JP 63-036290 B4 KR 10-1983-0007069 A KR 8801765 B1 NL 8104507 A NO 152964 C NO 812977 A	10.12.1987 15.05.1987 28.03.1985 22.04.1982 05.04.1982 15.03.1983 29.03.1985 16.06.1982 20.01.1994 14.08.1989 08.01.1990 07.04.1982 09.04.1982 27.01.1984 09.06.1982 18.07.1984 29.10.1984 11.06.1982 19.07.1988 14.10.1983 13.09.1988 03.05.1982 27.12.1985 07.04.1982

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2008/002216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		NZ 198554 A	31.05.1985
		SE 453798 C	16.06.1988
		SE 8105897 A	07.04.1982
		YU 220781 A	30.04.1984
		YU 43774 B	31.12.1989
		ZA 8105441 A	28.07.1982
WO 2005-009356 A2	03.02.2005	AU 2004-259208 A1	03.02.2005
		BR 200412059 A	05.09.2006
		CA 2532302 A1	03.02.2005
		CN 1852687 A	25.10.2006
		EP 1651136 A2	03.05.2006
		JP 2007-524645 T2	30.08.2007
		US 2006-0228414 A1	12.10.2006
		WO 2005-009356 A3	09.06.2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/38 (2006.01)	A 6 1 K 47/38	

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

- (72)発明者 イ, カン イル
大韓民国 キョンギ - ド 445 - 779、ファソン - シ、ピョンジヨム - ドン 847、ウナム
ファーストヴィル アンワドンメウル #207 - 1004
- (72)発明者 パク, ヨン マン
大韓民国 ソウル 151 - 867、カナク - グ、シリムボン - ドン 409 - 335
- (72)発明者 ソン, ミ キュン
大韓民国 キョンギ - ド 446 - 905、ヨンギン - シ、キフン - グ、サンガル - ドン 47 -
1 #203
- (72)発明者 ヤン, ヒ チャン
大韓民国 キョンギ - ド 446 - 905、ヨンギン - シ、キフン - グ、サンガル - ドン 119
#205
- (72)発明者 キム, テ ヒョン
大韓民国 ソウル 150 - 754、ヨンデュンポ - グ、タンサン - ドン 4ガ、タンサンヒュン
ダイ 5チャ アpartment #512 - 1102
- (72)発明者 キム, ユン ジ
大韓民国 ソウル 138 - 042、ソンパ - グ、プンナブ - 2ドン、ソンパヒュンダイ ホーム
タウン #202 - 402
- (72)発明者 キム, ピョン ムン
大韓民国 ソウル 135 - 280、カンナム - グ、テチ - ドン、511、ミドマンション 41
/4 #201 - 804
- (72)発明者 イ, スン ヒ
大韓民国 ソウル 151 - 795、カナク - グ、ポンチョン - 11ドン 179 - 58、ナクソ
ンデ ヒュンダイ アpartment #101 - 306
- (72)発明者 カン, ス ヒュン
大韓民国 キョンギ - ド 446 - 941、ヨンギン - シ、キフン - グ、ポジョン - ドン、101
9 - 294、デリム アpartment #112 - 701
- (72)発明者 ユ, ムヒ
大韓民国 ソウル 135 - 807、カンナム - グ、テポ - 1ドン、ウソン 3チャ アpartment
ント #5 - 801

Fターム(参考) 4C076 AA67 AA94 BB11 CC21 DD09F DD15A DD15F DD47A DD60A DD60E
EE16A EE16F EE23A EE24A EE24B EE32A FF02 FF32 FF36 GG32
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA19 BA44 CA43 MA05 MA16 MA34
MA38 MA55 MA66 NA03 NA12 ZA701 ZA702 ZC351 ZC352