



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0063293

(43) 공개일자 2022년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/50 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5031 (2013.01)

A61K 38/179 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7014819(분할)

(22) 출원일자(국제) 2012년11월18일

심사청구일자 2022년05월02일

(62) 원출원 특허 10-2021-7004470

원출원일자(국제) 2012년11월18일

심사청구일자 2021년02월16일

(85) 번역문제출일자 2022년05월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/065735

(87) 국제공개번호 WO 2013/075068

국제공개일자 2013년05월23일

(30) 우선권주장

61/561,525 2011년11월18일 미국(US)

(71) 출원인

리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드

미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

(72) 발명자

왈쉬 스코트

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

첸 헌터

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

(74) 대리인

특허법인와이에스장

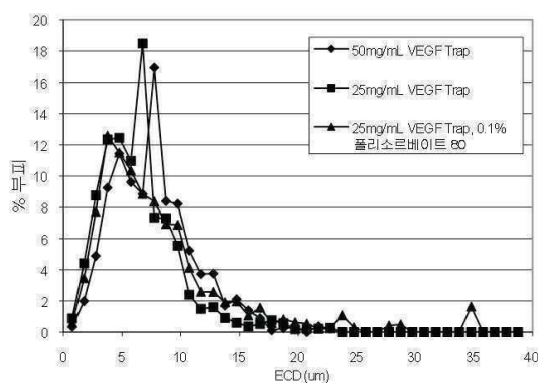
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 폴리머 단백질 미립자

(57) 요약

치료적 단백질의 코어 및 생체 적합성 및 생분해성 폴리머의 코어텍스를 함유하는 미립자, 및 미립자를 만들고 사용하는 방법이 제공된다. 생리학적 용액에서 미립자로부터의 치료적 단백질의 지속적인 방출이 연장된 기간 동안 입증되었다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/1641 (2013.01)

A61K 9/1647 (2013.01)

A61K 9/1652 (2013.01)

A61K 9/5047 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

폴리머로 코팅된 단백질을 포함하는 조성물로서, 조성물은 지름이 약 5 μm 내지 약 40 μm 인 입자인 조성물.

청구항 2

제1 항에 있어서, 단백질은 항원-결합 단백질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 항체 단편인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제5 항에 있어서, 단백질은 VEGF-Trap인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제4 항에 있어서, 항체는 사람 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제1 항 내지 제8 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리머는 생분해성 폴리머인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리머는 폴리(젯산) (PLA), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), 폴리오르토에스테르 (POE), 에틸 셀룰로스 (EC), 및 폴리- ϵ -카프로락톤 (PCL)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10 항에 있어서, 단백질은 트랩 또는 항체이고, 폴리머는 POE인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제1 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 있어서, 입자의 평균 지름은 약 15 μm 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제1 항 내지 제10 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 트랩 또는 항체이고, 폴리머는 PLGA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

지름이 약 2 μm 내지 약 12 μm 인 단백질 입자 코어 및 생분해성 폴리머 코어텍스를 포함하는, 약 2 μm 내지 약 70 μm 의 지름을 갖는 미립자.

청구항 15

제14 항에 있어서, 생분해성 폴리머는 폴리(젯산) (PLA), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), 폴리오르토에스테르 (POE), 에틸 셀룰로스 (EC), 및 폴리- ϵ -카프로락톤 (PCL)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미립자.

청구항 16

제14 항 또는 제15 항에 있어서, 단백질 입자 코어는 항원-결합 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 미립자.

청구항 17

제14 항 내지 제16 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질인 것을 특징으로 하는 미립자.

청구항 18

제14 항 내지 제17 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 입자 코어는 VEGF-Trap을 포함하고 폴리머 코어텍스는 POE, PLA, 또는 PLGA를 포함하는 것을 특징으로 하는 미립자.

청구항 19

제14 항 내지 제16 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 항체인 것을 특징으로 하는 미립자.

청구항 20

제14 항 내지 제16 항 및 제19 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 사람 IgG 분자이고, 폴리머 코어텍스는 POE, PLA, 또는 PLGA를 포함하는 것을 특징으로 하는 미립자.

청구항 21

지름이 약 2 μm 내지 약 12 μm 인 단백질 입자 및 생분해성 폴리머 코어텍스를 포함하는, 약 2 μm 내지 약 70 μm 의 범위의 지름을 갖는 복수의 미립자.

청구항 22

제21 항에 있어서, 미립자는 다른 속도로 분해되고 단백질은 연장된 기간 동안 수성 환경에서 방출되는 것을 특징으로 하는 복수의 미립자.

청구항 23

제22 항에 있어서, 기간은 적어도 3일인 것을 특징으로 하는 복수의 미립자.

청구항 24

제22 항 또는 제23 항에 있어서, 기간은 적어도 60일인 것을 특징으로 하는 복수의 미립자.

청구항 25

제21 항 내지 제24 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 항원-결합 단백질인 것을 특징으로 하는 복수의 미립자.

청구항 26

제21 항 내지 제25 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질인 것을 특징으로 하는 복수의

미립자.

청구항 27

제21 항 내지 제26 항 중 어느 한 항에 있어서, 수용체-Fc-융합 단백질은 VEGF Trap이고 폴리머 코어텍스는 POE, PLA, 또는 PLGA를 포함하는 것을 특징으로 하는 복수의 미립자.

청구항 28

제21 항 내지 제25 항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 단백질은 항체인 것을 특징으로 하는 복수의 미립자.

청구항 29

제28 항에 있어서, 항체는 사람 IgG 분자이고 폴리머 코어텍스는 POE, PLA, 또는 PLGA를 포함하는 것을 특징으로 하는 복수의 미립자.

청구항 30

환자에게 제21 항 내지 제29 항 중 어느 한 항의 복수의 미립자의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 치료적 단백질이 연장된 기간 동안 미립자로부터 방출되는, 질환을 치료하는 방법.

청구항 31

제30 항에 있어서, 단백질은 VEGF-Trap이고 폴리머는 POE, PLA, 또는 PLGA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제30 항 또는 제31 항에 있어서, 질환은 안구 질환이고 미립자는 60일 미만의 간격으로 환자의 유리체에 전달되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

단백질 및 생분해성 폴리머를 포함하는 조성물을 제조하는 방법으로서,

- a. 단백질 입자를 획득하는 단계;
- b. 단백질 입자를 폴리머 및 용매를 포함하는 용액에서 현탁하는 단계; 및
- c. 용매를 제거하는 단계

를 포함하며, 폴리머로 코팅된 단백질을 포함하는 입자가 형성되는 방법.

청구항 34

제33 항에 있어서, 단백질 입자는 단백질을 포함하는 용액을 분무 건조함으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제34 항에 있어서, 분무 건조는 이단-노즐 소니케이션, 일단-노즐 소니케이션, 또는 전기 분무에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제33 항 내지 제35 항 중 어느 한 항에 있어서, 용매는 분무 건조에 의해 단계 (b)의 단백질 현탁액의 분산을 일으킴으로써 증발되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제33 항 내지 제36 항 중 어느 한 항에 있어서, 용매는 열 증발, 공기 증발, 또는 추출에 의해 제거되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제33 항 내지 제37 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리머는 폴리(젯산) (PLA), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), 폴리오르토에스테르 (POE), 에틸 셀룰로스 (EC), 및 폴리-ε-카프로락톤 (PCL)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제33 항 내지 제38 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질 또는 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제33 항 내지 제39 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 VEGF-Trap 또는 IgG 분자이고, 폴리머는 POE, PLA, 또는 PLGA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제33 항 내지 제40 항 중 어느 한 항에 있어서, 입자는 약 15 μm의 평균 지름을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

(a) 단백질을 생분해성 폴리머와 결합시켜 단백질-폴리머 복합체를 형성하는 단계; 후 이어서 (b) 단백질-폴리머 복합체를 용매와 접촉시키는 단계를 포함하며, 폴리머는 시간이 흐름에 따라 분해되고 단백질은 점진적으로 용매로 방출되는, 단백질의 방출을 조절하는 방법.

청구항 43

제42 항에 있어서, 단계 (a)는 제33 항 내지 제41 항 중 어느 한 항에 따라 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제42 항 또는 제43 항에 있어서, 단백질은 VEGF-Trap 또는 IgG 분자이고, 폴리머는 POE, PLA, 또는 PLGA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제42 항 내지 제44 항 중 어느 한 항에 있어서, 입자는 약 15 μm의 평균 지름을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제42 항 내지 제45 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 적어도 3일 동안 단백질-폴리머 복합체로부터 방출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제42 항 내지 제46 항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질은 적어도 60일 동안 단백질-폴리머 복합체로부터 방출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제42 항 내지 제47 항 중 어느 한 항에 있어서, 용매는 완충된 식염수인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제42 항 내지 제47 항 중 어느 한 항에 있어서, 용매는 생체 내에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제42 항 내지 제47 항 중 어느 한 항에 있어서, 용매는 유리액인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지속 방출형(extended release) 단백질 치료제의 제조, 조성물, 및 사용에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 수성-기반 또는 생리학적 환경에서 시간이 흐름에 따른 단백질의 지속적이고 균일한 방출을 위한 복수의 폴리머 코팅된 단백질 미소구체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 예를 들어, 망막 또는 종양과 같은 생물학적 표적을 향해 투여된, 또는 비경구로 투여된 치료 단백질의 지속적인 방출은 암, 심혈관 질환, 혈관 질환, 정형외과적 장애, 치과 질환, 상처, 자가 면역 질환, 위장관 장애, 및 안구 질환을 포함하는, 많은 다른 질환의 치료에 바람직하다. 약물의 제어되고 지속적인 전달을 위한 생체 적합성 및 생분해성 폴리머는 수십 년 동안 사용되어 왔다. 시간이 흐름에 따라 폴리머가 분해되기 때문에, 치료적 약물은 서서히 방출된다.

[0003] 안구 내 치료제의 경우에, 가능한 적은 안구 내 주사로 시간이 흐름에 따라 단백질 치료제를 효과적으로 전달하기 위한 지속 방출형 제형에 대하여 중요한 미충족 의료 필요가 있다. 암, 염증성 질환들, 및 다른 질환들과 같은 다른 질환의 경우에서, 단백질 치료제를 함유하는, 개선된 주입 가능 지속 방출형 제형이 필요하다.

[0004] [선행기술문헌]

[0005] - 선행기술문헌 1: US 201104151

[0006] - 선행기술문헌 2: US 2008305115

[0007] - 선행기술문헌 3: WO 03092665

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 출원인들은 연장된 기간 동안 치료적 단백질의 치료적 유효량을 균일하게 방출할 수 있는, 생분해성 폴리머 및 치료적 단백질을 함유하는 미립자를 제조하고 사용하는 발견하였고 본원에서 개시하고 주장한다.

과제의 해결 수단

[0009] 한 양태에서, 본 발명은 폴리머로 코팅된 단백질을 포함하는 미립자를 제공한다. 한 구체예에서, 미립자는 지름이 약 2 미크론 내지 약 70 미크론이다. 한 구체예에서, 미립자는 지름이 약 15 미크론이다.

[0010] 한 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질이다. 한 구체예에서, 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 수용체 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 트랩형(trap-type) 단백질이며, 이것은 동계(cognate)-수용체 단편 및 Fc 도메인을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 단백질은 VEGF-Trap 단백질이다. 한 구체예에서, VEGF-Trap 단백질은 SEQ ID NO:1에서 설명된 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 한 구체예에서, 폴리머는 생분해성 폴리머이다. 일부 구체예들에서, 폴리머는 폴리젓산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록시부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젓산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드록셀 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검(guar gum), 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피

브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리- ϵ -카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 PLGA 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리오르토에스테르 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다.

[0012] 한 구체예에서, 미립자는 10 미크론 미만의 미소화된 단백질 코어 및 폴리머 코어텍스(cortex)를 포함한다. 한 구체예에서, 미소화된 단백질은 폴리머로 적어도 50% 코팅되며, 이것은 미소화된 단백질 코어 표면의 50% 이하가 노출된다는 것을 의미한다. 한 구체예에서, 미소화된 단백질 코어 표면의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100%가 폴리머로 코팅된다.

[0013] 한 구체예에서, 크기가 10 미크론보다 더 큰 미립자는 (a) 단백질이 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상인, 10 미크론보다 작은 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머가 생체 적합성 폴리머, 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 폴리젯산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- ϵ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- β -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- β -R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리- β -R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 하나 이상인 폴리머 코팅을 포함한다.

[0014] 한 구체예에서, 평균 지름이 약 15 미크론 내지 약 30 미크론인 미립자는 (a) 단백질이 VEGF-Trap 단백질이며, 약 10 내지 약 12 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머가 PCL, PLGA, 에틸 셀룰로스 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상인 폴리머 코팅을 포함한다.

[0015] 한 양태에서, 본 발명은 복수의 미립자를 제공하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어, 및 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0016] 한 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상이다. 한 구체예에서, 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 트랩형 단백질이며, 이것은 동계-수용체 단편 및 Fc 도메인을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 단백질은 VEGF-Trap 단백질이다. 특정 구체예에서, VEGF-Trap 단백질은 SEQ ID NO: 1에서 설명된 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 한 구체예에서, 폴리머는 생체 적합성 폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 생침식성 폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 생분해성 폴리머이다. 일부 구체예들에서, 폴리머는 폴리젯산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리- ϵ -카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리- β -R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리- β -R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리- β -R-말산, 인

지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머로 구성된 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리-ε-카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 PLGA 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르이다.

[0018] 한 구체예에서, 복수의 미립자 중 대부분의 미립자의 미소화된 단백질 코어는 폴리머로 적어도 50% 코팅되며, 이것은 미소화된 단백질 코어의 표면 중 적어도 50% 이하가 노출된다는 것을 의미한다. 한 구체예에서, 미소화된 단백질 코어 표면의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100%가 폴리머로 코팅된다.

[0019] 한 구체예에서, 복수의 미립자는, 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있으며, (a) 단백질이 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상인, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머가 생체 적합성 폴리머, 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 폴리젯산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥시드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산](pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 하나 이상인 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0020] 한 구체예에서, 복수의 미립자는, 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고, 약 15 미크론 내지 약 30 미크론의 중앙 크기를 가지며, (a) 약 10 미크론 내지 약 12 미크론의 중앙 크기를 갖고, 단백질은 VEGF-Trap 단백질인, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) PLA, PCL, PLGA, 에틸 셀룰로스 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상인 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0021] 한 양태에서, 본 발명은 단백질 코어 및 폴리머 코어텍스를 포함하는 미립자의 제조 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 제조된 미립자는 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 지름, 또는 약 15 미크론 내지 약 30 미크론의 중앙 지름을 갖는다. 한 구체예에서, 미립자의 제조 방법은 (1) 단백질 입자를 획득하는 단계; (2) 폴리머 및 용매를 포함하는 용액에서 단백질 입자를 현탁하는 단계; 및 (3) 용매를 제거하는 단계를 포함하며, 폴리머 코어텍스로 코팅된 단백질 코어를 포함하는 미립자가 형성된다.

[0022] 한 구체예에서, 단계 (1)의 단백질 입자는 미소화된 단백질 입자이며, 이것은 단백질을 포함하는 용액을 분무 건조함으로써 얻어진다.

[0023] 단백질 용액은 이단-노즐 소니케이션(sonication), 일단-노즐 소니케이션, 또는 전기 분무(electrospray)를 통해 분무 건조된다. 일부 구체예들에서, 결과로 얻은 미소화된 단백질 입자는, 제조된 미립자의 코어를 형성하며, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 지름을 갖고, 약 10 미크론 내지 약 12 미크론의 중앙 지름을 갖는다.

- [0024] 일부 구체예들에서, 코어를 형성하는 단백질은 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 (예를 들어, IgG) 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상이다. 특정 구체예에서, 단백질은 SEQ ID NO:1에서 설명된 아미노산 서열을 포함하는 VEGF-Trap이다.
- [0025] 한 구체예에서, 용매는 단계 (2)의 단백질-폴리머-용매 혼합물의 분산을 일으키고 용매를 분산에 의해 생성된 방울로부터 증발시킴으로써 단계 (3)에서 제거된다. 한 구체예에서, 분산은 분무 건조에 의해 일어나며, 이것은 이단-노즐 소니케이션, 일단-노즐 소니케이션, 또는 전기 분무에 의해 수행될 수도 있다. 한 구체예에서, 용매는 열 또는 공기를 적용함으로써, 또는 화학 추출법에 의해 방울로부터 제거된다.
- [0026] 한 구체예에서, 폴리머는 생분해성, 생침식성, 및/또는 생체 적합성이다. 일부 구체예들에서, 폴리머는 폴리젯산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 것도 된다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리-ε-카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 PLGA 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리오르토에스테르, 또는 이들의 유도체이며, 이것은 산 불안정 요소를 함유한다. 또 다른 구체예에서, 폴리머는 PLA이다.
- [0027] 한 양태에서, 본 발명은 (1) 단백질을 함유하는 용액을 분무 건조함으로써, 지름이 약 2 미크론 내지 약 30 미크론이고, 중앙 지름이 약 10 미크론 내지 12 미크론인 미소화된 단백질 입자를 형성하는 단계로서, 단백질은 항원-결합 단백질인 단계. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상 (예를 들어, SEQ ID NO: 1의 서열을 갖는 것)이다; (2) 폴리머 및 용매를 포함하는 용액에서 미소화된 단백질 입자를 현탁하는 단계로서, 폴리머는 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 생체 적합성 폴리머, 폴리젯산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 하나 이상인 단계; 및 (3) 미소화된 단백질 입자-폴리머-용매 현탁액을 분무 건조함으로써 용매를 제거하고 열 또는 공기의 적용에 의해, 또는 용매의 추출에 의해 용매를 떨어뜨리는 단계로서, 지름이 약 2 미크론 내지 약 70 미크론이고, 중앙 지름이 약

15 미크론 내지 약 30 미크론이며, 단백질 코어 및 폴리머 코어텍스를 포함하는 미립자가 형성되는 단계를 포함하는, 미립자의 제조 방법을 제공한다.

[0028] 일부 구체예들에서, 단계 (1) 또는 단계 (3)의 분무 건조는 이단-노즐 소니케이션, 일단-노즐 소니케이션, 또는 전기 분무를 통해 수행된다.

[0029] 한 구체예에서, 미립자의 제조 방법은 (1) VEGF Trap 단백질을 함유하는 용액을 분무 건조함으로써 지름이 약 10 미크론 내지 12 미크론인 미소화된 VEGF-Trap 입자를 형성하는 단계; (2) 잠재성 산 및 호환성 용매, 또는 에틸셀룰로스 및 호환성 용매를 포함하는 폴리오르토에스테르를 포함하는 용액에서 미소화된 VEGF Trap 입자를 현탁하는 단계; 및 (3) (a) 미소화된 VEGF Trap 입자-폴리오르토에스테르-잠재성 산-용매 현탁액 또는 미소화된 VEGF Trap 입자-에틸 셀룰로스-용매 현탁액을 분무 건조함으로써 및 (b) 열 또는 공기의 적용, 또는 용매의 추출에 의해 용매를 떨어뜨림으로써 용매를 제거하는 단계를 포함하며, 지름이 약 15 미크론 내지 약 30 미크론이고, 폴리오르토에스테르의 VEGF-Trap 코어 및 폴리머 코어텍스, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체를 포함하는 미립자가 형성된다.

[0030] 한 양태에서, 본 발명은 시간이 흐름에 따른 치료적 단백질의 일정한 수준의 방출 또는 전달을 위한 치료적 단백질의 지속 방출형 제형을 제공한다. 지속 방출형 제형은 복수의 미립자를 포함하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있으며, 이것들 각각은 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어, 및 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0031] 한 구체예에서, 치료적 단백질은 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예들에서, 항원-결합 단백질은 항체 (예를 들어, IgG) 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상이다 (예를 들어, 이것들 중 하나는 SEQ ID NO: 1의 1차 구조를 갖는다). 한 구체예에서, 치료적 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단백질은 IgG이다. 또 다른 구체예에서, 치료적 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질이다. 또 다른 구체예에서, 치료적 단백질은 트랩형 단백질이며, 이것은 동계-수용체 단편 및 Fc 도메인을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 치료적 단백질은 VEGF-Trap 단백질이다. 또 다른 구체예에서, VEGF-Trap은 SEQ ID NO: 1에서 설명된 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 생체 적합성 폴리머를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 생침식성 폴리머를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 생분해성 폴리머를 포함한다. 일부 구체예들에서, 폴리머 코어텍스는 폴리젓산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젓산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머로 구성된 군으로부터 선택된 폴리머를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머는 폴리-ε-카프로락톤 (PCL) 또는 이들의 유도체 또는 코폴리머이다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 PLGA를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 에틸 셀룰로스를 포함한다. 한 구체예에서, 폴리머 코어텍스는 PLA, PLGA, 에틸 셀룰로스, 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상을 포함한다.

[0033] 한 구체예에서, 복수의 미립자는 폴리머 코어텍스의 두께의 범위를 갖는 미립자의 컬렉션(collection)을 포함하며, 이러한 미립자의 컬렉션의 개개의 미립자는 다른 속도로 분해되며, 이것은 치료적 단백질의 균일한 속도의 방출을 허용한다.

[0034] 한 구체예에서, 복수의 미립자는 코팅되지 않은 미소화된 단백질 입자 및 폴리머 코어텍스의 두께의 범위를 갖

는 미립자를 포함하며, 이것은 코어텍스 두께를 기준으로 하는 반복 간격으로 치료적 단백질의 방출을 허용한다.

[0035] 한 구체예에서, 복수의 미립자는 분해 및 이후의 방출의 시기 또는 기간을 제어하기 위해 다양한 수준의 소수성의 폴리머 피질을 갖는 미립자의 혼합물을 포함한다. 한 구체예에서, 미립자들 각각은 폴리머 내층 및 폴리머 외층을 포함하며, 폴리머 외층은 폴리머 내층의 수화를 제한하여 치료적 단백질의 방출을 제어한다.

[0036] 한 구체예에서, 치료적 단백질은, 미립자들이 수성 환경에 있을 때, 적어도 60일의 기간 동안 약 0.01 mg/주 내지 약 0.30 mg/주의 속도로 복수의 미립자들로부터 방출된다. 한 구체예에서, 수성 환경은 시험관 내(in vitro) 버퍼이다. 한 구체예에서, 수성 환경은 생체 내부이다. 한 구체예에서, 수성 환경은 생체 외부이다. 한 구체예에서, 수성 환경은 유리액(vitreous humor)이다.

[0037] 한 구체예에서, 지속 방출형 제형은 복수의 미립자를 포함하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고 (a) 단백질이 항체 또는 항체 단편, 이들의 수용체 또는 가용성 단편, 가용성 T-세포 수용체 단편, 가용성 MHC 단편, 수용체-Fc-융합 단백질, 트랩형 단백질, 및 VEGF-Trap 단백질 중 어느 하나 이상일 수 있는, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 치료적 단백질의 코어; 및 (b) 폴리머는 생체 적합성 폴리머, 생분해성 폴리머, 생침식성 폴리머, 폴리젯산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리 (젯산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HMPA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알라노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 다당류, 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 알기네이트, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 히알루론산, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리락타산 및 폴리슈도락타산, 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리루신, 류신-글루타메이트 코-폴리머, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 잠재성 산을 포함하는 폴리오르토에스테르, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머, 및 이들의 조합 및 코폴리머 중 어느 하나 이상이며, 미립자는 적어도 60일 동안 약 0.01 mg/주 내지 약 0.30 mg/주의 속도로 일정한 수준의 치료적 단백질을 방출하거나 전달하는, 두께의 범위의 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0038] 한 구체예에서, 지속 방출형 제형은 복수의 미립자를 포함하며, 이것들은 크기가 약 2 미크론 내지 약 70 미크론의 범위에 있고, 약 15 미크론 내지 약 30 미크론의 중앙 크기를 가지며, (a) 약 10 미크론 내지 약 12 미크론의 중앙 크기를 가지며, 단백질이 VEGF-Trap 단백질인, 약 2 미크론 내지 약 30 미크론의 미소화된 단백질 코어; 및 (b) 폴리머는 PLGA, 에틸 셀룰로스, 및 폴리오르토에스테르, 및 이들의 코폴리머 또는 유도체 중 어느 하나 이상이며, 이러한 수성 환경에서 미립자는 적어도 60일 동안 약 0.06 ± 0.02 mg/주의 속도로 VEGF Trap의 일정한 수준을 방출하거나 전달하는, 두께 범위의 폴리머 코어텍스를 포함한다.

[0039] 한 양태에서, 본 발명은 단백질의 방출을 조절하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 방법은 상기 양태에서 설명된 바와 같이 복수의 미립자를 만드는 단계에 이어서, 미립자를 용매에 배치하는 단계를 포함한다. 일부 구체예들에서 용매는 수성이다. 용매는 인산염 완충된 용액과 같이, 시험관 내에 있을 수 있다. 용매는 예를 들어, 유리액과 같이, 생체 내에 있을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 50 mg/mL의 VEGF Trap 단백질, 25 mg/mL의 VEGF Trap 단백질, 및 25 mg/mL의 VEGF Trap 단백질 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80으로 제조된 단백질 입자의 집단에서, 주어진 지름(ECD (μm))의 폴리머 코어텍스가 없는 단백질 입자의 상대적인 양 (부피%)을 기술한다.

도 2는 50 mg/mL의 VEGF Trap 단백질 플러스 50 mg/mL POE, 250 mg/mL POE, 및 50 mg/mL EC로 제조된 미립자의 집단에서, 주어진 지름 (ECD (μm))의 미립자의 상대적인 양 (MFI에 의해 결정된 부피%)을 기술한다.

도 3은 대략 60일 동안 50 mg/mL POE, 250 mg/mL POE, 또는 50 mg/mL EC로 제조된 미립자로부터 방출된, 밀리

그럼 단위의 VEGF Trap 단백질의 양을 기술한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명의 마이크로 입자 및 단백질 코어 입자는 형태가 거의 구형이다. 일부 미립자 및 단백질 코어는 구형에 근접하는 한편, 다른 것들은 형태가 더 불규칙할 것이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "지름"은 다음 중 각각 및 어느 하나를 의미한다: (a) 미립자 또는 단백질 코어를 제한하는 구체의 지름, (b) 미립자 또는 단백질 코어의 범위 내에서 적합한 가장 큰 구체의 지름, (c) (a)의 제한된 구체 및 (b)의 제한된 구체 사이의, 둘 사이의 평균값을 포함하는, 어떤 측정값, (d) 미립자 또는 단백질 코어의 장축(the longest axis)의 길이, (e) 미립자 또는 단백질 코어의 단축(the shortest axis)의 길이, (f) 장축 (d)의 길이 및 단축 (e)의 길이 사이의, 둘 사이의 평균값을 포함하는, 어떤 측정값, 및/또는 (g) 미세 유동 영상 (micro-flow imaging: MFI), 나노입자 추적 분석 (nanoparticle tracking analysis: NTA), 또는 동적 광산란 (dynamic light scattering: DLS)과 같은 빛 오퍼 방법 (light obscuration method)에 의해 결정된, 상당 원형 지름 (equivalent circular diameter: "ECD"). 일반적으로 Sharma et al., micro-flow imaging: flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations, AAPS J. 2010 Sep; 12(3): 455-64를 참고하면 된다. 지름은 일반적으로 마이크로미터 (μm 또는 미크론)으로 표현된다. 지름은 광학적 측정에 의해 결정될 수 있다.
- [0042] "미소화된 단백질 입자" 또는 "단백질 입자"는 적은, 매우 적은, 또는 0에 가까운 양의 물(예를 들어, <3 중량% 물)이 있는 단백질의 다수의 분자를 함유하는 입자를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 미소화된 단백질 입자는 형태가 일반적으로 구형이고 2 미크론 내지 약 35 미크론의 범위의 ECD를 갖는다. 미소화된 단백질 입자는 미소화된 단백질 입자는 어떤 특정한 단백질 실체물에 제한되지 않고, 치료적 단백질의 제조 및 전달에 적합하다. 일반적인 치료적 단백질은 그 중에서도(inter alia), 예를 들어, 가용성 수용체 단편과 같은 항원-결합 단백질, 항체 (IgGs 등) 및 항체의 유도체 또는 단편, Fc 융합 단백질을 포함하는 다른 Fc 함유 단백질, 및 예를 들어, VEGF-Trap과 같은 트랩형 단백질을 포함하는 수용체-Fc 융합 단백질을 포함한다 (Huang, C, Curr. Opin. Biotechnol. 20: 692-99 (2009)).
- [0043] 본 발명의 미소화된 단백질 입자는 미크론 크기의 단백질 입자를 만드는 업계에 알려진 어떤 기술에 의해서도 만들어질 수 있다. 예를 들어, 단백질 입자는 그 중에서도 분무 건조(하기와 같음), 동결 건조, 제트 분쇄(jet milling), 행잉 드롭 결정화(hanging drop crystallization) (Ruth et al., Acta Crystallographica D56: 524-28 (2000)), 점진적 침전 (US 7,998,477 (2011)), 단백질-PEG (폴리에틸렌 글리콜) 수성 혼합물의 동결 건조 (Morita et al, Pharma. Res. 17: 1367-73 (2000)), 임계 유체 침전(supercritical fluid precipitation) (US 6,063,910 (2000)), 또는 고압 이산화탄소 유발된 입자 형성 (Bustami et al., Pharma. Res. 17: 1360-66 (2000))에 의해 만들어질 수도 있다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단백질"은 펩티드 결합에 의해 서로 결합된 둘 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 나타낸다. 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 또한 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복시화, 수산화 및 ADP-리보실화를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 변형을 포함한다. 단백질-기반 약물을 포함하는 폴리펩티드는 과학적으로 또는 상업적으로 흥미로운 것들일 수 있다. 폴리펩티드는, 다른 것들 중에서도, 항체 및 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 세포 배양 방법을 사용하여 재조합 동물 세포주에 의해 생산된다. 폴리펩티드는, 다른 것들 중에서도, 항체 및 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 세포 배양법을 사용하여 재조합 동물 세포주에 의해 생산된다.
- [0045] "항체"는 네 개의 폴리펩티드 사슬, 이황화 결합에 의해 서로 연결된 두 개의 중쇄(H) 및 두 개의 경쇄(L)로 구성된 면역글로불린 분자를 나타내기 위한 것이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region: HCVR 또는 VH) 및 중쇄 불변 영역(heavy chain constant region)을 갖는다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 함유한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(light chain variable region) 및 경쇄 불변 영역(light chain constant region)을 갖는다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 (CL)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (framework region: FR)으로 불리는, 더 보존적인 영역과 함께 배치된, 상보성 결정 영역 (complementarity determining region: CDR)으로 불리는, 추가변성의 영역으로 더 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 구성되며, 아미노-말단에서 카르복시-말단 방향으로 다음 순서대로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 용어 "항체"는 어떤 이소타입 또는 하위등급의 글리코실화된 및 글리코실화되지 않은 면역글로불린 둘 다에 대한 지시대상을 포함한다. 용어 "항체"는 항체를 발현하기 위해 트랜스펙션된 숙주 세포로부터 분리된 항체와 같이, 재조합 수단에 의해 제조된, 발현된, 생성된 또는 분리된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. IgG는 항체의 부분집합을 포함한다.

- [0046] "Fc 융합 단백질"은 둘 이상의 단백질 중 일부 또는 모두를 포함하며, 이것들 중 하나는 면역글로불린 분자의 Fc 부분이고, 이것들은 그것들의 자연 상태에서 융합되지 않는다. 항체-유래 폴리펩티드의 다양한 부분(Fc 도메인 등)에 융합된 특정 이중 기원의 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 제조는 예를 들어, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; 및 Hollenbaugh et al., "Construction of immunoglobulin fusion proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, 페이지 10.19.1- 10.19.11, 1992에 의해 설명되었다. "수용체 Fc 융합 단백질"은 Fc 모이어티에 커플링된 수용체의 하나 이상의 세포 외 도메인(들) 중 하나 이상을 포함하며, 이것은 일부 구체예들에서 힌지 영역(hinge region)에 이어서 면역글로불린의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구체예들에서, Fc-융합 단백질은 단일 또는 하나 이상의 리간드(들)에 결합하는, 둘 이상의 별개의 수용체 사슬을 함유한다. 예를 들어, Fc-융합 단백질은 예를 들어, IL-1 트랩(예를 들어, hIgG1의 Fc에 융합된 IL-1 R1 세포 외 영역에 융합된 IL-1 RacP 리간드 결합 영역을 함유하는, 릴로나셉트(Rilonacept); 미국 특허 제6,927,004호를 참고하면 되고, 이것은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다), 또는 VEGF Trap (예를 들어, hIgG1의 Fc에 융합된 VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합된 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 함유하는, 에플리버셉트(Aflibercept); 예를 들어, SEQ ID NO: 1; 미국 특허 제7,087,411호 및 제7,279, 159호를 참고하면 되고, 이것은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)과 같은 트랩이다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리머"는 공유 화학 결합에 의해 연결된 반복 모노머를 포함하는 거대 분자를 나타낸다. 본 발명의 실시예에 사용된 폴리머는 생체 적합성 및 생분해성이다. 생체 적합성 및 생분해성 폴리머는 천연의 또는 합성의 것일 수 있다. 천연 폴리머는 폴리뉴클레오타이드, 자연 발생 단백질, 재조합 단백질, 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 피브로인, 폴리아사파르테이트, 폴리글루타메이트, 폴리류신, 류신-글루타메이트 코-폴리머와 같은 폴리펩티드; 및 셀룰로스 알기네이트와 같은 다당류, 텍스트란 및 텍스트란 히드로겔 폴리머, 아밀로스, 이눌린, 펙틴 및 구아 검, 키토산, 키틴, 헤파린, 및 히알루론산을 포함한다. 합성의 생체 적합성 또는 생분해성 폴리머는 폴리젓산 (PLA), 폴리글리콜산 (PGA), 폴리락트-폴리글리콜 코폴리머 (PLGA), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA), PLGA-에틸렌 옥사이드 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜 1000에 에스테르화된 PLGA-알파-토코페릴 숙시네이트 (PLGA-TGPS), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카르복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), 폴리에틸렌 글리콜-폴리(젓산) 코폴리머 (PEG-PLA), 폴리-ε-카프로락톤 (PCL), 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트 (PAC), 폴리(에틸)시아노아크릴레이트 (PEC), 폴리이소부틸 시아노아크릴레이트, 폴리-N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드 (폴리(HPMA)), 폴리-β-R-히드록시 부티레이트 (PHB), 폴리-β-R-히드록시 알카노에이트 (PHA), 폴리-β-R-말산, 인지질-콜레스테롤 폴리머, 2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린/폴리에틸렌글리콜-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DOPC/PEG-DSPE)/콜레스테롤, 에틸 셀룰로스, 시클로덱스트린 (CD)-기반 폴리로탁산 및 폴리슈도로탁산, 폴리부틸렌 숙시네이트 (PBS), 폴리오르토에스테르, 폴리오르토에스테르-폴리아미딘 코폴리머, 폴리오르토에스테르-디아민 코폴리머, 분해의 잠재성 산 톱 제어 속도(rate control)를 포함하는 폴리오르토에스테르, 및 그 중에서도 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(부틸렌 테레프탈레이트) 코폴리머를 포함한다.
- [0048] 에틸 셀룰로스 (EC)는 잘 알려져 있고 제약 및 식품 과학에서 사용된, 쉽게 이용 가능한 생체 적합 물질이다. 그것은 글루코스 수산기 중 일부가 에틸 에테르로 대체되는 셀룰로스 유도체이다. Martinac et al., J. Microencapsulation, 22(5): 549-561 (2005) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 되고, 이것들은 미소구체의 제조 시 생체 적합성 폴리머로서 에틸 셀룰로스를 사용하는 방법을 설명한다. 또한 US 4,210,529 (1980) 및 에틸 셀룰로스의 상세한 설명 및 에틸 셀룰로스의 유도체를 만드는 방법에 대한 참고문헌을 참고하면 된다.
- [0049] 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA)는 또한 조직 공학 및 약학적 전달 시스템에 사용되는, 미국 식품 의약청 (Food and Drug Administration: FDA) 승인된 잘 알려진 생체 적합성 및 생분해성 폴리머이다. PLGA는 글리콜산 및 젓산 모노머를 포함하는 폴리에스테르이다. PLGA의 합성 및 PLGA 나노입자의 제조의 설명을 위해, Astete and Sabliov, Biomater. Sci. Polym. Ed., 17(3): 247-89 (2006) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 된다.
- [0050] 폴리-ε-카프로락톤 (PCL)은 약물 전달 장치로서 사람에서 사용을 위해 FDA에 의해 승인된 또 다른 생체 적합성 및 생분해성 폴리머이다. PCL는 ε-카프로락톤의 폴리에스테르이며, 이것은 신체에서 급속히 가수분해되어 비독성 또는 낮은 독성 히드록시카르복시산을 형성한다. PCL의 제조의 설명을 위해, Labet and Thielemans, Chemical Society Reviews 38: 3484-3504 (2009) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 된다. 전달 시스템으로서 PCL-기반 미소구체 및 나노구체의 제조 및 사용의 설명을 위해, Sinha et al., Int. J. Pharm., 278(1): 1-23 (2004) 및 그 안의 참고문헌을 참고하면 된다.
- [0051] 폴리오르토에스테르 (POE)는 약물 전달을 위해 설계된 생체 적합성 폴리머이다. 그것은 일반적으로 케텐 아세탈,

바람직하게는, 원형 디케텐 아세탈의 폴리머, 예를 들어, 3,9-디메틸렌-2,4,8,10-테트라옥사 스피로[5.5]-운데칸이며, 이것은 글리콜 응축을 통해 폴리머화되어 오르토에스테르 결합을 형성한다. 폴리오르토에스테르 합성 및 다양한 타입의 설명은 예를 들어, US 4,304,767에서 발견될 수 있다. 폴리오르토에스테르는 다양한 소수성 디올 및 폴리올을 교환해넣거나 교환해냄으로써, 예를 들어, 헥산트리올을 데칸트리올로 대체함으로써; 뿐만 아니라 잠재성 산, 예를 들어, 옥탄디오산 등을 백본에 추가하여 pH 민감도를 증가시킴으로써 약물 방출 프로파일 및 분해 속도를 제어하기 위해 변형될 수 있다. 폴리오르토에스테르로의 다른 변형은 기능성을 증가시키기 위한 아민의 통합을 포함한다. 폴리오르토에스테르의 형성, 설명, 및 사용은 US 5,968,543; US 4,764,364; Heller and Barr, Biomacromolecules, 5(5): 1625-32 (2004); 및 Heller, Adv. Drug. Deliv. Rev., 57: 2053-62 (2005)에서 설명된다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같이, 구절 "분무-건조"는 분무-건조기를 사용하여 슬러리 또는 현탁액으로부터 미크론 크기의 입자를 포함하는 건성 분말을 생산하는 방법을 의미한다. 분무 건조는 현탁액 또는 슬러리를 제어된 방울 크기 분무로 분산시키기 위해 분무기 또는 분무 노즐을 이용한다. 10 내지 500 μm 의 방울 크기는 분무 건조에 의해 발생할 수 있다. 용매(물 또는 유기 용매)가 건조됨에 따라, 단백질 물질은 미크론 크기의 입자로 건조되며, 분말-유사 물질을 형성하거나; 또는 단백질-폴리머 현탁액의 경우에는, 건조 중에, 폴리머는 단백질 로드(load) 주위의 셸(shell)을 경화시킨다.

[0053] 본 발명의 미립자는 폴리머 코어텍스 또는 코팅으로 둘러싸인 단백질 코어를 포함한다. 간략히 말하면, 미소화된 단백질 입자가 형성되며, 이것은 폴리머 용액(용매에 용해된 폴리머)에서 분산되어 단백질-폴리머 현탁액을 형성한다. 단백질-폴리머 현탁액은 미소화된 (원자화된) 방울로 분산되고, 용매는 미립자를 미립자를 형성하기 위해 떨어진다.

[0054] 한 구체예에서, 미소화된 단백질 입자는 단백질의 용액을 만든 다음 단백질을 포함하는 건성 분말을 형성하기 위해 상기 단백질 용액이 분산 및 열을 받음으로써 형성된다. 미소화된 단백질 입자를 형성하기 위한 한 방법은 분무 건조에 의한 것이다. 한 구체예에서, 단백질은 치료적 단백질의 약학적 제형을 만들기 위해 버퍼, 안정화제 및 다른 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하도록 조제되는 치료적 단백질이다. 예시적인 약학적 제형은 US 7,365,165, US 7,572,893, US 7,608,261, US 7,655,758, US 7,807,164, US 2010-0279933, US 2011-0171241, 및 PCT/US11/54856에서 설명된다.

[0055] 본 발명의 약학적 제형 내에 함유된 치료적 단백질의 양은 제형의 원하는 특이적 성질, 뿐만 아니라 제형이 사용되기 위한 상황 및 목적에 따라 다를 수도 있다. 특정 구체예들에서, 약학적 제형은 약 1 mg/mL 내지 약 500 mg/mL의 단백질; 약 5 mg/mL 내지 약 400 mg/mL의 단백질; 약 5 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 단백질; 약 25 mg/mL 내지 약 180 mg/mL의 단백질; 약 25 mg/mL 내지 약 150 mg/mL의 단백질; 또는 약 50 mg/mL 내지 약 180 mg/mL의 단백질을 함유할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 약 1 mg/mL; 약 2 mg/mL; 약 5 mg/mL; 약 10 mg/mL; 약 15 mg/mL; 약 20 mg/mL; 약 25 mg/mL; 약 30 mg/mL; 약 35 mg/mL; 약 40 mg/mL; 약 45 mg/mL; 약 50 mg/mL; 약 55 mg/mL; 약 60 mg/mL; 약 65 mg/mL; 약 70 mg/mL; 약 75 mg/mL; 약 80 mg/mL; 약 85 mg/mL; 약 86 mg/mL; 약 87 mg/mL; 약 88 mg/mL; 약 89 mg/mL; 약 90 mg/mL; 약 95 mg/mL; 약 100 mg/mL; 약 105 mg/mL; 약 110 mg/mL; 약 115 mg/mL; 약 120 mg/mL; 약 125 mg/mL; 약 130 mg/mL; 약 131 mg/mL; 약 132 mg/mL; 약 133 mg/mL; 약 134 mg/mL; 약 135 mg/mL; 약 140 mg/mL; 약 145 mg/mL; 약 150 mg/mL; 약 155 mg/mL; 약 160 mg/mL; 약 165 mg/mL; 약 170 mg/mL; 약 175 mg/mL; 약 180 mg/mL; 약 185 mg/mL; 약 190 mg/mL; 약 195 mg/mL; 약 200 mg/mL; 약 205 mg/mL; 약 210 mg/mL; 약 215 mg/mL; 약 220 mg/mL; 약 225 mg/mL; 약 230 mg/mL; 약 235 mg/mL; 약 240 mg/mL; 약 245 mg/mL; 약 250 mg/mL; 약 255 mg/mL; 약 260 mg/mL; 약 265 mg/mL; 약 270 mg/mL; 약 275 mg/mL; 약 280 mg/mL; 약 285 mg/mL; 약 290 mg/mL; 약 295 mg/mL; 약 300 mg/mL; 또는 약 300 mg/mL의 치료적 단백질을 포함할 수도 있다.

[0056] 본 발명의 약학적 제형은 하나 이상의 부형제를 포함한다. 용어 "부형제"는, 본원에 사용된 바와 같이, 원하는 밀도, 점도 또는 안정화 효과를 제공하기 위해 제형에 추가된 어떤 비-치료적 약제도 의미한다.

[0057] 본 발명의 약학적 제형은 또한 하나 이상의 탄수화물, 예를 들어, 하나 이상의 당을 포함할 수도 있다. 당은 환원당(reducing sugar) 또는 비-환원당일 수도 있다. "환원당"은, 예를 들어, 케톤기 또는 알데히드기를 가진 당을 포함하고 반응성 헤미아세탈기를 함유하며, 이것은 당이 환원제로서 작용하는 것을 허용한다. 환원당의 특정 예는 프럭토스, 글루코스, 글리세르알데히드, 락토스, 아라비노스, 만노스, 자일로스, 리보스, 람노스, 갈락토스 및 말토스를 포함한다. 비-환원당은 마이야르 반응(Maillard reaction)을 개시하기 위해 아세탈이며 아미노산 또는 폴리펩티드와 실질적으로 반응하지 않는 아노머 탄소를 포함할 수 있다. 비-환원당의 특정 예는 수크

로스, 트레할로스, 소르보스, 수크랄로스, 멜레지토스 및 라피노스를 포함한다. 당 산(sugar acid)은, 예를 들어, 당산, 글루콘산염 및 다른 폴리히드록시 당 및 이들의 염을 포함한다.

[0058] 본 발명의 약학적 제형 내에 함유된 당의 양은 특정 상황 및 제형이 사용되기 위해 의도된 목적에 따라 다를 것이다. 특정 구체예들에서, 제형은 약 0.1% 내지 약 20% 당; 약 0.5% 내지 약 20% 당; 약 1% 내지 약 20% 당; 약 2% 내지 약 15% 당; 약 3% 내지 약 10% 당; 약 4% 내지 약 10% 당; 또는 약 5% 내지 약 10% 당을 함유할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 제형은 약 0.5%; 약 1.0%; 약 1.5%; 약 2.0%; 약 2.5%; 약 3.0%; 약 3.5%; 약 4.0%; 약 4.5%; 약 5.0%; 약 5.5%; 약 6.0%; 6.5%; 약 7.0%; 약 7.5%; 약 8.0%; 약 8.5%; 약 9.0%; 약 9.5%; 약 10.0%; 약 10.5%; 약 11.0%; 약 11.5%; 약 12.0%; 약 12.5%; 약 13.0%; 약 13.5%; 약 14.0%; 약 14.5%; 약 15.0%; 약 15.5%; 약 16.0%; 16.5%; 약 17.0%; 약 17.5%; 약 18.0%; 약 18.5%; 약 19.0%; 약 19.5%; 또는 약 20.0% 당 (예를 들어, 수크로스)을 포함할 수도 있다.

[0059] 본 발명의 약학적 제형은 또한 하나 이상의 계면활성제를 포함할 수도 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "계면활성제"는 용해되는 유동체의 표면 장력을 감소시키고 및/또는 오일 및 물 사이의 계면 장력을 감소시키는 물질을 의미한다. 계면활성제는 이온성 또는 비-이온성일 수 있다. 본 발명의 제형에 포함될 수 있는 예시적인 비-이온성 계면활성제는, 예를 들어, 알킬 폴리(에틸렌 옥사이드), 알킬 폴리글루코사이드 (예를 들어, 옥틸 글루코사이드 및 데실 말토사이드), 세틸 알콜 및 올레일 알콜과 같은 지방 알콜, 코카미드 MEA, 코카미드 DEA, 및 코카미드 TEA를 포함한다. 본 발명의 제형에 포함될 수 있는 특정 비-이온성 계면활성제는, 예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 28, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 및 폴리소르베이트 85와 같은 폴리소르베이트; 폴록사머 188, 폴록사머 407과 같은 폴록사머; 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜; 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 폴리소르베이트 20은 TWEEN 20, 소르비탄 일라우린산염 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 일라우린산염으로도 알려져 있다.

[0060] 본 발명의 약학적 제형 내에 함유된 계면활성제의 양은 제형의 원하는 특이적 성질, 뿐만 아니라 제형이 사용되기 위해 의도된 목적에 따라 다를 수도 있다. 특정 구체예들에서, 제형은 약 0.05% 내지 약 5% 계면활성제; 또는 약 0.1% 내지 약 0.2% 계면활성제를 함유할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 약 0.05%; 약 0.06%; 약 0.07%; 약 0.08%; 약 0.09%; 약 0.10%; 약 0.11%; 약 0.12%; 약 0.13%; 약 0.14%; 약 0.15%; 약 0.16%; 약 0.17%; 약 0.18%; 약 0.19%; 약 0.20%; 약 0.21%; 약 0.22%; 약 0.23%; 약 0.24%; 약 0.25%; 약 0.26%; 약 0.27%; 약 0.28%; 약 0.29%; 또는 약 0.30% 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 20)를 포함할 수도 있다.

[0061] 본 발명의 약학적 제형은 또한 하나 이상의 버퍼를 포함할 수도 있다. 일부 구체예들에서, 버퍼는 pH 5.5-7.4의 범위와 완전히 또는 부분적으로 겹치는 완충 범위를 갖는다. 한 구체예에서, 버퍼는 약 6.0 ± 0.5 의 pKa를 갖는다. 특정 구체예들에서, 버퍼는 인산염 버퍼를 포함한다. 특정 구체예들에서, 인산염은 $5 \text{ mM} \pm 0.75 \text{ mM}$ 내지 $15 \text{ mM} \pm 2.25 \text{ mM}$; $6 \text{ mM} \pm 0.9 \text{ mM}$ 내지 $14 \text{ mM} \pm 2.1 \text{ mM}$; $7 \text{ mM} \pm 1.05 \text{ mM}$ 내지 $13 \text{ mM} \pm 1.95 \text{ mM}$; $8 \text{ mM} \pm 1.2 \text{ mM}$ 내지 $12 \text{ mM} \pm 1.8 \text{ mM}$; $9 \text{ mM} \pm 1.35 \text{ mM}$ 내지 $11 \text{ mM} \pm 1.65 \text{ mM}$; $10 \text{ mM} \pm 1.5 \text{ mM}$; 또는 약 10 mM의 농도로 존재한다. 특정 구체예들에서, 버퍼 시스템은 6.0 ± 0.5 의 pH에서, $10 \text{ mM} \pm 1.5 \text{ mM}$ 로 히스티딘을 포함한다.

[0062] 본 발명의 약학적 제형은 약 5.0 내지 약 8.0의 pH를 가질 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 약 5.0; 약 5.2; 약 5.4; 약 5.6; 약 5.8; 약 6.0; 약 6.2; 약 6.4; 약 6.6; 약 6.8; 약 7.0; 약 7.2; 약 7.4; 약 7.6; 약 7.8; 또는 약 8.0의 pH를 가질 수도 있다.

[0063] 한 특정 구체예에서, 치료적 단백질은 VEGF Trap 단백질이다. 미소화된 VEGF Trap 단백질 입자의 조제를 위한 약학적 제형은 약 10 mg/mL 내지 약 100 mg/mL VEGF Trap 단백질, 약 10 mg/mL, 약 15 mg/mL, 약 20 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 55 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 65 mg/mL, 약 70 mg/mL, 약 75 mg/mL, 약 80 mg/mL, 약 85 mg/mL, 약 90 mg/mL, 약 95 mg/mL, 또는 약 100 mg/mL VEGF Trap 단백질을 함유할 수도 있다. 용액은 약 5 mM 내지 약 50 mM의 하나 이상의 버퍼를 함유할 수도 있다. 한 구체예에서, 버퍼는 약 6 ± 0.5 의 pH에서 약 10 mM 인산염이다. 용액은 또한 약 1% 내지 약 10%의 농도에서 수크로스를 함유할 수도 있다. 한 구체예에서, 용액은 약 2 중량%에서 수크로스를 함유한다.

[0064] 일부 구체예들에서, 치료적 단백질 용액은 10 mM 인산염, pH 6.2, 2% 수크로스, 및 임의로 0.1% 폴리소르베이트 중 약 25 mg/mL 또는 약 50 mg/mL로 VEGF Trap 단백질을 함유한다.

[0065] 치료적 단백질 제형은 이후에 분산 및 건조를 받아서 미소화된 단백질 입자를 형성한다. 미소화된 단백질 입자를 만드는 한 방법은 단백질 용액이 분무 건조를 받게 하는 것이다. 분무 건조는 일반적으로 업계에 알려져 있

고 예를 들어, 예를 들어, BUCHI Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH)와 같은 장비에서 실행될 수도 있다. 한 특정 구체예에서, 단백질 용액(예를 들어, 하지만 제한 없이 상기 설명된 VEGF 제형 중 어느 하나)은 약 2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 또는 약 7 mL/분의 속도로 분무 건조기로 주입되었다. 분무 건조기의 유입 온도는 예를 들어, 약 130°C와 같이, 물의 끓는점보다 높은 온도로 설정된다. 물의 끓는점보다 낮고 주위 온도보다 높은 유출 온도, 예를 들어, 55°C. 한 특정 구체예에서, 단백질 용액(예를 들어, VEGF Trap 용액 또는 IgG 용액)은 약 7 mL/분으로 BUCHI Mini Spray B-290으로 주입되었으며, 유입 온도는 약 130°C이고 유출 온도는 약 55°C이고, 아스피레이터(aspirator)는 33 m³/h로 설정되고 분무 가스는 530 L/h이다.

[0066] 결과로 얻은 미소화된 단백질 입자는 크기가 지름 약 1 μm 내지 약 100 μm의 범위에 있으며, 단백질 및 부형제의 특정 제형 및 농도에 의존적이다. 일부 구체예들에서, 미소화된 단백질 입자는 약 1 μm 내지 약 100 μm, 약 1 μm 내지 약 40 μm, 약 2 μm 내지 약 15 μm, 약 2.5 μm 내지 약 13 μm, 약 3 μm 내지 약 10 μm, 약 5 μm, 약 6 μm, 약 7 μm, 약 8 μm, 약 9 μm, 약 10 μm, 약 11 μm, 또는 약 12 μm의 지름을 갖는다.

[0067] 이후 미소화된 단백질 입자는 생체 적합성 및 생분해성 폴리머로 코팅된다. 이는 폴리머 용액에서 미소화된 단백질 입자를 현탁함으로써 달성될 수 있다. 폴리머 용액은 본질적으로 용매에 용해된 폴리머이다. 예를 들어, 생체 적합성 및 생분해성 폴리머는 그 중에서도 염화메틸렌, 테트라히드로푸란, 아세트산염 에틸, 또는 어떤 다른 유용한 용매에도 용해될 수 있다. 아세트산염 에틸은 안전한 용매로서 널리 알려져 있으며 종종 약물, 임플란트(implant) 및 식품의 제조에 사용된다.

[0068] 일부 구체예들에서, 폴리머는 에틸 셀룰로스 ("EC"), 폴리(젯산) ("PLA"), 폴리오르토에스테르 ("POE"), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 ("PLGA"), 또는 폴리-ε-카프로락톤 ("PCL")일 수 있다. 폴리머는 약 10 mg/mL 내지 약 300 mg/mL, 약 15 mg/mL 내지 약 295 mg/mL, 약 20 mg/mL 내지 약 290 mg/mL, 약 25 mg/mL 내지 약 280 mg/mL, 약 30 mg/mL 내지 약 270 mg/mL, 약 35 mg/mL 내지 약 265 mg/mL, 약 40 mg/mL 내지 약 260 mg/mL, 약 45 mg/mL 내지 약 260 mg/mL, 약 50 mg/mL 내지 약 255 mg/mL, 약 55 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 약 20 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 75 mg/mL, 약 100 mg/mL, 약 125 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 175 mg/mL, 약 200 mg/mL, 약 225 mg/mL, 또는 약 250 mg/mL의 농도로 용매(예를 들어, 아세트산염 에틸)에 용해될 수 있다.

[0069] 미소화된 단백질 입자는 약 10 mg/mL 내지 약 100 mg/mL, 약 15 mg/mL 내지 약 95 mg/mL, 약 20 mg/mL 내지 약 90 mg/mL, 약 25 mg/mL 내지 약 85 mg/mL, 약 30 mg/mL 내지 약 80 mg/mL, 약 35 mg/mL 내지 약 75 mg/mL, 약 40 mg/mL 내지 약 70 mg/mL, 약 45 mg/mL 내지 약 65 mg/mL, 약 50 mg/mL 내지 약 60 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 또는 약 50 mg/mL로 폴리머 용액에 추가된다. 입자가 혼합되어 슬러리 또는 현탁액을 형성하며, 이것은 이후에 분산 및 건조를 받아서 폴리머 코팅된 단백질 입자(즉, 미립자)를 형성한다.

[0070] 한 구체예에서, 단백질 입자-폴리머 용액 현탁액은 분무 건조를 받으며, 이것은 미소화된 단백질 입자를 제조하는 방법과 유사하지만, 유기 용매 또는 폴리머의 점화로부터 보호하기 위해 유입 온도를 감소시키는 방식으로 수행된다. 간략히 말하면, 단백질 입자-폴리머 용액 현탁액은 약 5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 또는 약 12.5 mL/분으로 분무 건조기로 주입된다. 현탁액은 각각 530 L/h 및 35 m³/h (mm)의 아스피레이터 공기 및 분무 가스 유속으로 12.5 mL/분으로 분무 건조기로 주입되었다. 유입 온도는 90°로 설정되었고 유출 온도는 약 54°C로 설정되었다. 분무 건조기의 유입 온도는 예를 들어, 약 90°C와 같이, 용매의 인화점보다 높은 온도로 설정된다. 예를 들어, 약 54°C와 같이, 흡수 온도보다 낮거나 주위 온도보다 높은 온도의 유출 온도. 한 특정 구체예에서, 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL 폴리머/아세트산염 에틸 용액 중에 약 50 mg/mL의 단백질 입자(예를 들어, VEGF Trap)를 함유하는 현탁액은 약 12.5 mL/분으로 BIJCHI Mini Spray Dryer B-290으로 주입되며, 유입 온도는 약 90°C이고 유출 온도는 약 54°C이며, 아스피레이터는 약 35 m³/h로 설정되고 분무 가스는 약 530 L/h로 설정된다.

[0071] 결과로 얻은 미립자는, 폴리머 코어텍스 내에 단백질 입자를 함유하며, 지름의 범위는 약 2 μm 내지 약 70 μm, 약 5 μm 내지 약 65 μm, 약 10 μm 내지 약 60 μm, 약 15 μm 내지 약 55 μm, 약 20 μm 내지 약 50 μm, 약 15 μm, 약 20 μm, 약 25 μm, 또는 약 30 μm이다. 크기 변화는 많은 부분에서 폴리머 코어텍스의 두께를 반영하지만, 단백질 코어의 지름은 크기 변화에 어느 정도 기여할 수 있다. 시작 농도의 폴리머 용액, 및/또는 폴리머 자체의 제조는 미립자의 지름을 제어할 수 있다. 예를 들어, 50 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는 중앙 크기가 약 15 μm 내지 20 μm인 반면에, 250 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는

중양 크기가 약 30 μm 이었다.

[0072] 본 발명의 미립자는 단백질 치료제의 지속적 방출 또는 지속적인 방출에 유용하다. 예를 들어, VEGF Trap 미립자가 암 또는 다른 질병을 치료하기 위해, 예를 들어, 혈관 안구 질환의 치료를 위해 유리체에서 VEGF Trap 치료적 단백질의 지속적 방출, 또는 VEGF Trap의 지속적 방출을 위한 피하 이식에 있어서 유용한 것으로 나타난다.

[0073] 본 발명의 미립자는 약 37°C의 생리학적 수성 환경에서 적어도 60일로 연장된 기간 동안 비교적 일정한 속도로 단백질을 방출한다. 일반적으로, 더 높은 농도의 폴리머(예를 들어, 250 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 비교적 선형의 단백질 방출 프로파일을 나타내는 경향이 있는 반면에; 더 낮은 농도의 폴리머(예를 들어, 50 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 초기 과열에 이어서 지연된 과열 방출의 시작을 나타내는 경향이 있다. 게다가, 더 높은 농도의 폴리머로 형성된 미립자는 더 낮은 농도의 입자로 형성된 것들보다 더 느린 속도의 단백질 방출을 나타냈다. 시간이 흐름에 따라 미립자로부터 방출된 단백질의 속성은 시작 단백질 물질의 속성과 일치하였다. 단백질 분해는 거의 내지 전혀 일어나지 않았다.

[0074] 실시예

[0075] 당업자들에게 본 발명의 방법 및 조성물을 만들고 사용하는 방법의 완벽한 개시 및 설명을 제공하기 위해 다음 실시예가 제안되며 발명자들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다. 노력은 사용된 숫자(예를 들어, 양, 크기, 등)에 대한 정확도를 보장하기 위해 이루어졌지만 일부 실험적 오차 및 편차가 설명되어야 한다.

[0076] 하기 실시예에서, VEGF-Trap 단백질 ("VGT")은, 아미노산 서열 SEQ ID NO: 1을 포함하는 폴리펩티드의 다이머이며, 전형적인 수용체-Fc-융합 단백질의 역할을 한다.

[0077] 실시예 1 : 미소화된 단백질

[0078] 10 mM 인산염, 2% 슈크로스, pH 6.2 중에 25 mg/mL VEGF Trap 단백질 ("VGT"), 25 mg/mL VGT 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80, 및 50 mg/mL VGT를 함유하는 용액을 분무 건조 초미 분쇄기(micronizer) (BUCHI Mini Spray Dryer B-290, Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH)에서 각각 독립적으로 원자화하여 VEGF Trap을 함유하는 방울을 형성하였다. 열을 적용하여 방울로부터 물을 증발시켰으며, VEGF Trap을 함유하는 분말을 발생시켰다. 유입 온도를 130°C로 설정하였고 유출 온도를 약 55°C로 설정하였다. 아스피레이터를 33 m³/h로 설정하였고 분무 가스를 530 L/h로 설정하였다. VGT 용액을 약 7 mL/분으로 주입하였다. 결과의 VGT 입자의 크기를 미세 유동 영상(MFI) 및 동적 광산란(DLS)에 의해 측정하였다. 도 1은 25 mg/mL VGT, 25 mg/mL VGT 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80, 및 50 mg/mL VGT 농도의 각각으로부터 유래된 VGT 입자에 대하여, MFI에 의해 결정된 입자 크기 분포를 기술한다. 모든 농도에 대하여, VGT 입자의 상당 원형 지름 (ECD)은 약 1 μm 내지 약 39 μm 의 범위에 있으며, 입자의 대부분은 크기가 약 2 μm 내지 약 14 μm 의 범위에 있다. 25 mg/mL VGT 용액에 대하여, 입자들은 약 2.5 μm 내지 약 8.8 μm 의 범위에 모여있으며, 약 6 μm 의 최빈값(mode)를 갖는다. 25 mg/mL VGT 플러스 0.1% 폴리소르베이트 80 용액에 대하여, 입자는 약 2.5 μm 내지 약 9.7 μm 의 범위에 모여있으며, 약 6 μm 의 최빈값을 갖는다. 50 mg/mL VGT 용액에 대하여, 입자는 약 2.7 μm 내지 약 12.8 μm 의 범위에 모여있으며, 약 7 μm 의 최빈값을 갖는다. MFI 및 DLS 방법 둘 다에 의해 결정된, 각각의 제형에 대한 중앙 지름은 표 1에서 설명된다.

[0079] VGT 입자를 주사용수에서 재구성하였고 단백질 순도를 결정하기 위해 크기 배제, 즉, 크기 배제-고성능 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)를 통해 검사하였다. 시작 물질에 비해 초미 분쇄 이후 순도의 어떤 변화도 언급되지 않았다(표 3 참조).

[0080] 표 1: MFI 및 DLS에 의해 결정된 중앙 단백질 입자 크기(μm)

제형	MFI (μm)에 의한 중앙 크기	DLS (μm)에 의한 중앙 크기
50mg/mL VEGF Trap	7	7.6
25mg/mL VEGF Trap	6	5.9
25mg/mL VEGF Trap, 0.1% 폴리소르베이트80	6	7.1

[0081]

[0082] **실시예 2: 유기 폴리머 용액 중의 미소화된 단백질 현탁액**

[0083] 미립자의 폴리머 코어텍스의 제조에 있어서 다양한 폴리머가 사용되었거나 사용을 위해 고려된다. 상기 폴리머는 그 중에서도 에틸 셀룰로스 ("EC"), 폴리오르토에스테르 ("POE"), 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드("PLGA"), 및 폴리-ε-카프로락톤 ("PCL")을 포함한다.

[0084] 에틸 셀룰로스 코팅

[0085] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 50 mg/mL 에틸 셀룰로스 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-EC 현탁액"으로 지정하였다.

[0086] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 100 mg/mL 에틸 셀룰로스 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-100-EC 현탁액"으로 지정하였다.

[0087] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 250 mg/mL 에틸 셀룰로스 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-EC 현탁액"으로 지정하였다.

[0088] 폴리오르토에스테르 코팅

[0089] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 약 5% 잠재성 산을 함유하는 50 mg/mL 폴리오르토에스테르 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-POE 현탁액"으로 지정하였다.

[0090] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 약 5% 잠재성 산을 함유하는 50 mg/mL 폴리오르토에스테르 용액에서 약 250 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-POE 현탁액"으로 지정하였다.

[0091] 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 코팅

[0092] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 50 mg/mL PLGA 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-PLGA 현탁액"으로 지정하였다.

[0093] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 200 mg/mL PLGA 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-200-PLGA 현탁액"으로 지정하였다.

[0094] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 250 mg/mL PLGA 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-PLGA 현탁액"으로 지정하였다.

[0095] 폴리-ε-카프로락톤 코팅

[0096] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 50 mg/mL PCL 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-50-PCL 현탁액"으로 지정하였다.

[0097] 미소화된 VEGF Trap 입자를 아세트산염 에틸 중의 250 mg/mL PCL 용액에서 약 50 mg/mL VGT의 농도로 현탁하였으며; 여기에서 "VGT-250-PCL 현탁액"으로 지정하였다.

[0098] PCL는 낮은 Tg를 가지고 있으며 하기 설명된 바와 같이 열 건조에 적합하지 않을 수도 있지만, 예를 들어, 폴리비닐 알콜(PVA)이 들어있는 수조에서의 용매 추출에 사용될 수 있다.

[0099] **실시예 3: 단백질-폴리머 미세 방울의 분산 및 용매 제거**

[0100] 각 VGT 폴리머 현탁액은, 실시예 2(상기)에 따라 만들어졌으며, BUCHI Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, CH)을 사용하여 분무 건조되었다. 간략히 말하면, 각 현탁액은 원자화되어 미세방울을 형성하며, 이것들은 이후에 열 건조되어 용매를 제거하고 폴리머-코팅된 단백질 미립자를 형성한다. 현탁액을 분무 건조기로 12.5 mL/분으로 주입하였으며, 아스피레이터 공기 및 분무 건조 유속은 각각 약 530 L/h 및 35 m³/h였다. 유입 온도를 90°로 설정하였고 유출 온도를 약 54℃로 설정하였다.

[0101] **실시예 4: 단백질-폴리머 미립자의 특성**

[0102] 예시된 공정에 따라 제조된, 분무 건조된 폴리머 코팅된 단백질 입자는 약 2.5 μm 내지 약 65 μm의 범위의 상당 원형 지름을 갖는 복수의 미립자를 발생시킨다 (도 2). 크기 변화는 많은 부분에서 폴리머 코어텍스의 두께를 반영하지만, 단백질 코어의 지름은 크기 변화에 어느 정도 기여할 수 있다. 미립자의 지름은 폴리머 용액의 시작 농도와 연관성이 있다 (표 2, 도 2). 50 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는 중앙 크기가 약 17 μm ± 2.8 μm이었다. 250 mg/mL 폴리머를 사용하여 제조된 상기 미립자는 중앙 크기가 약 29 μm이었다.

실시예 5: 분무 건조 후 단백질 안정성

VEGF-Trap 단백질의 안정성을 정량적 크기 배제 크로마토그래피 (SE-UPLC)를 사용하여 평가하였으며, 이는 온전한 모노머에 비해 더 작은 분해 생성물 및 더 큰 응축 생성물의 정량을 허용한다. 결과는 표 3에서 설명된다. 근본적으로, 단백질은 분무 건조 및 분무 코팅 공정을 통해 안정성을 유지하였다.

단백질 대 폴리머의 평균 중량비를 또한 제조된 미립자에 대하여 결정하였다. 다양한 폴리머 및 폴리머 농도로 제조된 미립자의 컬렉션을 추출하였고 정량적 역상 크로마토그래피(RP-HPLC)를 받게 하였다. 결과는 표 3에서 제공된다. 데이터는 더 높은 시작 농도의 폴리머가 미립자에서 더 두꺼운 폴리머 코어텍스를 수득한다는 이론을 지지하는 것으로 설명될 수도 있다.

표 2: 상당 원형 지름 값

물질	범위 (μm)	중앙값 (μm)	최빈값 (μm)
VEGF-Trap ("VGT") (50 mg/mL)	2.5 - 29.4	10 - 12	8.3
VGT (50 mg/mL) + POE (50 mg/mL)	2.5 - 64.5	15	9.4
VGT (50 mg/mL) + POE (250 mg/mL)	2.5 - 49.4	29	28.5
VGT (50 mg/mL) + EC (50 mg/mL)	2.5 - 49.6	19	16.5

표 3: 단백질 안정성 및 로딩

물질	VGT 시작 물질	코팅된 폴리머로부터 추출된 VGT ¹	
	% 고유	% 고유 ²	중량% VGT/ 폴리머 ³
VGT 시작 물질	97.7	-	-
재구성된 VGT	97.6	-	-
VGT (50 mg/mL) + POE (50 mg/mL)	-	96.3	14.6
VGT (50 mg/mL) + POE (250 mg/mL)	-	97.7	1.8
VGT (50 mg/mL) + EC (50 mg/mL)	-	97.1	6.1

¹ 코팅되지 않은 VEGF Trap을 제거하기 위한 1시간 재구성 후 추출된 VEGF Trap에 기초함

² SE-UPLC에 의해 고유한 퍼센트의 평균 (n=4).

³ RP-HPLC에 의해 VGT의 중량 로딩 대 폴리머의 중량 로딩에 대한 퍼센트 중량의 평균 (n=4).

실시예 6: 미립자로부터의 단백질 방출

미립자로부터의 단백질 방출을 버퍼(10 mM 인산염, 0.03% 폴리소르베이트 20, pH 7.0)에 다수의 배치의 미립자를 현탁하고 37°C에서 배양되는 동안 시간이 흐름에 따라 용액으로 방출된 단백질의 양 및 속성을 측정함으로써 결정하였다. 1-2주 간격으로, 미립자를 부드러운 원심분리에 의해 펠릿화하였고 방출된 단백질을 함유하는 상층액의 80%를 이후의 분석을 위해 수거하였다.

등량의 신선한 버퍼를 대체하였고 미립자를 부드러운 보텍싱(vortexing)에 의해 재현탁하였고 37°C 배양 챔버에 되돌려 놓았다. 현탁액 중의 단백질 양 및 속성을 크기 배제 크로마토그래피에 의해 평가하였다.

일반적으로, 더 높은 농도의 폴리머 (예를 들어, 250 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 비교적 선형의 단백질 방출 프로파일을 나타내는 경향이 있는 반면에; 더 낮은 농도의 폴리머 (예를 들어, 50 mg/mL)로 제조된 상기 미립자는 초기 파열에 이어서 지연된 파열 방출의 시작을 나타내는 경향이 있다. 최대 약 60일 동안, 안정하게 유지되는, 단백질의 지속적인 방출을 나타내는 데이터는 도 3에서 기술된다 (방출 데이터). 표 4는 방출 데이터의 선형 비율을 요약한다.

표 4: 단백질 방출 동역학

물질	VEGF Trap 단백질 방출 (mg VGT/주)
VGT (50 mg/mL) + POE (50 mg/mL)	0.14 ± 0.16
VGT (50 mg/mL) + POE (250 mg/mL)	0.06 ± 0.02
VGT (50 mg/mL) + EC (50 mg/mL)	0.031 ± 0.02

실시예 7: 입자 크기는 폴리머 농도 및 분무 가스 흐름에 의해 제조될 수 있다

입자 크기 분포를 폴리머 농도 및 입자화 분무 건조 유속에 의해 제어하였다. 증가된 폴리머 농도는 분포를 더 큰 입자 쪽으로 이동시켰다 (45 mm 분무 가스 유속에서 200 mg/mL PLGA 대 45 mm 분무 가스 유속에서 100 mg/mL PLGA; 표 5 참조). 유사하게, 더 낮은 원자화 분무 가스 유속은 더 큰 방울, 및 따라서 더 큰 입자를 발생시켰다 (25 mm 분무 가스 유속에서 100 mg/mL PLGA 대 45 mm 분무 가스 유속에서 100 mg/mL PLGA; 표 5 참조).

표 5: 입자 크기(모든 측정값은 대략적임)

[PLGA] (mg/mL)	가스 유속 (m ³ /h)	입자 크기 범위 (미크론)	입자 크기의 최빈값 (미크론)	15 미크론 입자 크기를 갖는 입자의 퍼센트 총 부피
단백질 단독	NA	2.5-25	3.5	1.5%
100	25	2.5-40	9.4	3.7%
100	45	2.5-30	9.4	3.7%
200	45	2.5-30	10.2-15.4	5.4%

실시예 8: 입자 크기 및 다수의 폴리머에 걸친 단백질 방출

VEGF Trap 또는 IgG는 저분자량 (202S) 폴리(젯산) (PLA-LMW), 고분자량 (203S) 폴리(젯산) (PLA-HMW), 폴리무수물 폴리[1,6-비스(p-카복시페녹시)헥산] (pCPH), 폴리(히드록스부티르산-코히드록시발레르산) (PHB-PVA), PEG-폴리(젯산) 블록 코폴리머 (PEG-PLA), 및 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드 (PLGA)로 분무 코팅되었다. 분무-건조된 단백질의 25 mg/mL를 50-100 mg/mL 폴리머와 결합시켰다. 37°C에서 10 mM 인산염 버퍼, pH 7.2에서 시험관 내 방출 검정을 수행하였다. 결과는 표6에서 나타난다.

표 6: 폴리머 의존적 입자 크기 및 단백질 방출(모든 측정값은 대략적임)

폴리머	단백질	15 미크론에서 입자의 상대적인 수	100% 단백질 방출에 대한 시간
PLA-LMW	VEGF Trap	0.8 x 10 ²	3일
PLA-HMW	VEGF Trap	0.8 x 10 ²	3일
pCPH	VEGF Trap	1 x 10 ²	3일
PHB-PVA	VEGF Trap	5 x 10 ²	1일
PEG-PLA	VEGF Trap	0.6 x 10 ²	6시간
PLGA	IgG	1 x 10 ²	8일

실시예 9: 다수의 폴리머에서 단백질 안정성

VEGF Trap 및 IgG를 그것들 각각의 폴리머 코팅으로부터 추출하였고 SE-UPLC에 의해 순도를 측정하였다. 결과를 표 7에서 요약하였다. 단백질은 일반적으로 테스트된 폴리머에 대한 분무 코팅 공정에 호환성이다. 단백질은 계속해서 단백질을 방출하는 상기 폴리머에 대하여 적어도 14일 동안은 안정하게 유지되었다.

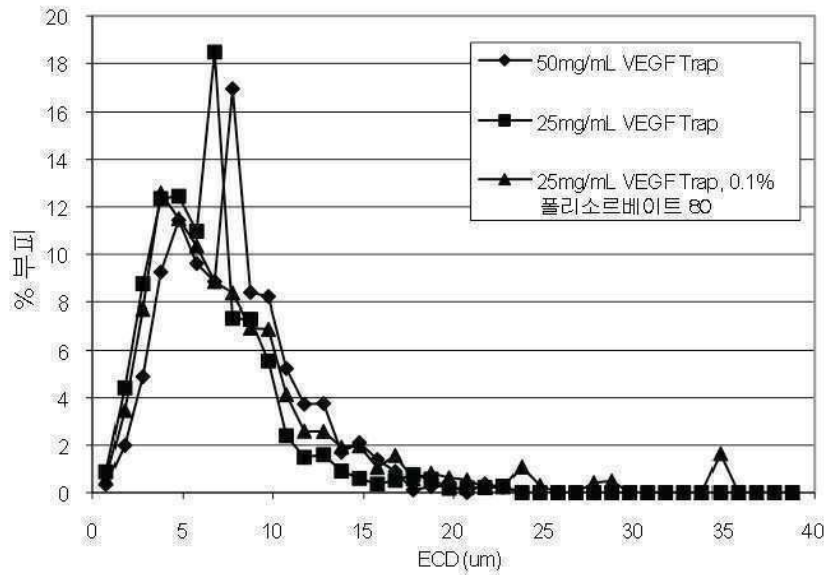
[0129] 표 7

단백질	폴리머	크기 배제 크로마토그래피에 의한 %순도			
		분무 코팅 후	시험관 내 방출 (IVR) 제1 일	IVR 제3 일	IVR 제14 일
VEGF Trap	POE (AP141)	97.7	98.3	98.2	96.7
VEGF Trap	PLA-LMW	97.0	97.4	92.8	-
VEGF Trap	PLA-HMW	93.9	97.3	95.4	-
VEGF Trap	PEG-PLA	89.9	91.2	-	-
VEGF Trap	pCPH	89.2	94.2	84.8	-
VEGF Trap	PHB-PVA	97.4	96.2	-	-
VEGF Trap	PLGA	96.6	97.8	-	93.6
IgG	PLGA	99.2	98.0	-	92.0

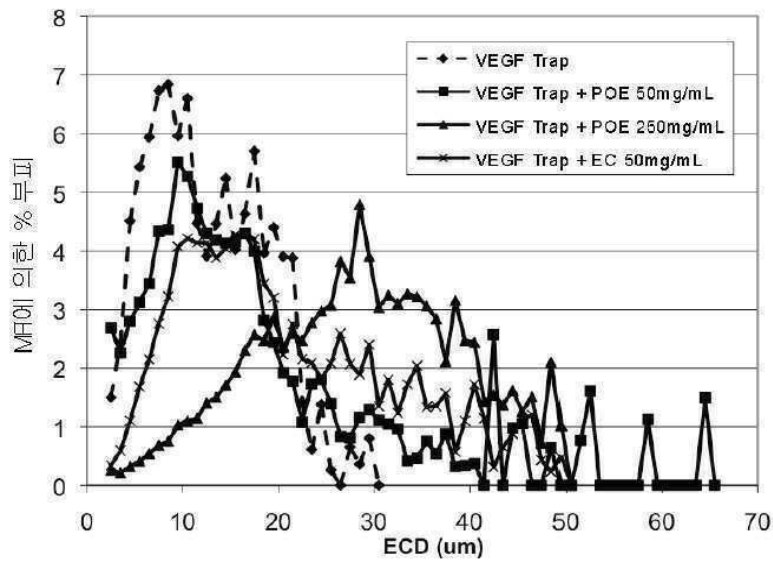
[0130]

도면

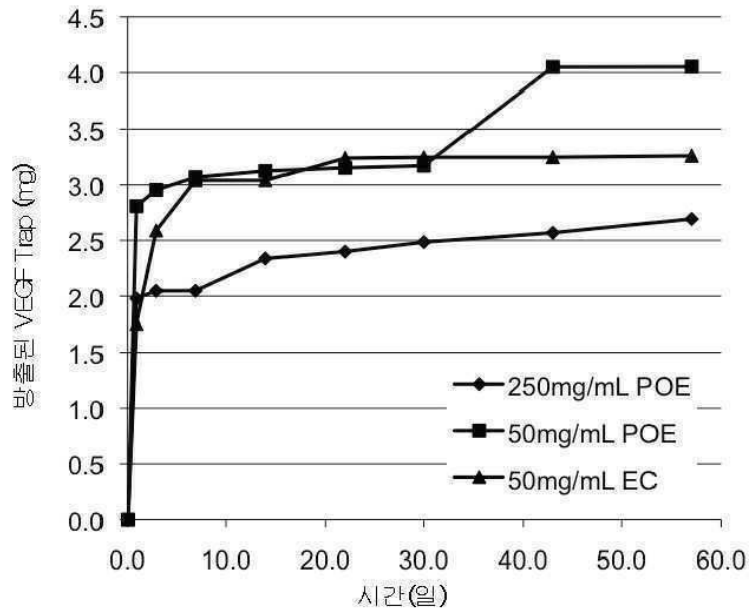
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Polymer Protein Microparticles

<130> 1110A

<140> Not available

<141> 2012-11-18

<150> US 61/561,525

<151> 2011-11-18

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 415

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 1

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val

1 5 10 15

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr

20 25 30

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe

35 40 45

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu

50 55 60

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg

65 70 75 80

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile

85 90 95

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr

100 105 110

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys

115 120 125

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly

130 135 140

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr

145 150 155 160

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met

165 170 175

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr
180 185 190

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
195 200 205

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
210 215 220

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
225 230 235 240

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
245 250 255

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
260 265 270

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
275 280 285

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
290 295 300

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
305 310 315 320

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
325 330 335

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
340 345 350

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
355 360 365

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
370 375 380

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
385 390 395 400

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
405 410 415