



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월28일

(11) 등록번호 10-1486397

(24) 등록일자 2015년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)  
A61K 38/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7001815(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년09월14일

심사청구일자 2014년02월21일

(85) 번역문제출일자 2014년01월22일

(65) 공개번호 10-2014-0014322

(43) 공개일자 2014년02월05일

(62) 원출원 특허 10-2008-7008065

원출원일자(국제) 2006년09월14일

심사청구일자 2011년09월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/036034

(87) 국제공개번호 WO 2007/033372

국제공개일자 2007년03월22일

(30) 우선권주장

60/717,524 2005년09월14일 미국(US)

60/744,882 2006년04월14일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2002067995 A1

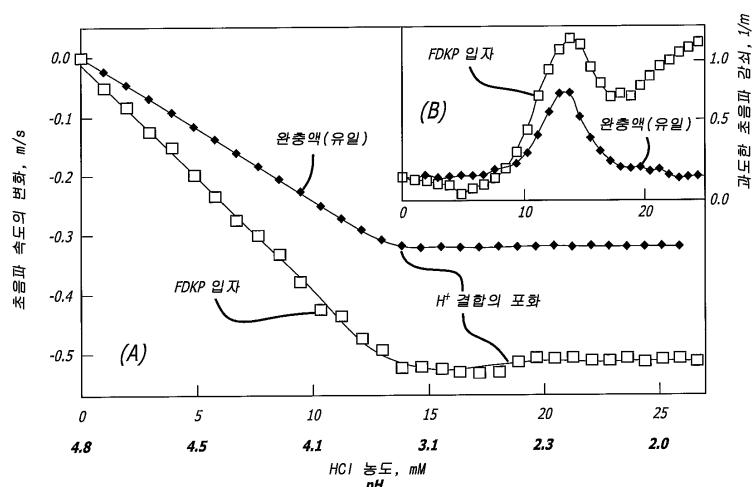
전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 활성제에 대한 결정질 미립자 표면의 친화력의 증가를 기반으로 하는 약물 제제화의 방법

**(57) 요약**

활성제에 의한 미립자 상의 선호될 수 있는 결합을 용이하게 하기 위해 미립자의 표면 성질을 변경시킴으로써 결정질 미립자를 활성제로 코팅하는 방법이 제공된다. 본 개시되는 방법에 의해 변경되는 표면 성질의 유형은 정전기적 성질, 소수성 성질 및 수소 결합 성질을 포함한다.

**대 표 도 - 도1**

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

현탁액 내 사전 형성된 결정질 미립자를 활성제로 코팅하는 방법으로서, 상기 방법은

i) 용매 제거에 관계없이, 미립자의 표면 성질을 개질하여 활성제에 대한 친화력을 증가시키는 것에 의해 활성제와 결정질 미립자 사이의 에너지적 상호작용을 조절하는 단계로서, 미립자의 표면 성질의 개질은 미립자의 표면의 정전기적 성질을 개질하는 것을 포함하는 것인 단계; 및

ii) 미립자의 표면에 활성제를 흡착시키는 단계

를 포함하고,

상기 미립자는 다이캐토피페라진을 포함하고, 상기 활성제는 웨타이드, 폴리웨타이드 또는 단백질인 것인 코팅 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 용매의 제거 또는 교환 단계를 더 포함하는 코팅 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 용매의 제거 또는 교환 단계가 활성제와 미립자 사이의 상호작용에 대해 실질적인 영향이 없는 코팅 방법.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

제1항에 있어서, 미립자의 표면 성질의 개질이 용액 조건의 변경을 포함하는 코팅 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 용액 조건의 변경이 pH를 변화시키는 것을 포함하는 코팅 방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 미립자의 현탁액의 유체 상에 활성제를 용해시키는 단계 및 유체 상의 pH를 변화시키는 후속 단계를 더 포함하는 코팅 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 활성제의 첨가 이전 또는 이후 pH를 변화시키는 코팅 방법.

### 청구항 9

제5항에 있어서, 용액 조건의 변경은 용액의 극성의 변경을 포함하는 코팅 방법.

### 청구항 10

제5항에 있어서, 용액 조건의 변경은 1가 또는 다가 이온의 첨가를 포함하는 코팅 방법.

### 청구항 11

제5항에 있어서, 용액 조건의 변경은 미립자의 화학적 유도체화를 포함하는 코팅 방법.

### 청구항 12

삭제

### 청구항 13

삭제

### 청구항 14

삭제

### 청구항 15

제1항에 있어서, 미립자가 다공성이고, 용액의 벌크 유체에 접근 가능한 내부 표면을 갖는 코팅 방법.

### 청구항 16

제1항에 있어서, 다이캐토피페라진이 푸마릴 다이캐토피페라진인 코팅 방법.

### 청구항 17

제1항에 있어서, 코팅 방법이 미립자 표면상에 활성제의 단일층을 생성하는 코팅 방법.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 단일층이 연속적인 코팅 방법.

### 청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 단일층 내 활성제가 우선 배향(preference orientation)을 갖는 코팅 방법.

### 청구항 20

제1항에 있어서, 활성제가 인슐린 또는 인슐린 유사체인 코팅 방법.

### 청구항 21

i) 용매 제거에 관계없이, 미립자의 표면 성질을 개질하여 인슐린에 대한 친화력을 증가시키는 것에 의해 인슐린과 결정질 미립자 사이의 에너지적 상호작용을 조절하는 단계로서, 미립자의 표면 성질의 개질은 미립자의 표면의 정전기적 성질을 개질하는 것을 포함하는 것인 단계; 및

ii) 미립자의 표면에 인슐린을 흡착시키는 단계

를 포함하는, 혼탁액 내 사전 형성된 결정질 미립자를 인슐린으로 코팅하는 방법으로서, 상기 미립자는 다이캐토피페라진을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 22

제20항에 있어서, 활성제가 인슐린인 코팅 방법.

## 명세서

### 기술분야

#### 관련된 출원의 상호 참조

[0001] 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 내용을 전체로서 참조에 의해 본 명세서에 편입한다.

#### 발명의 분야

[0004] 이 발명은 일반적으로 약물 제제의 분야에 속하고, 특히 결정질 미립자의 표면에 활성제를 코팅하는 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

[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 괴막형성 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 형성되어야 하고, 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 약물 제제는 다수의 투여 경로로 이용될 수 있지만, 폐 전달에 특히 적합하다. 전신 효과를 갖는 제제의 전달을 위한 폐의 장점은 대량의 표면적 및 점막 표면에 의한 흡수(uptake)의 용이성을 포함한다. 본 명세서에 참고로 인용되는 미국특허 제6,071,497호에는 다이케토피페라진 미립자 및 중합체계 미립자의 형성을 기초로 하는 폐 약물 전달 시스템이 기재되어 있다.

## 발명의 내용

### 발명의 개요

[0009] 결정질 미립자 상에 활성제의 코팅을 형성하는 방법이 제공된다. 일반적으로, 활성제가 용액 내에 잔존하는 것 보다 미립자 표면에 대해 더 큰 친화력을 갖도록 미립자의 표면 성질을 개질함으로써 미립자를 활성제로 코팅한다.

[0010] 본 발명은 정전기적으로, 소수적으로, 또는 수소결합 구동 결합을 이용하여 결정질 입자, 예컨대, 푸마릴 다이케토피페라진(FDKP) 미립자를 활성제, 예컨대, 단백질로 코팅하기 위한 개선된 방법을 제공하는 것이다. 본 발명에서, 액체는 선택적으로 (활성제 코팅된 미립자의 회수를 위해) 여과 또는 건조에 의해 제거될 수 있고, 또는 상이한 용액 매질로 교환될 수 있다. 임의의 경우, 액체 매질의 제거는 활성제-미립자 복합체의 형성에서 필수적인 단계는 아니다. 본 발명은 미립자에 대한 활성제의 흡착을 달성하기 위해 결정질 미립자의 표면 성질을 변화시키는 것을 기반으로 하는 미립자 코팅 방법을 개시한다.

[0011] 본 발명의 특정한 구체예에서, i) 용매 제거에 관계없이 활성제와 결정질 미립자 사이의 에너지적 상호작용을 조절하는 단계; 및 ii) 미립자의 표면에 활성제를 흡착시키는 단계를 포함하는, 혼탁액 내 사전 형성된 결정질 미립자를 활성제로 코팅하는 방법이 제공된다. 몇몇의 구체예에서, 혼탁액 내 사전 형성된 결정질 미립자를 활성제로 코팅하는 방법은 활성제와 미립자 사이의 상호작용에 대해 실질적인 영향 없이 용매를 제거 또는 교환하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 특정한 구체예에서, 미립자를 활성제로 코팅하는 방법은 미립자의 표면 성질을 개질함으로써 달성된다. 미립자의 표면 성질의 개질은 용액 조건을 변경함으로써 달성된다. 이 조건은 비제한적인 방식으로 pH를 변화시키는 것을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 미립자의 표면 성질은 1) 용액의 극성의 변경; 2) 1 가 또는 다가 이온의 첨가; 및 3) 미립자의 화학적 유도체화에 의해 개질된다.

[0013] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 미립자의 혼탁액의 유체 상에 활성제를 용해시키는 단계 및 유체 상의 pH를 변화시키는 후속 단계를 더 포함한다. 이러한 유체 상에서의 활성제의 용해 단계는 고체의 용해를 의미한다. 또한, 이러한 활성제의 용해 단계는 고체의 첨가 외에도 더 농축된 용액의 활성제의 첨가를 의미한다.

[0014] 또 다른 구체예에서, 활성제의 첨가 이전 또는 이후 활성제와 미립자 사이의 상호작용을 돋기 위해 미립자 혼탁액의 pH 조건이 변경된다.

[0015] 다른 구체예에서, 활성제는 미립자 표면과 1 초과의 유형의 에너지적으로 선호되는(energetically favorable) 상호작용을 갖는다.

- [0016] 본 발명의 다른 특별한 구체예에서, 활성제는 인슐린 또는 이의 유사체이다.
- [0017] 본 발명의 다른 특정한 구체예에서, 활성제와 미립자 사이의 선호되는 상호작용을 생성하는 표면 성질은 정전기적 성질, 소수성 성질 및 수소 결합 성질로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0018] 본 발명의 다른 구체예에서, 미립자는 다공성이 있고, 용액의 벌크 유체에 접근 가능한 내부 표면을 가진다. 한 구체예에서, 미립자는 푸마릴 다이케토피페라진과 같은 다이케토피페라진을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0019] 본 발명의 구체예에서, 코팅 방법은 미립자 표면상에 활성제의 단일층을 생성한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 단일층은 연속적이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 단일층의 활성제는 우선 배향(preference orientation)을 가질 수 있다.
- [0020] 또 다른 구체예에서, 용매 제거에 관계없이 활성제와 결정질 미립자 사이의 에너지적 상호작용을 조절하는 단계; 및 미립자의 표면상에 인슐린을 흡착시키는 단계를 포함하는, 혼탁액 내 사전 형성된 결정질 미립자를 인슐린으로 코팅하는 방법이 제공된다.
- [0021] 본 명세서에서 이용되는 것으로서, 용매는 활성제와 미립자가 적셔져 있는(bathed) 유체 매질을 의미한다. 모든 성분이 용액에 존재하는 것이 요구되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 실제로 많은 경우에서 이는 미립자가 혼탁되어 있는 액체 매질을 지칭하기 위해 이용될 수 있다.

### 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.
- 도 1은 본 발명의 교시에 따른 푸마릴 다이케토피페라진(FDKP) 혼탁액, FDKP 입자 및 완충액의 개별 성분에 대한 초음파 HCl 적정 프로파일을 도시한다. 초음파 속도 적정 프로파일의 변화의 크기(도 1; 패널 A)는 시료 성분의 이온화 가능한 카복실레이트 기의 양성자화에 의해 일어나는 수화 변화를 반영한다. 과도한 초음파 감쇠(도 1; 패널 B)는 포화의 지점에서 양성자 교환 반응에서의 빠른 경감(relaxation)에 의한 결과이다. 주파수(F)는 15 MHz이고, 온도는 25°C이다.
- 도 2는 본 발명의 교시에 따른 FDKP 입자 + 인슐린 및 FDKP 입자 유일에 대한 초음파 빙초산 적정 프로파일을 도시한다. 초음파 속도 프로파일은 인슐린 기여도를 공제함으로써 계산하였고, 주파수는 8 MHz이고, 온도는 25°C이다. 첨가된 빙초산의 농도의 함수로서의 과량의 초음파 감쇠도 또한 도시한다. 산화를 유도하는 빙초산의 2개 단계는 HCl 적정에 의해 관찰되는 것과 유사하다. 왼쪽의 삽입(insert) 패널(패널 A)은 약 2.9 초파의 pH에서 FDKP 미립자와 활성제의 결합을 도시한다. 오른쪽의 삽입 패널(패널 B)은 약 2.9 미만의 pH에서 활성제와 미립자 사이의 감소된 상호작용을 도시한다. 도 3은 본 발명의 교시에 따른 이온화 가능한 미립자에의 단백질 흡착을 도시한다. pH 조절 후 단백질을 미립자 혼탁액에 첨가하였고, 비결합 단백질을 여과하여 제거하였고, 미립자를 용해시켜 결합 단백질을 방출하였다.

도 4는 본 발명의 교시에 따른, FDKP 미립자에의 활성제의 흡착에 대한 pH 의존도를 도시한다. 도 4A는 인슐린 흡착을 도시하고, 도 4B는 항-SSX-2<sub>41-49</sub> 단일클론 항체 흡착을 도시하고, 도 4C는 부갑상선 호르몬(PTH) 흡착을 도시하고, 도 4D는 그렐린 흡착을 도시한다.

도 5는 본 발명의 교시에 따른, 인슐린 농도를 제한하면서, FDKP 미립자에의 인슐린 흡착의 pH 의존도를 도시한다.

도 6은 본 발명의 교시에 따른, 단백질(10 mg/mL)로 FDKP 미립자를 단계식 적정할 시 FDKP 미립자 혼탁액(11 mg/mL)의 초음파 속도의 변화를 도시한다. 자유 단백질의 기여도 및 FDKP 미립자 희석액의 영향을 공제하였다. 온도는 25°C이다.

도 7은 본 발명의 교시에 따른, FDKP 미립자에의 활성제의 흡착에 대한 포화 곡선을 도시한다. 활성제/FDKP 미립자의 경우 로딩 곡선은 pH 5.0에서 활성제 농도의 함수로서 도시된다. 도 7A는 글루카곤 유사 웨타이드 1(GLP-1) 흡착을 도시하고, 도 7B는 PTH 흡착을 도시하고, 도 7C는 항-SSX2<sub>41-49</sub> 단일클론 항체 흡착을 도시하고, 도 7D는 항-MOPC-21 단일클론 항체 흡착을 도시한다.

도 8은 본 발명의 교시에 따른, 염의 농도의 증가에 따른 pH 5.0에서의 미립자에의 활성제의 흡착을 도시한다.

pH 조절 후 활성체를 미립자 혼탁액에 참가하였고, 비결합 활성체를 여과하여 제거하였고, 미립자를 용해하여 결합된 활성체를 방출하였다. 도 8A는 인슐린 흡착을 도시하고, 도 8B는 항-SSX-2<sub>41-49</sub> 단일클론 항체 흡착을 도시하고, 도 8C는 PTH 흡착을 도시하고, 도 8D는 그렐린 흡착을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 본 발명의 자세한 설명

##### 전달되는 제제

본 명세서에서는 결정질 미립자에 코팅되는 물질을 활성제로서 지칭한다. 활성제의 종류의 예는 치료, 예방 및/ 또는 진단 효용을 갖는 약학 조성물, 합성 화합물 및 유기 거대분자를 포함한다.

일반적으로, 임의의 형태의 활성제를 결정질 미립자의 표면에 코팅할 수 있다. 이 재료는 핵산, 합성 유기 화합물, 폴리펩타이드, 웨타이드, 단백질, 폴리사카라이드 및 다른 당, 및 지질을 포함하는 유기 거대분자일 수 있다. 웨타이드, 단백질 및 폴리펩타이드는 웨타이드 결합에 의해 연결되는 모든 쇄의 아미노산이다. 웨타이드는 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 웨타이드, 단백질 또는 다수의 웨타이드 결합을 함유하는 임의의 길이의 아미노산의 임의의 다른 쇄(일반적으로 10개 이상의 아미노산을 함유)를 의미할 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. 더 특히, 활성제는 인슐린 및 이의 유사체, 성장호르몬, 부갑상선 호르몬(PTH), 그렐린, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 글루카곤 유사 웨타이드 1(GLP-1), 텍사스 레드, 알킨, 사이클로스포린, 클로피오탈렐 및 PPACK(D-페닐알라닐-L-프롤릴-L-아르기닌 클로로메틸케톤), 항체 및 이의 단편(인간화 또는 키메라 항체; F(ab), F(ab)<sub>2</sub>, 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 포함할 수 있다. 종양 항원에 대한 항체의 비제한적인 예는 항-SSX-2<sub>41-49</sub>(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)을 포함한다.

##### 전달 시스템 - 결정질 미립자

본질적으로, 용어 "미립자"는 정확한 외부 또는 내부 구조와 관계없이 약 0.5-1000  $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 입자를 의미한다. 미립자의 넓은 카테고리 내에서, "미소구체"는 균일한 구 형상을 갖는 미립자를 의미한다. 본 명세서에서 이용되는 것으로서 결정질 미립자는 결정의 내부 구조(외부 형태는 필요한 것이 아님)를 가지고, 공간 격자 내 원자의 규칙적인 배열을 갖는 미립자를 의미한다. 이온화 가능한 결정질 표면은 전기 전하를 운반하는 추가 능력을 갖는 결정질 미립자를 의미한다.

바람직하게는, 결정질 미립자를 구성하는 화학 물질은 전달되는 활성제와 가역적으로 반응하고, 무독성이고, 설치류 및 인간에 의해 비대사성이다. 또한, 바람직한 미립자의 결정질 구조는 활성제와의 코팅 공정에서 실질적으로 파괴되지 않는다. 결정질 미립자의 조성은 미립자 표면에 대한 활성제의 흡착을 유도하기 위해 어떠한 유형의 화학적 상호작용이 조작될 수 있는지를 결정한다.

다수의 물질을 이용하여 결정질 미립자를 형성할 수 있다. 그러한 미립자는 외부 표면을 가지고, 이의 성질은 코팅 공정에서 조작될 수 있다. 결정질 미립자를 형성할 수 있는 대표적인 재료는 방향족 아미노산, 또는 다이 케토페라진 및 모폴린 셀페이트와 같은, 한정된 pH 범위에서 제한된 용해도를 갖는 화합물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

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 다이케토페라진 유도체, 예컨대, 3,6-비스[N-푸마릴-N-(n-부틸)아미노](푸마릴 다이케토페라진 또는 FDKP로서도 지칭됨; 또한 (E)-3,6-비스[4-(N-카복시-2-프로페닐)아미도부틸]-2,5-다이케토페라진으로 불림)로부터 다이케토페라진(DKP)의 형성을 기반으로 하는 약물 전달 시스템을 기술한다. 상기 특허에서 기술되어 있는 바와 같이, 전달되는 약물은 약물(페이로드)의 존재 하에서 DKP 미립자를 형성함으로써 다이케토페라진 입자와 조합되거나 또는 로딩된다. 다이케토페라진 구조적 요소, 또

는 이의 치환 유도체(다이케토모폴린 및 다이케토다이옥산을 포함하나, 이에 한정되지는 않음) 중 하나를 기반으로 하는 시스템은 바람직한 크기 분포 및 pH 범위뿐 아니라 양호한 폐이로드 내구력을 갖는 미립자를 형성한다. 광범위한 안정하고, 재현성 있는 특성은 치환기의 적절한 조작에 의해 발생할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 고려될 수 있는 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 포함할 수 있다. 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, 다이케토피페라진의 약물 염을 형성하기 위해 제제의 염기 형과 다이케토피페라진을 혼합할 수 있고, 그 결과 약물은 다이케토피페라진의 반대 양이온(counter cation)이 된다.

[0033] 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입되는 미국특허 제6,444,226호 및 제6,652,885호는 활성제의 용액이 첨가된 수성 혼탁액 중 DKP 미립자의 제조 및 제공 단계, 및 혼탁액을 동결 건조하여 활성제로 코팅된 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.

#### 결정질 미립자의 제어된 코팅

[0035] 제어된 코팅은 결정질 미립자의 표면상에 활성제를 흡착하는 관련 공정을 의미한다. 코팅 공정은 용액 조건(예컨대, pH, 온도, 극성, 이온 세기 및 조용매)의 변화, 1가 또는 다가 이온으로의 치환화합물화, 또는 화학적 유도체화에 의한 유체 혼탁액 내 결정질 미립자의 표면 성질을 변화시키는 것을 포함한다. 활성제의 첨가 이전 또는 이후 미립자의 표면 성질을 변경하는 것은 활성제와의 이의 화학적 상호작용에 영향을 미치고, 이는 결정질 미립자에 대한 활성제의 흡착을 일으킨다. 미립자와 활성제 사이의 화학적 상호작용은 흡착을 유도하고, 미립자의 표면상에 활성제의 단일층을 생성한다. 활성제의 분자가 흡착되면, 미립자 표면의 그 부분은 그 특정한 표면 지점에서 추가 활성제의 흡착 및 추가 상호작용에 노출되지 않는다. 얻어지는 단일층은 연속적(접근 가능한 표면 위 흡착된 활성제 분자들 사이의 갭이 없음)일 수 있거나 또는 비연속적(흡착된 활성제 분자들 사이에 노출된 미립자 표면의 갭)일 수 있다.

#### 미립자에의 활성제의 흡착

[0037] 상기 논의한 바와 같이, 미립자에의 활성제의 흡착은 미립자에의 활성제의 단일 적층(코팅)을 일으킨다. 그러나, 인슐린과 같은 활성제의 예컨대, 미립자에 대한 흡착에서의 역할에서 1 이상의 메커니즘이 존재한다.

[0038] 미립자를 코팅하는 인슐린과 같은 활성제의 단일층은, 미립자 상에 인슐린을 로딩하는 공정의 단계 중 하나이지만, 시스템의 에너지학에 기초하여 단량체 및 다량체 층 모두가 형성될 수 있기 때문에 필요적으로 상기 로딩 공정에서의 최종 결과는 아니다.

[0039] 낮은 인슐린 농도 및/또는 낮은 pH(실질적으로 pH 5.0 미만)와 같은 관용적인 용해도 조건 하에서, 인슐린과 FDKP 입자 표면 사이의 인력은 인슐린에 대한 자가 회합력보다 훨씬 더 크다. 따라서 미립자에의 인슐린의 코팅이 단일층 방식으로 발생하고, 미립자 표면에 응집 또는 다중적층 없이 포화가 관찰된다(실시예 6 참조). 용해도가 포화에 접근함에 따라, 인슐린 고농도 및/또는 5.0에 근접하는 pH(야생형 인슐린에 대한 용해도 최소값)에 의해, 인슐린 자가 회합이 에너지적으로 더 선호되게 된다. 따라서 코팅이 포화된 단일층의 지점을 지나쳐 진행될 수 있고, 인슐린의 추가 층이 입자에 첨가될 수 있다. 자가 회합의 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 결정되지 않은 화학량론을 특징으로 한다. 일반적으로 말해, 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 미립자에 활성제를 적층시킬 수 있다. 본 발

명자의 현재 이해에 따르면, 본 개시의 실시예에서 이용되는 일반적인 조건(예컨대, 아세트산 내 인슐린의 용해) 하에서, 인슐린의 추가 층의 침착은 비-6량체 인슐린의 응집으로서 진행된다.

#### [0040] 미립자의 코팅 방법

결정질 미립자, 예컨대, 사전형성된 결정질 미립자를 활성제로 코팅하는 과정은 일반적으로 다음과 같이 기술된다: 침전, 또는 다른 방법에 의해 사전에 형성된 결정질 미립자를 액체 매질, 예컨대, 물에 혼탁시키는 단계; 및 활성제의 첨가 이전 또는 이후 매질을 조절하여 입자 표면을 변경시키는 단계. 이 시점에서 활성제를 미립자 표면에 흡착시킬 것이고, 일정 시간(예를 들어, <1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10분; 바람직하게는 <1 내지 5분 이상) 간격 후 로딩 공정이 종료될 것이다. 액체 매질은 여과, 원심분리, 동결건조 또는 분무 건조를 포함하는 임의의 수단에 의해 제거될 수 있거나, 또는 매질 교환에 의해 교체될 수 있다. 2개의 실험적 접근법, 즉, 1) 여과물 또는 상청액 내 상당한 양의 활성제의 부재를 증명하거나, 그리고/또는 2) 미립자의 부존재를 동일한 절차를 통해 달성하는 경우 활성제가 침전되지 않음을 보이면서 고체 상 내 활성제의 존재를 증명함으로써 흡착을 확인할 수 있다.

#### [0042] 미립자 표면 성질의 조작

본 명세서에서 개시하는 바와 같이, 미립자의 표면 성질은 다양한 수단으로 조작될 수 있다. 조작될 수 있는 미립자 표면 성질은 정전기적, 소수성, 및 수소 결합 성질을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 다양한 구체예에서, 이 조작은 활성제의 부존재 또는 존재 하에서, 또는 미립자와 활성제가 서로 혼합되기 이전 또는 이후에 수행된다. 예를 들어, 용액 조건을 변경시킴으로써 조작이 활성제의 존재 하에서 일어나는 경우, 활성제에 대해, 표면에 대한 이의 친화력을 개질하는 효과가 있을 수도 있다. 따라서, 본 발명의 몇몇의 구체예에서, 미립자의 코팅은 표면 성질의 조작 및 활성제의 성질의 개질을 포함할 수 있다. 후자에 관한 방법은 본 출원과 동일한 날짜에 출원되어 동시 계류중인 미국특허출원 제\_\_\_\_/\_\_\_\_호(Attorney Docket No. 51300-00035)(발명의 명칭: 결정질 미립자 표면에 대한 활성제의 친화력을 증가시키는 것을 기초로 하는 약물 제제의 방법{METHOD OF DRUG FORMULATION BASED ON INCREASING THE AFFINITY OF ACTIVE AGENTS FOR CRYSTALLINE MICROPARTICLE SURFACE S})에 개시되어 있고, 이 특허는 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 편입된다.

정전기적 상호작용은 전하가 서로 가까워질수록 더 강해지는, 반대 전하 사이의 인력 또는 유사 전하 사이의 척력이다. 정전기적 상호작용은 이온 용액 내 대전체들 사이의 상호작용을 이해함에 있어서 중요한 성분을 구성한다. 예를 들어, 용매에 분산되는 콜로이드 입자의 안정성은 척력의 정전기적 상호작용과 인력의 반테르 발스 상호작용의 경쟁을 고려하여 설명될 수 있다. 또한 미립자 표면의 화학적 작용기(예를 들어, COOH, NH 등이나, 이에 한정되지는 않음)는 이온화된 활성제에 대한 반대 이온으로서 이용될 수 있어 활성제/입자 복합체가 염을 포함하게 된다. 또한 입자들 사이의 상호작용 및 응착을 고려하는 경우 정전기적 상호작용은 매우 중요하다.

주위 용액 시스템의 pH 변화는 혼탁액 내 이온화 가능한 결정질 미립자의 정전기적 성질을 변화시킬 수 있다. 실시예 3에서 증명되는 것으로서, 용액의 pH 변화는 미립자의 이온화를 변화시켜 활성제가 미립자 표면에 흡착되게 한다. 특히, 실시예 4는 FDKP(3,6-비스[N-푸마릴-N-(n-부틸)아미노]2,5-다이케토페라진)으로 구성되는 미립자가 이온화 가능함을 보여준다. 미립자는 pH 3.5 미만에서는 수불용성이지만, pH 3.5 내지 5.0에서는 용해도가 급격하게 증가하는 데, 이는 카복실기의 이온화에 기인하는 것으로 생각된다. 더 높은 pH에서 용해를 완료하기 이전 FDKP 미립자는 pH 5에서 부분적으로 이온화되고, 이는 초음파 분광학을 통해 간접적으로 관찰될 수 있다. 실시예 5는 FDKP 미립자 표면에의 단백질의 제어된 코팅을 증명한다. 하나의 구체예에서, 다이케토페라진 미립자를 산성 용액에 혼탁시키고, 활성제를 혼탁액에 첨가하고, 활성제와 미립자를 서로 혼합한 후 용액의 pH를 증가시킨다. 증가된 pH는 미립자의 표면 성질을 변경하여 활성제가 용매보다 미립자에 대해 더 큰 친화력을 가지는 환경을 생성한다.

대안적으로, 용액에 활성제를 첨가하기 이전 즉시 미립자 혼탁액의 pH를 증가시킬 수 있다. 미립자의 표면 전하 성질은 pH의 변화에 의해 변경되고, 그 결과 활성제는 용액 내에 잔존하는 것보다 미립자에 대해 더 큰 친화력을 가지게 되고, 첨가시 미립자 표면에 흡착된다.

실시예 6 및 7은 pH 조건의 조작에 의한 FDKP 입자에의 인슐린의 로딩을 증명한다. 최종적으로, 단백질 흡착에 의한 미립자의 포화 및 단일층의 형성이 실시예 6에서 기술된다.

#### [0048] 미립자의 표면을 조작하는 다른 방법

정전기적 성질 외에도, 미립자 표면의 다른 성질을 이용하여 활성제의 흡착을 제어할 수 있다. 복합 구조 내에 존재할 수 있는, 이미다졸, 피리딘, 쉬프(Schiff) 염기, 케톤, 카복실산 생물학적 동족체(bioisostere), 아마이

드 또는 다른 작용기를 갖는 화합물을 함유하는 미립자를 조작하여 표면 성질을 개질할 수 있다.

[0050] 소수성 상호작용은 물에서의 이의 불용성 때문에 수성 용액에서 비극성 기가 서로 결합하는 것이다. 소수성 상호작용은 (단일 문자, 2 또는 3개의 문자의 복합체 또는 더 큰 조립체의) 구조 안정화 및 동력학을 포함하는 다수의 문자 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.

[0051] 소수성 상호작용은 히스타민으로 구성되는 결정질 미립자의 양성자화(protonation)를 변화시킴으로써 조작될 수 있다. 히스타민의 양성자화는 결정질 미립자의 친핵성(nucleophilicity)을 감소시키고, 양전하를 부여한다.

[0052] 수소 결합 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 보통 F, O 또는 N 원자)을 갖는 이웃의 전기음석적 분자 또는 이온과의 인력을 경험할 수 있다. 수소 결합은 물의 특유의 성질을 책임지고, 생물 분자의 조직에서, 특히 단백질 및 DNA의 구조에 영향을 미침에 있어서 매우 중요하다.

[0053] 본 발명에서, 미립자 표면의 수소 결합 성질은 화학적 유도체화에 의해 제어될 수 있다. 수소 결합 공여체/받개를 첨가하여 미립자 표면을 화학적으로 변경할 수 있다. 예를 들어, N-H 결합 내 수소는 C=O 결합 내 산소와 수소 결합을 경험할 수 있다. N-H가 N-CH<sub>3</sub>로 치환되는 경우, 이 특정한 수소 결합 상호작용이 제거된다. 유사하게, C=O 기를 C=C 기로 치환하는 것도 이 특정한 결합 상호작용을 제거한다.

[0054] 이온화 가능한 방향족 기를 함유하는 표면을 갖는 미립자는 이온화된 상태에서는 극성이지만, 비이온화 상태에서는 소수성이다. 양성자화된 표면으로부터 시작하여, 입자 표면 이온화를 감소시키도록 용액 조건을 조작하는 것은 소수성 또는 방향족 활성제가 미립자 표면을 코팅하게 한다.

[0055] 케톤 표면 기를 갖는 미립자는 용액 극성을 변화시킴으로써 조작될 수 있다. 용매 극성을 감소시킴으로써(저 극성 유기 용매를 수성 용액에 첨가), 입자 표면에서 주성분 종으로서 에놀 형이 제조된다. 이 에놀 형은 수소 결합 공여체수용체만, 케토 형은 수소 결합 수용체이다. 질소 함유 약물의 미립자 표면에의 흡착은 이 방식으로 촉진된다.

[0056] pH- 또는 온도-유발 이성질체화를 수행하는 표면 기를 갖는 미립자가 용액 조건의 조작에 의해 약물 분자를 흡착하도록 유발될 수 있다. 이 표면의 경우, 이성질체화에 의한 선형 표면 기 내 비틀림의 유발은 미립자 표면에서 기의 이동성(유동성)을 증가시킨다. 이는 질서있는 표면과 접촉할 수 있는 것보다 표면이 활성제와 더 많은 접촉을 형성할 수 있게 한다. 활성제와의 추가적인 상호작용이 각각 선호되는 경우, 순 상호작용 에너지가 선호되게 되고, 약물이 미립자 표면에 흡착한다.

### 유체 매질 제거 기술

[0058] 활성제로 결정질 표면의 제어된 코팅 후, 용매의 제거는 침전, 여과 또는 건조(이에 한정되지는 않음)를 포함하는 방법에 의해 달성될 수 있다. 건조 기술은 결 건조 및 분무 건조를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 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 출원되고, 다이케토피페라진 미립자의 분무 건조에 관한 모든 내용을 본 명세서에 참조에 의해 편입하는, 미국 특허 출원 제60/776,605호에 개시되어 있다.

### 표면 성질 개질의 분석

[0060] 본 발명은 초음파 분광법의 기술을 사용하여 유체 혼탁액 내 결정질 미립자의 표면 성질의 변화(결정질 미립자에 대한 활성제의 흡착을 촉진시키거나 또는 향성시킴)를 분석한다. 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 이러한 변화는 활성제의 첨가 이전 또는 이후 미립자의 표면 성질을 변경하기 위해 1가 또는 다가 이온으로의 착화합물화, 또는 화학적 유도체화에 의한 용액 조건(예컨대, pH, 온도, 극성, 이온 세기 및 조용매)의 변화를 포함한다.

[0061] 초음파 분광법은 통상의 기술자에게 공지되어 있는 분석적 도구이다. 간단히 말해서, 초음파 분광법은 음파를 사용한다. 특히, 시료/재료 내 문자간 힘을 조사하는 고주파 음파를 이용한다. 초음파의 진동식(Oscillating) 압축(및 감압)은 문자간 인력 또는 척력에 의해 응답하는 시료 내 문자 배열의 진동을 일으킨다.

[0062] 시료를 통과하면서, 초음파는 이의 에너지를 손실하고(진폭의 감소), 이의 속도를 변화시킨다. 진폭의 감소 및

속도의 변화는 시료의 특성으로서 분석된다. 따라서, 초음파의 전파는 초음파 속도 및 감쇠에 의해 결정된다.

[0063] 초음파 속도는 매질의 탄성 및 밀도에 의해 결정된다. 고체는 가장 강한 분자들 사이의 상호작용을 가지고, 그 다음 액체 및 기체의 순서이고, 따라서 액체와 기체와 비교할 때 더 견고하다. 초음파 감쇠는 시료를 통과할 때 초음파 파가 손실하는 에너지의 측정이다. 이는 시료의 초음파 투명도를 특징으로 하고, 파의 진폭의 감소로서 알 수 있다.

[0064] 균질한 시스템에서 초음파 감쇠의 다중 주파수 측정은 양성자 교환, 구조적 전이(예를 들어, 이성질체화), 자가 결합(예를 들어, 이량체화), 응집, 거대분자에 대한 리간드의 결합 등(이에 제한되지는 않음)과 같은 빠른 화학 반응의 분석을 가능케 한다.

#### [실시예]

[0066] 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. 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 이해하여야 한다.

#### [0067] 실시예 1

##### 활성제를 이용하여 미립자를 로딩하는 일반적 절차

[0069] 이하 표 1은 pH-제어 흡착을 이용하는 이온화 가능한 결정질 미립자(FDKP 미립자)의 정전기적으로 유도된 코팅의 예이다. 이 실험에서는, FDKP 미립자 혼탁액을 pH 2.0 및 4.5에서 제조하였다. 단백질(성장 호르몬)을 각각에 첨가하여 FDKP 입자 5 mg/mL 및 단백질 200  $\mu$ g/mL의 최종 조건을 제공하였다. 혼합 후, 혼탁액으로부터 벌크 액체를 여과하여 제거하였다. 여과기 상에 포집된 재료를 용해하고 수집하였다. 모든 단편 내 단백질 농도는 HPLC로 정량하였다.

[0070] 낮은 pH(2.0)에서, 단백질은 입자에 흡착하지 않았고, 모든 단백질이 최초 여과물에서 발견되었다. pH를 4.5까지 증가시킴으로써, 입자의 표면 성질이 단백질에 대해 높은 친화력을 갖도록 변경되었다. 이 조건 하에서, 단백질이 미립자에 결합되었고, 여과물에서 발견되지 않았다. 미립자와 결합된 단백질의 양을 결정하기 위해, 미립자가 용해되었을 때 단백질을 회수하였다. 입자를 함유하지 않은 대조군에서는 사용한 조건 하에서 단백질이 단독으로 여과기 상에 남아있지 않았는데, 이는 단백질이 자가 회합하지 않았거나, 또는 그렇지 않으면 여과기 기공보다 더 큰 입자로 응집되지 않았음을 나타내는 것이다.

#### 표 1

FDKP 미립자를 이용하는 흡착 실험에서의 단백질 농도

분획	pH 2.0 입자 존재	pH 2.0 입자 비존재	pH 4.5 입자 존재	pH 4.5 입자 비존재
초기 농도 ( $\mu$ g/mL)	200	200	200	200
여과물 (비결합 단백질)	146	181	0	145
용해된 입자	0	0	180	0

[0072] 표시된 수치는 여과 후 용액의 HPLC 정량화로부터의 결과이다.

#### [0073] 실시예 2

##### pH의 조작에 의한 FDKP 미립자 이온화의 제어

[0075] FDKP는 카복실산이 양성자화되고, 전하를 띠지 않는 경우, pH 3.5 미만에서 본질적으로 수불용성인 카복실산 작용기를 각 말단에 갖는 로드-형상 분자이다. FDKP의 용해도는 카복실기의 이온화에 해당하는 pH 3.5 초과에서 급속하게 증가한다. 2개의 넓고 편평한 면 및 좁은 모서리를 갖는 플레이트로서 형성하는 FDKP 결정의 모델링은 로드형 FDKP 분자가 플레이트의 모서리에 수직 배열되어 분자의 카복실산 말단이 플레이트의 넓은 면 상에 배열되었음을 나타낸다. 이론적인 기준에서, FDKP 결정의 표면은 미립자의 혼탁액 10 mg/mL가 용해할 pH 바로 아래,

pH 5.0(용해도가 약 1 mg/mL임) 주위에서 부분적으로 이온화하여야 한다.

[0076] FDKP 결정 표면의 이온화를 초음파 분광법을 이용하여 간접적으로 관찰하였다. 도 1에서, FDKP 미립자 및 완충액의 초음파 적정 곡선을 도시한다. 이 실험에서, 200 mM HCl 함유 용액을 소 분취량으로 20 mM 암모늄 아세테이트 완충액 내 FDKP 미립자의 교반된 혼탁액 10 mg/mL에 첨가하였다. 초기 pH는 4.8이었다. 각각의 HCl 첨가 후, 시스템이 평형이 되게 하였고, 초음파 데이터를 수집하였다.

[0077] 산 농도가 증가하면서(pH는 감소함) 관찰되는 초음파 속도의 감소는 시스템 내 카복실산의 양성자화를 반영한다. 카복실산 기가 양성자화 되었고, 비전하 됨에 따라, 이 주위의 물 구조가 완화되고, 초음파가 더 느리게 전파되었다(초음파 속도가 감소한다). FDKP 미립자 카복실레이트 표면과 아세테이트 완충액 내 카복실레이트 기가 화학적으로 매우 유사하기 때문에, 곡선도 유사하였다. 그러나, 이 차이는 FDKP 미립자에 의해 일어났다. 먼저, FDKP 미립자를 이용하는 속도 변화의 크기가 더 커졌다. 이 차이는 FDKP 미립자 표면상의 이온화 카복실레이트 기의 양성자화로부터 기인한다. 양성자화의 완료 지점 근처에서 발생하는 감쇠 곡선의 피크는 FDKP 혼탁액의 미세하게 더 높은 산 농도까지 이동하였다. 마지막으로, pH가 3.5에서 2.3까지 감소함에 FDKP 변수 모두의 변화가 계속되었다. 이 변화는 표면 카복실기의 차수 또는 다른 미세구조 개질을 포함할 수 있는 입자의 표면 성질의 추가적 개질을 반영한다.

### 실시예 3

#### 표면 성질의 pH 조작에 의한 FDKP 미립자에의 단백질의 흡착

[0079] pH 조작에 의한 이온화 가능한 미립자 표면에의 단백질의 흡착은 2 가지 방식으로 달성될 수 있다. 단백질을 첨가할 수 있고, 그 후 pH를 조절하여 단백질의 흡착이 동시에 일어나면서 표면의 이온화를 일으킬 수 있다. 이 방법은 가역적이다. 대안적으로 단백질을 첨가하기 전에 입자 혼탁액의 pH를 조절하여 표면의 이온화를 일으킬 수 있다.

[0080] 도 2에 나타난 초음파 적정 데이터는 약 2.9 초파의 pH에서 FDKP 미립자와 단백질(인슐린)의 결합 및 약 2.9 미만의 pH에서 감소된 상호작용을 나타낸다.

[0081] FDKP 미립자의 혼탁액을 20 mM 암모늄 아세테이트 완충액(pH 4.8)에서 제조하였고, 인슐린 스톡(stock) 용액과 조합하여 FDKP 미립자 10 mg/mL의 최종 농도 및 인슐린 농도 1 mg/mL를 갖는 혼탁액 800  $\mu$ L를 얻었다. 이 혼탁액을 초음파 분광기에 도입하였다. 온화하게 교반하면서, 빙초산을 5  $\mu$ L 분취량에 단계식 첨가하여 pH를 낮추었다. 적정 동안 각 단계에서 초음파 데이터를 수집하였다.

[0082] 초음파 속도의 변화는 시료 내 입자 및/또는 거대분자의 표면적의 양(수화수)과 관련이 있다(비례함). 도 2는 약 2.9의 pH 초파에서(10 부피%의 첨가된 아세트산), 미립자 유일(FDKP 입자) 및 인슐린과 미립자(FDKP 입자 + 인슐린)에 대한 속도 곡선이 일치하였음을 설명한다. 이는 시스템 내 표면적의 양이 본질적으로 FDKP 미립자 유일의 표면적과 동일한 양임을 나타내었다. 인슐린은 미립자와 비교할 때 매우 소량이기 때문에 기여도를 무시하였다. pH 2.9 미만에서, FDKP 입자 및 FDKP 입자 + 인슐린 곡선은 같아졌다. FDKP 입자 + 인슐린 곡선의 초음파 속도는 이 지점에서 더 높았고, 이는 FDKP 입자만 존재하는 시료에서보다 물에 더 많은 표면적이 노출되었음을 나타낸다. 이 추가적인 표면적은 혼탁액 내 자유 인슐린으로부터 기인하였다. pH가 약 2.7에서 약 2.9로 증가함에 따라, 인슐린 표면적은 FDKP 미립자 표면에 대한 인슐린의 흡착만큼 손실되었고, 자유 인슐린이 시스템으로부터 사라짐에 따라 FDKP 미립자 + 인슐린 곡선의 더 높은 효력이 사라졌다.

[0083] 상기 기술한 바와 같이, 단백질을 이용하는 코팅 입자의 2번째 pH-구동 방법은 유체 매질에 입자를 혼탁시키고, 용액 조건을 조절하여 입자 표면을 이온화하는 것이다. 단백질을 혼탁액에 첨가할 수 있고, 단백질 분자는 즉시 흡착될 것이다. 도 3은 FDKP 미립자의 pH-조절된 혼탁액에 첨가되자마자 흡착되었던 단백질(인슐린)의 양을 설명한다.

[0084] FDKP 미립자 혼탁액을 5 mg/mL로 제조하였고, 과량의 단백질(2 mg/mL)을 첨가하였다(본 명세서에서 지칭되는 것으로서, 과량의 단백질은 FDKP 미립자의 접근 가능한 표면을 덮는 단일층을 형성하는 데 필수적인 것으로 여겨지는 양 이상이다). 배양 후, 비흡착된 단백질을 여과에 의해 제거하였다. 여과기 상에 남아있는 고체(체류물)를 용해시켰고, 여과기 상에 남아있는 FDKP 미립자 및 단백질의 양을 HPLC에 의해 정량하였다. 이 정량화로부터 단백질/입자 질량비를 결정하였다. 이 입자의 공지된 표면적 및 단백질의 분자 차원을 기초로 하여, 약 0.07의 질량비에서 발생하도록 흡착된 단백질의 연속 단일층을 추측하였다. 이 추측을 기초로 하여, 이 실시예로부터 연속 단일층이 pH 5.0에서 형성되었고, 비연속 단일층이 3.5 내지 pH 4.5에서 형성되었음을 알 수 있다.

[0086] 추가적으로, 여러 가지 건조 활성제-코팅된 FDKP 미립자의 로트를 산성 용액 (최종 pH 약 2.0) 또는 물(최종 pH 약 4.5)에 혼탁시켰다. 표 2에 나타난 바와 같이, 상이한 활성제는 인슐린, 성장호르몬 및 인슐린 유사체(빠른 활성 유형의 인슐린)을 포함하였다. 용매를 이 혼탁액으로부터 여과하였고, 남아있는 입자를 용해하였고, 수집하였다. 모든 시료 내 활성제의 양을 HPLC로 정량하였다. 결과는 표 2에 나타난다.

[0087] 각 로트의 경우, 활성제는 산성 용액에서 입자로부터 방출되었다. 따라서, 미세결정의 표면을 양성자화함으로써, 활성제는 결정 표면으로부터 탈착된다. 입자를 물에 재혼탁시켰을 때(입자 표면의 이온화 상태는 변화시키지 않음), 남아있는 단백질이 흡착된다.

표 2

FDKP 미립자에 코팅되는 활성제

활성제 기준 용액	성장호르몬	인슐린	인슐린 유사체
활성제 기준 용액	250	1103	1099
산성 용액에서의 재혼탁	240	980	893
산성 용액의 여과 후 재용해	0	49	29
물에서의 재혼탁	0	4	0
물 여과 후 재용해	191	936	982

[0089] 표의 수치는 HPLC 정량화로부터의 적분 피크 면적이다(215nm에서 mAU\*초)

#### 실시예 4

##### FDKP 미립자에의 인슐린의 pH 구동 흡착의 특성화

[0090] 인슐린의 수성 용액과 FDKP 미립자의 수성 혼탁액을 혼합함으로써, 인슐린을 pH 제어 방법으로 FDKP 미립자에 흡착(로딩)시켰다. FDKP 미립자에 결합하는 인슐린에 대한 pH의 효과를 특성화하기 위해, 다양한 pH 수치에서 FDKP 입자의 혼탁액 5 mg/mL를 제조하였다. 과량의 용해된 인슐린을 첨가하였고, 약 5분 동안 흡착되게 한 후, 비결합 인슐린을 여과에 의해 제거하였다. 흡착된 인슐린을 갖는 고체 입자를 여과기로부터 회수하였고(체류물), 용해하고 수집하였다. 인슐린 및 용해된 FDKP 미립자의 양을 HPLC로 정량하였다. 흡착된 인슐린의 양을 체류물의 총 질량의 분획으로서 계산하였다. 인슐린 흡착의 pH 의존도를 도 4A에 도시하고, pH의 함수로서 인슐린 흡착이 증가하였다. 각각의 도 4B, C, 및 D에서 예시된 바와 같이, 유사한 결과를 SSX-2<sub>41-49</sub> 단일클론 항체, PTH, 및 그렐린에 대해 얻었다.

[0093] 추가적으로, FDKP 입자를 상이한 pH의 인슐린 용액(10 mg/mL)에 혼탁시켰다. FDKP 입자 대 인슐린의 질량비는 10:1이었다. 상청액을 원심분리에 의해 분리한 후, 상청액 내 비결합 인슐린 농도를 HPLC로 결정하였다. 인슐린 결합은 초기 인슐린 농도 차로서 결정되었다. pH의 증가가 용액 내 감소된 인슐린 및 FDKP 입자상의 증가된 인슐린 함량을 초래함을 도 5에서 기록된 데이터가 증명한다.

[0094] 따라서, pH가 약 pH 3.0에서 최대 약 pH 5으로 증가하면서, FDKP 입자에 대한 인슐린 결합이 증가한다. 인슐린 용액이 pH 3.6에서 첨가되는 것이 바람직하고, 이 조건 하에서 대략 75%의 인슐린이 용액으로부터 입자에 흡착되었다. pH가 ≥ 4.0까지 증가함에 따라, 인슐린 결합이 > 95%로 증가하였다. 실질적으로 완료된 결합이 약 pH ≥ 4.2, 바람직하게는 약 4.4에서 달성된다. 5.0 초과의 pH에서, FDKP 미립자가 용해되기 시작하고, 더 이상 결정질 미립자의 구조를 보유하지 않는다.

#### 실시예 5

##### 인슐린을 이용하는 FDKP 미립자의 로딩의 기술

[0097] 생산 규모 포맷(2-5 kg)에서, FDKP의 미립자는 아세트산을 이용하는 산 침전에 의해 형성되고, 세척된다. pH 3.6에서의 인슐린 용액을 FDKP 입자 혼탁액에 첨가하였다. 인슐린 스톡 용액은 인슐린 10 중량% 및 아세트산 2.5 중량%였다(대략 3.6의 pH). 수산화 암모늄을 이용하여 혼합물의 pH를 4.5로 조절하였다. 표 3은 배합물의 퀄로그램 당 다양한 성분의 양을 이용하여 ~11.4 중량% 인슐린을 함유하는 입자를 제조하였음을 나타낸다. 폴리소르베이트 80이 입자 제조 동안 도입될 수 있고, 최종 입자의 취급 특징을 개선시킬 수 있다. FDKP 입자에의 인슐린 흡착 및 완전한 혼합을 보장하기 위한 시간이 허용된다. 혼합물을 액체 질소에 적가하여 혼탁액을 급속 냉동하였다. 유체 매질을 동결건조에 의해 제거하여 FDKP 입자/인슐린 벌크 약물 생성물을 제조한다. 대안적으

로 혼합물을 분무 건조한다. 표 4는 유체 매질의 제거 후 별크 생성물 내 다양한 성분의 양을 나타낸다.

표 3

FDKP 입자/인슐린 배치 배합물의 조성

성분	11.4% FDKP/인슐린 (배합물 Kg 당 그램)
인슐린, USP	114 g
FDKP	870 g
폴리소르베이트 80, USP*	34.8 g
강한 암모니아 용액, NF	572 g
아세트산 (빙초산), NF	3680 g
정제수, NF	179000 g
질소, NF	필요한 경우

표 4

FDKP 입자/인슐린의 조성

성분	11.4% FDKP/인슐린, 공정 (배합물 g 당 양)
인슐린, USP	3.0 IU(0.11 mg)
FDKP	0.87 mg
폴리소르베이트 80, USP*	0.007 mg
강한 암모니아 용액, NF	공정 동안 제거됨
아세트산 (빙초산), NF	공정 동안 제거됨
정제수, NF	0.012 mg
질소, NF	공정 동안 제거됨

[0100] 상기 표 3 및 4에서, NF는 미국 약국(National Formulary)을 의미한다.

[0101] \* 폴리소르베이트 80 함량은 HPLC/MS 분석법에 의해 추정된다.

[0102] \*\* FDKP/인슐린 배합물은 동결 건조 후 약 1.2%의 잔존하는 물을 함유한다. 아세트산 및 수산화 암모늄의 미량이 존재할 수도 있다.

#### 실시예 6

##### 단백질에 의한 미립자 표면의 포화(연속적인 단일층의 형성)

[0104] 단일층을 갖는 미립자의 표면 코팅은 포화 공정이어야 한다. 즉, 이의 접근 가능한 표면적 및 활성제 분자의 적경은 미립자 표면의 용량을 좌우할 것이다. 도 6은 이 포화를 설명한다.

[0105] FDKP 미립자의 혼탁액을 제조하였고, pH를 pH 3.0 내지 pH 3.5로 조절하였고, 이 지점에서 표면은 부분적으로 이온화한다. 이 과정에서, 더 높은 pH는 활성제인 인슐린이 자가 회합을 일으킬 수 있기 때문에 이용할 수 없다. 소량의 농축된 인슐린 용액을 교반된 혼탁액에 첨가하였다. 각각의 첨가 후, 시료를 안정화하였고, 초음파 데이터를 수집하였다.

[0106] 도 6은 단백질 농도가 증가함에 따라 초음파 속도의 감소가 관찰됨을 나타낸다. 이 유형의 초음파 속도 변화는 수성 용액에서 리간드 결합에 대해 전형적이고, FDKP 미립자 표면으로의 활성 단백질의 흡착을 나타낸다. 속도 감소는 FDKP 미립자 및 단백질 표면으로부터 수화수의 방출에서 기인한다. 수화수가 활성제의 흡착에 의해 치환되는 경우, 이의 구조가 완화되고, 시료를 통과하는 초음파 속도의 순감소가 생성된다. FDKP 미립자의 표면상의 모든 결합 부위가 포화된 경우, 즉, 단백질 단일층이 형성된 경우, 곡선은 수평 해진다. 또한 단일층 형성은, FDKP 미립자의 농도(5 mg/mL)를 일정하게 하고, 활성제의 농도를 증가시킴에 따라, 미립자에의 다양한 활성제(GLP-1 [도 7A]; PTH [도 7B]; 항-SSX-2<sub>41-49</sub> 단일클론 항체 [도 7C]; 및 항-MOPC-21 단일클론 항체 [도 7D])의 흡착이 포화에 도달함을 나타내는 도 7A-7D의 데이터로부터 확인할 수 있었다. 이 연구는 미립자로의 활성제의 최적의 흡착이 포화에 도달함을 나타내는 도 7A-7D의 데이터로부터 확인할 수 있었다. 이 연구는 미립자로의 활성제의 최적의 흡착이 포화에 도달함을 나타내는 도 7A-7D의 데이터로부터 확인할 수 있었다. 이 연구는 미립자로의 활성제의 최적의 흡착이 포화에 도달함을 나타내는 도 7A-7D의 데이터로부터 확인할 수 있었다. 이 연구는 미립자로의 활성제의 최적의 흡착이 포화에 도달함을 나타내는 도 7A-7D의 데이터로부터 확인할 수 있었다. GLP-1은 이용된 농도에서 자가 회합하지 않는다(미국 가특허출

원 제60/744,882호에서 개시된 바와 같음).

[0108] **실시예 7**

[0109] 정전기적 상호작용 메커니즘에 대한 증거

[0110] 정전기적 상호작용 메커니즘에 대한 증거는 정전기적 상호작용을 약화시킴으로써 흡착을 방해하는 능력이다. 이는 이온화 입자/활성제 시스템에 염을 첨가함으로써 증명된다. 도 8A-8D는 활성제-FDKP 미립자 내 이온 세기의 증가가 미립자에의 활성제의 흡착을 감소시키는 것을 설명한다.

[0111] FDKP 미립자 표면에의 활성제의 흡착이 강한 pH 5.0에서 일련의 시료를 제조하였다. 각 시료는 도 8A-8D에서 각각의 막대로 표시되는 바(단위는 mM임)와 같이, 상이한 양의 염(염화 나트륨)을 함유하였다. 활성제를 혼탁액으로 혼합하여 FDKP 미립자 5 mg/mL 및 인슐린 0.75 mg/mL(과량; 도 8A)의 최종 농도를 얻었다. 짧은 배양 후, 비결합 활성제를 여과에 의해 제거하였고, 흡착된 활성제를 갖는 입자를 재용해하였다. 회수된 활성제 및 입자의 양은 HPLC로 정량하였고, 질량비(% 로딩)로서 나타내었다. 도 8A-8D는 활성제-FDKP 미립자 시스템 내 이온 세기의 증가는 5 mg/mL FDKP 미립자의 존재 하에서 항-SSX-2<sub>41-49</sub> 단일클론 항체(0.2 mg/mL; 도 8B), 그렐린(0.1 mg/mL; 도 8C) 및 PTH(0.25 mg/mL; 도 8D)를 포함하는 활성제의 흡착 정도를 감소시켰음을 설명한다.

[0112] 도 8은 로딩 혼탁액에서 측정된 흡착과 염 농도의 반비례 관계를 나타낸다. 이는 염이 입자 표면과의 상호작용에 있어서 활성제와 경쟁함에 대한 증거로서 해석될 수 있다. 염 농도가 증가함에 따라, 표면 결합 부위에 대해 강하고, 효과적으로 경쟁하고, 입자 표면으로부터 활성제로 본질적으로 치환된다. 또한 미립자로의 활성제의 결합의 감소는 드바이 차폐에 의할 수 있는 것으로 추측된다.

[0113] 다른 언급이 없는 한, 본 상세한 설명 및 청구항에서 이용된 성분의 양, 문자량과 같은 특성, 반응 조건 등을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 있어서 용어 "약"에 의해 변동 가능한 것으로 이해하여야 한다. 따라서, 반하는 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.

[0114] 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 문맥에 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.

[0115] 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.

[0116] 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 마크수 군의 기재 사항을 실행하는 군을 포함하는 것으로 간주한다.

[0117] 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

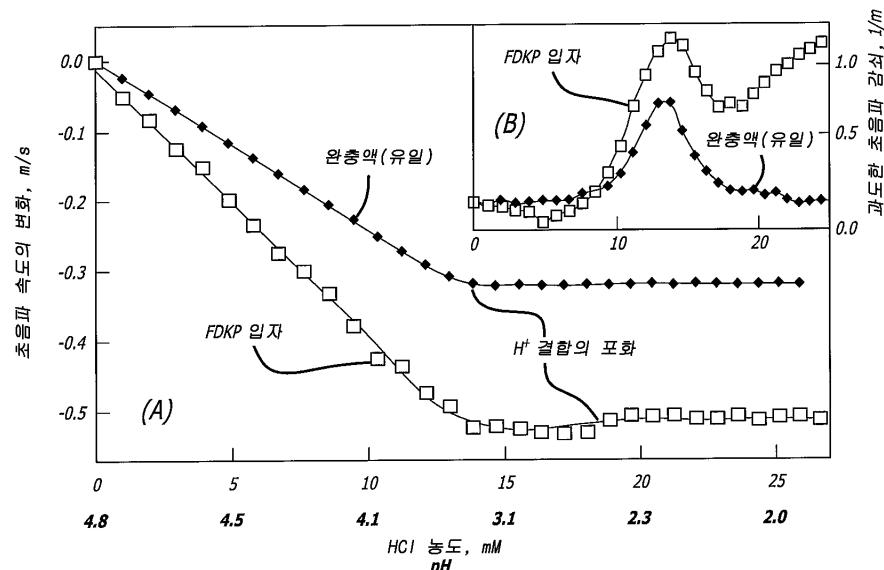
구체적으로 기술한 것 이상으로 실행될 것을 기대한다. 따라서, 본 발명은 적용되는 법에 의해 허가되는 한 첨부된 청구항에 언급된 내용의 모든 개질 및 균등물을 포함한다. 또한, 본 명세서에서 다른 언급이 없거나 또는 문맥에 의해 명확히 모순되지 않는 한, 이들의 가능한 모든 개질 내에서 상기 구성요소의 임의의 조합도 본 발명에 포함된다.

[0118] 더 나아가, 본 명세서 전체에 걸친 참조문헌들은 특허 되었거나 공개되었다. 상기 인용된 각 참고문헌 및 공개물은 본 명세서에서 전체적으로 참조에 의해 개별적으로 편입된다.

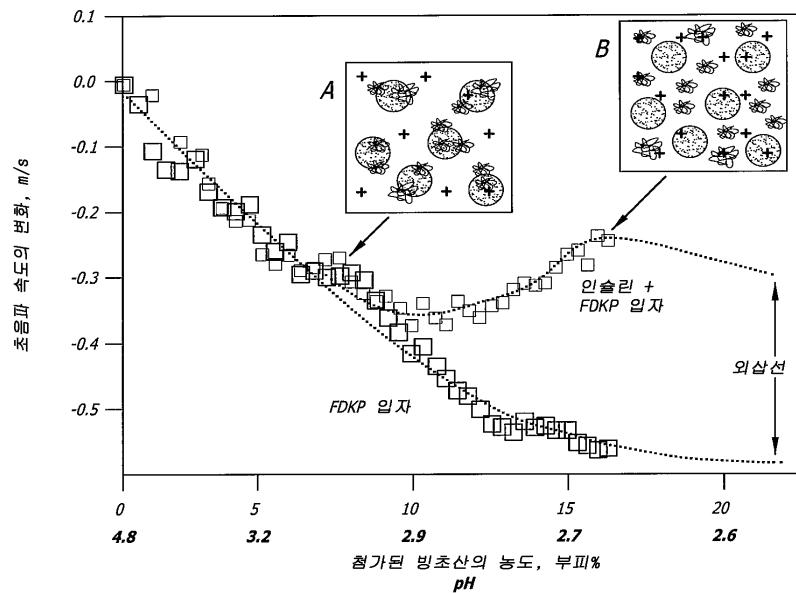
[0119] 또한, 본 명세서에서 개시된 본 발명의 구체예는 본 발명의 원리를 설명하기 위한 것으로 이해되어야 한다. 적용 가능한 기타 개질은 본 발명의 범위 내이다. 따라서, 실시예를 통해, 본 발명의 대체 구성이 본 명세서의 교시에 따라 사용될 수 있으며, 이들로써 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 상세하게 기재 및 도시된 내용으로 제한되는 것은 아니다.

## 도면

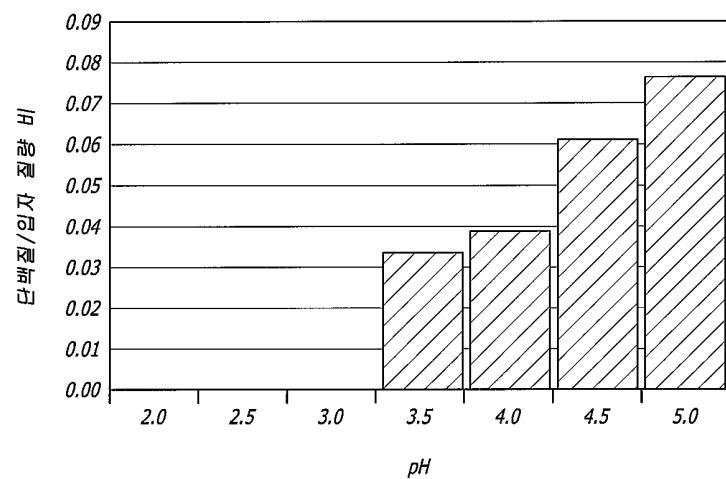
### 도면1



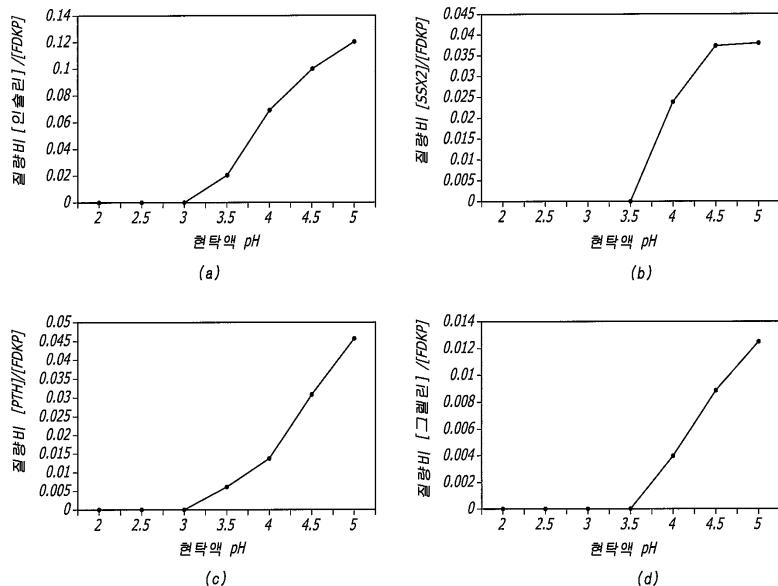
## 도면2



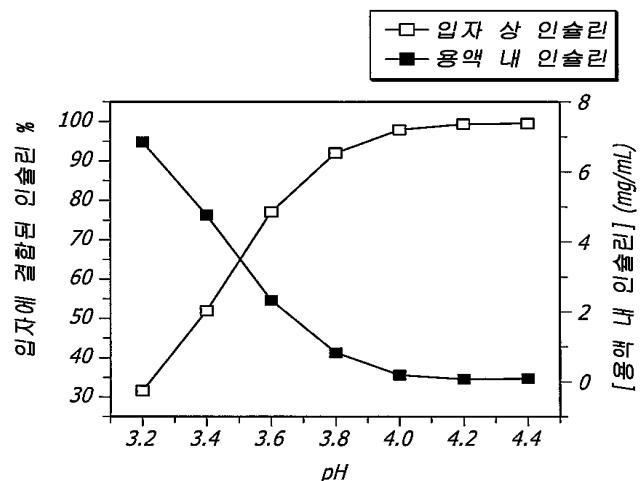
## 도면3



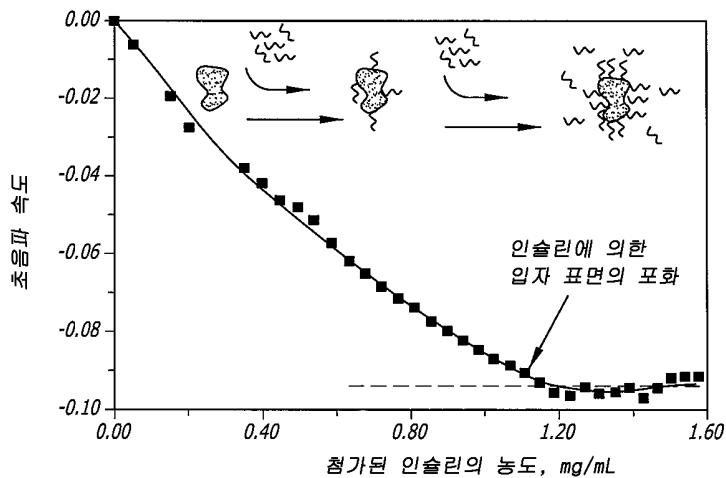
## 도면4



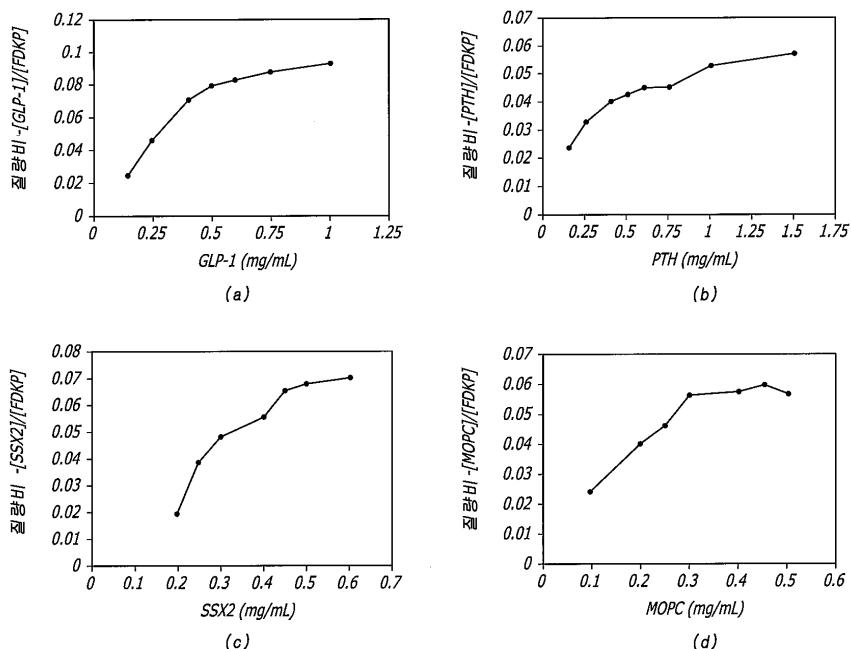
## 도면5



도면6



도면7



## 도면8

