

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
A61K 9/52

(11) 공개번호 특2001-0022007  
(43) 공개일자 2001년03월 15일

(21) 출원번호 10-2000-7000574  
(22) 출원일자 2000년01월 18일  
    번역문제출일자 2000년01월 18일  
(86) 국제출원번호 PCT/US 98/14723 (87) 국제공개번호 W0 99/03454  
(86) 국제출원출원일자 1998년07월 17일 (87) 국제공개일자 1999년01월 28일  
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 가나 감비아 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드  
                  우간다 짐바브웨  
EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄  
                  몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄  
EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스페인  
                  핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코  
                  네덜란드 포르투갈 스웨덴  
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카메룬  
                  가봉 기네 기네비소 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고  
국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔  
                  보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다  
                  스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국  
                  그루지야 가나 감비아 크로아티아 헝가리 인도네시아 이스라엘  
                  아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아  
                  스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아  
                  몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드  
                  폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아  
                  슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고  
                  우크라이나 우간다 우즈베키스탄 베트남 유고슬라비아 짐바브웨

(30) 우선권주장 60/053,029 1997년07월 18일 미국(US)  
(71) 출원인 인파임드테라퓨틱스, 잉크. 추후보정  
(72) 발명자 미합중국 메사추세츠 02138-1066 캠브리지 씨 콩코드 애버뉴 767  
                  휴벨, 제프리, 에이.  
                  스위스연방공화국체하-8126주미콘, 운터도르프스트라세22  
                  키에라스, 마크, 티.  
                  미합중국메사추세츠01950, 뉴버리포트, 퍼처스스트리트23  
                  론, 에알, 에스.  
                  미합중국메사추세츠02420-1101, 렉싱턴, 코치로드7  
                  로웨, 스테펜, 씨.  
                  미합중국메사추세츠02181-2804, 웰슬리, 채텀서클1  
(74) 대리인 김학제, 문혜정

심사청구 : 없음

(54) 생물학적 활성 물질의 서방용 생분해성 마이크로머

요약

본 발명은 아래의 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법으로서: (a) 상기 생물학적 활성 물질과 마이크로머를 화학시키는 단계; (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계; (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제(article)를 제조하는 단계; 및 (d) 상기 제제 또는 그의 일부를 포유 동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 단계(c)를 중합성 모노비닐 단량체가 존재하지 않는 상태에서 진행하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법에 관한 것이다.

대표도

**도8**

**색인어**

마크로머, 생물학적 활성 물질, 단백질, 중합성 모노비닐 단량체, 서방성

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 생물학적 활성 물질을 투여하는 방법 및 상기 물질 투여용 생분해성 조성물에 관한다.

**배경기술**

유전공학 및 생물공학 분야에서 급속한 발전을 이룬 결과, 약제로서 유용한 단백질 및 펩타이드가 다량 개발되었다. 이에 따라 신규 약제 투여 방법 개발의 중요성에 대한 인식도 점점 증가하고 있다. 요즘에는 특히 단백질과 같은 생물-생물학적 활성 물질을 국부적으로 또는 전신적으로 투여하는 방법에 관심이 집중되고 있다.

저분자 투여시 통상적으로 사용되어 온 다수의 담체(carrier)에서 단백질은 분해되기 때문에, 단백질의 전달은 매우 복잡한 문제일 수 있다. 대부분의 경우, 단백질의 활성형은 생분해성 중합체내에 조제되기 어렵다. 예를 들어 생분해성 히드로겔(hydrogel)과 같은 합성 물질이 단백질 전달에 사용될 수 있다. 그러나 다수의 방법중, 혈관을 통하여 국부적 및 전신적으로 전달되는 과정은 상대적으로 신속하게 진행되며, 이는 주로 단백질 입자의 용해 속도에 좌우된다. 상기 방법은 제제가 지속적으로 서서히 방출되는 경우보다는 초기에 '분출(burst)'하여 방출될 수 있는 경우에 제한적으로 사용될 수 있다.

**[발명의 요약]**

본 발명의 제 1 양상은

- (a) 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제(article) 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계

를 포함하며, 상기 단계(c)를 중합성 모노비닐 단량체가 존재하지 않는 상태에서 진행하는 생물학적 물질의 전달 방법에 관한다.

본 발명의 제 2 양상은

- (a) 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제를 투여하는 단계 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계

를 포함하며, 상기 단계(c)를 중합성 모노비닐 단량체가 존재하지 않는 상태에서 진행하는 생물학적 물질의 전달 방법에 관한다.

본 발명의 제 3 양상은

- (a) 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제(article)를 투여하는 단계 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 단계(c)를 비닐 피롤리돈 단량체가 존재하지 않는 상태에서 진행하는 생물학적 물질의 전달 방법에 관한다. 본 발명은 또한 이들 방법에 의해 제조된 조성물에 관하여 기술되어 있다.

본 발명의 제 4 양상은

- (a) 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제(article)의 형태로 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제를 투여하는 단계 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며 상기 제제가  $t_{50}$  보다 2.5배 긴 시점에 상기 생물학적 활성 물질의 80%이상을 방출시키는, 포유 동물로의 생물학적 활성

물질의 전달 방법에 관한다.

본 발명의 제 5 양상은

- (a) 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제로 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제를 투여하는 단계 또는 그의 일부를 포유 동물에 투여하는 단계를 포함하며 상기 제제가  $t_{50}$ 보다 적어도 2.5배 긴 기간 동안 치료 용량의 상기 활성 물질을 방출하는, 포유 동물로의 생물학적 활성 물질의 전달 방법에 관한다.

본 발명의 제 6 양상은 상기 조성물이 히드로겔 및 생물학적 활성 물질을 포함하는 입자를 포함하며, 상기 입자의 방출 카이네틱이 입자 크기에 무관하고, 상기 입자들이 약 50nm-1mm의 질량 평균 직경을 갖는, 생물학적 활성 물질을 전달하는 조성물에 관한다.

본 발명의 제 7 양상은

- (a) 하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 중합체를 중합시킨 결과 생성되는, 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 갖는 중합성 말단기(polymerizable end group)를 가지는, 중합성이며 생분해성 마크로머와 생물학적 활성 물질을 개시제 존재하에서 화합시키는 단계(단, 상기 중합성 말단기들은 하나 이상의 분해성 영역에 의하여 분리된다.);
- (b) 광선 부재하, 상기 마크로머를 중합시켜 히드로겔을 제조하고 생물학적 활성 물질을 상기 히드로겔에 결합시키는 단계; 및
- (c) 상기 히드로겔을 생물학적 활성 물질을 서방시킬 수 있는 제제(article)으로 제조하는 단계를 포함하는 생물학적으로 활성인 물질의 서방형 제제를 제조하는 방법에 관한다.

상기 개시제는 라디칼 개시제 또는 이온 개시제일 수 있다.

본 발명의 제 8 양상은

- (a) 소수성이며 수불용성인 마크로머, 개시제 및 물을 화합시키는 단계;
- (b) 상기 마크로머를 팽윤(swelling)시키는 단계;
- (c) 상기 마크로머를 균일하게 혼합시키는 단계; 및
- (d) 상기 마크로머를 중합시켜 히드로겔을 제조하는 단계를 포함하는 중합된 히드로겔의 제조 방법에 관한다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 상기 단계(d)를 수행하기 전에 생물학적 활성 물질을 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.

본 발명의 제 9 양상은

- (a) 친수성 마크로머 및 소수성이며 수불용성인 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 제조된 화합물을 가열 및 교반시켜 균일 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 실온으로 냉각시키는 단계;
- (d) 상기 혼합물에 물 및 개시제를 가한후 상기 혼합물을 팽윤(swelling)시키는 단계; 및
- (e) 상기 마크로머를 중합시켜 히드로겔을 제조하는 단계를 포함하는 중합된 히드로겔의 제조 방법에 관한다.

본 발명의 제 10 양상은

- (a) 단백질을 중합성 친수 중합체와 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 제조된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제(article)를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제(article)를 투여하는 단계 또는 이들의 일부를 포유 동물에 투여하는 단계를 포함하며 상기 단백질은 원형 그대로의 상태로 남게되고 상기 제제(article)으로부터 단백질의 70% 이상이 방출되는, 단백질 전달 방법에 관한다.

본 발명의 제 11 양상은

- (a) 수용액내 자유 라디칼 개시제가 존재하지 않는 조건하에서 생물학적 활성 물질을 중합성이며 생분해성인 마크로머와 화합시키는 단계;
- (b) 상기 용액을 분산시켜 마크로머 및 생물학적 활성 물질을 포함하는 미점적(fine droplet)을 형성시키는 단계;
- (c) 상기 미점적내에서 상기 마크로머를 중합시켜 생물학적 활성 물질이 결합된 히드로겔 입자를 제조하는 단계(상기 입자는 생물학적 활성 제제를 서방(controlled releasing)시킬 수 있음); 및
- (d) 상기 입자를 투여하는 단계 또는 그의 일부를 포유 동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 단계(c)

를 비닐 피릴리돈 단량체가 존재하지 않는 상태에서 진행하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법에 관한다. 상기 입자의 80% 이상의 입도는 약 5 $\mu$ m인 것이 바람직하다.

본 발명의 제 12 양상은 하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 가진 중합성 말단기(polymerizable end group)들을 가지는, 중합성이며 생분해성 마크로머내에 담지된 생물학적 활성 물질을 포함하는 조성물에 관한다.

본 발명의 제 13 양상은 하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 가진 중합성 말단기(polymerizable end group)들을 가지는 불용성 마크로머에 관한다.

본 발명의 제 14 양상은 하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 가진 중합성 말단기(polymerizable end group)들을 가지는, 단백질을 지속적으로 전달할 수 있는 조성물에 관한다(단, 상기 중합성 말단기는 하나 이상의 분해성 영역에 의하여 분리되어짐).

본 발명의 제 15 양상은 하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 가진 중합성 말단기(polymerizable end group)들을 가지는, 단백질을 지속적으로 전달할 수 있는 조성물에 관한다[단, 상기 중합성 말단기는 하나 이상의 분해성 영역에 의하여 분리되어지며, 상기 분해성 영역은 폴리(트리메틸렌 카보네이트)를 필수적으로 포함함.].

본 발명의 제 16 양상은 분자량이 약 1000Da인 폴리(에틸렌 글리콜) 코어와 폴리(카프로락톤)으로 이루어진 분해성 영역을 포함하며, 30일을 초과하는 기간 동안 치료 용량의 LHRH를 전달시킬 수 있는, LHRH의 피하 투여용 조성물에 관한다.

본 발명의 제 17 양상은 글루카곤 유사 펩타이드-1 및 하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 가진 중합성 말단기(polymerizable end group)들을 가지는, 마크로머(단, 상기 중합성 말단기는 하나 이상의 분해성 영역에 의하여 분리되어짐)를 포함하는 조성물에 관한다.

본 발명의 제 18 양상은 탭 밀도(tap density)가 0.4g/cm<sup>3</sup> 미만인 입자들을 포함하고, 입자들의 50% 이상의 평균 입경이 약 5 $\mu$ m미만이며, 폐질환 치료용으로 제형된 생물학적 활성 물질을 지속적으로 방출시키기 위한 히드로겔 조성물에 관한다.

본 발명의 제 19 양상은 생물학적 활성 물질을 지속적으로 방출시키는 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 탭 밀도(tap density)가 0.4g/cm<sup>3</sup>를 초과하는 입자를 포함한다.

상기된 본 발명의 양상들중 바람직한 구체에는 하기와 같다. 방출 가능한(releasable) 생물학적 활성 물질의 10%가 방출되는 시간은 t<sub>50</sub>의 10분의 1을 초과한다. 제제(article) 및 마크로머 조성물은 2.5중량% 이상의 생물학적 활성 물질을 포함하며, 바람직하게는 5중량%, 10중량%, 25중량% 또는 40중량% 이상의 생물학적 활성 물질을 포함한다.

마크로머(macromer)는

- (a) 중심 코어(central core)를 이루는 수용성 영역(water soluble region);
- (b) 상기 코어에 부착된 2 이상의 분해성 영역(degradable region); 및
- (c) 상기 분해성 영역에 부착된 중합성 말단기들(polymerizable end group)

을 포함한다.

상기 수용성 영역은(water soluble region)은 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(에틸렌옥시드), 폴리(비닐알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(에틸렌옥시드)-코-폴리(프로필렌옥시드)블록 공중합체, 다당류, 탄수화물, 단백질 및 이들의 조합물로 구성된 그룹으로부터 선택된 중합체를 포함한다. 상기 수용성 영역은 2이상의 측쇄(arm)를 갖는다.

상기 분해성 영역(degradable region)은 폴리( $\alpha$ -히드록시산), 폴리(락톤), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(오소에스테르), 폴리(오소카보네이트) 및 폴리(포스포에스테르)로 구성된 그룹으로부터 선택된 중합체를 포함한다. 예를 들어 상기 분해성 영역은 폴리(트리메틸렌 카보네이트) 또는 폴리(카프로락톤)을 포함할 수 있다. 이와는 달리, 상기 분해성 영역은 폴리(글리콜산), 폴리(DL-락트산) 및 폴리(L-락트산)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리( $\alpha$ -히드록시산)를 포함할 수 있다. 또는 상기 분해성 영역은 폴리( $\epsilon$ -카프로락톤), 폴리( $\delta$ -발레로락톤) 및 폴리( $\gamma$ -부티로락톤)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 폴리(락톤)를 포함할 수 있다. 상기 분해성 영역은 2이상의 상이한 단량체의 공중합체 또는 2이상의 단량체의 블렌드를 포함할 수 있다.

상기 중합성 말단기들(polymerizable end group)은 마크로머를 중합시킬 수 있는 탄소-탄소간 이중결합을 포함한다.

상기 제제는 포유 동물의 폐에 투여된다. 이와는 달리, 상기 제제는 정맥내, 피하, 근육내, 경구 또는 비강내에 투여될 수도 있다. 바람직하게는 상기 제제는 사람에게 투여되며, 이때의 생물학적 활성 물질은 단백질이다.

생물학적 활성 물질에서 '치료 용량(therapeutic dose)'이란, 최소 효과량 및 치사량의 중간치를 말한다.

'방출 카이네틱(release kinetics)'이란, 제제가 디바이스(device) 또는 제형으로부터 방출되는 속도를 말한다.

'마크로머(macromer)'란,

- (1) 생물용화성(biocompatible)이며 수용성인 영역;
- (2) 생분해성/가수분해성 영역; 및
- (3) 2 이상의 중합성 영역의 3 부분을 갖는 중합체를 말한다.

단백질 또는 펩타이드에서 사용된 '원형 그대로의 형태(intact)'란, 단백질 또는 펩타이드의 생물학적 활성형을 의미하는 것이지, 분해되었거나 또는 응집된 형태를 의미하는 것은 아니다.

'물에 녹지 않는(insoluble in water)' 또는 '수불용성(water insoluble)'이란, 화합물의 용해도가 수용액 또는 디메틸설폭시드와 같은 유기 용매를 5%이하 포함하는 수용액내에서 1g/100ml 미만인 경우를 말한다.

본 발명은 단백질과 같은 생물학적 활성 물질을 다량으로 서방시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 상기 단백질을 전달하는데 사용된 마크로머는 단백질이 분해되는 것을 방지해 줄 뿐만 아니라 단백질 방출속도를 조절해준다. 상기 단백질이 전달되는 기간은 수 시간 또는 수 개월일 수 있다. 더욱이, 본 발명은 생물학적 활성 물질을 한꺼번에 공급해 주기 보다는 상대적으로 일정하게 공급해 주는 방법 및 조성물을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 단백질 입자가 제제(article)내에 균일하게 분산되어 있는 상태 및 불균일하게 분산되어 있는 상태를 나타낸다.

도 2는 고분자 조성물로부터 물질이 방출되는 거동을 나타내는 그래프이다.

도 3은 3.4KL4 및 PEGDA의 블렌드로부터 bST가 방출되는 거동을 나타내는 그래프이다.

도 4는 3.4KL5로부터 인슐린이 방출되는 거동을 나타내는 그래프이다.

도 5는 3.4KC6 및 3.45KL6의 50:50 블렌드로부터 ZnbST가 매일 방출되는 누적량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 3.4KC6 및 3.45KL5의 25:75 블렌드로부터 ZnbST가 매일 방출되는 누적량을 나타낸 그래프이다.

도 7은 3.4KC6 및 3.45KL5의 25:75 블렌드로부터 ZnbST 단량체, 이량체 및 용해성 단량체가 매일 방출되는 양을 나타낸 그래프이다.

도 8은 bST 주입 효과 및 bST제형의 지속적 전달이 하이포피섹토마이즈된 쥐(hyphysectomized rat)에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 9는 직경이 작은 원형 히드로겔을 디바이스 및 직경이 큰 원통형 히드로겔 디바이스로부터 bST의 초기 방출 상태를 도시한 그래프이다.

도 10은 EP0 주사 및 EP0 제형의 지속적인 전달이 망상 적혈구의 퍼센트에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 11은 인슐린의 피하 주사 및 인슐린 히드로겔을 피하에서 지속적으로 방출시켰을때 당뇨병 쥐의 혈중 글루코오스 농도에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 12는 인슐린 히드로겔을 폐에서 지속적으로 방출시켰을때 당뇨병 쥐의 혈중 글루코오스 농도에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 13은 시험관내에서 3.4KL5로부터 EP0가 방출되는 양을 나타낸 그래프이다.

도 14는 시험관내에서 3.4KL5 입자로부터 인슐린이 방출되는 양을 나타낸 그래프이다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 생물학적 활성 물질을 투여하는 방법 및 이때 사용되는 조성물을 제공한다. 상기 방법 및 조성물은 상기 생물학적 활성 물질을 지속적으로 서방(controlled releasing)시키는 방법 및 조성물을 제공한다.

본 발명의 하나의 구체예에서, 생물학적 활성 물질은 중합 개시제 존재하에서 생분해성이며 중합성인 마크로머와 화학된다. 이후 상기 마크로머는 중합되어 히드로겔을 형성하게 되고 이 히드로겔내에서 생물학적 활성 물질을 혼입시킨다. 최종적으로 생물학적 활성 물질을 함유하는 히드로겔을 생물학적 활성 물질을 서방시킬 수 있는 제제(article)으로 제조한다.

마크로머(Macromer)

본 발명의 마크로머는 하나 이상의 수용성 영역, 하나 이상의 분해성 영역(degradable region)(예를 들어, 가수분해성 영역) 및 하나 이상의 중합성 영역(polymerizable region)을 포함한다. 상기 마크로머는 수용성일 수도 있으며 수불용성일 수도 있다. 상기 마크로머는 히드로겔로 중합되는데, 이는 상기 생물학적 활성 물질의 속도를 조절하면서 전달하는데 유용하다. 상기 마크로머의 중요한 양상은 중합성 영역이 하나 이상의 분해성 영역에 의하여 분리된다는 것이다. 상기와 같이 분리되어 있기 때문

에 마크로머가 생체내에서 균일하게 분해될 수 있는 것이다.

마크로머의 수용성 영역 및 가수분해성 영역(hydrolyzable region)은 상기 마크로머의 일반적인 특성을 결정짓는다. 예를 들어서, 상기 마크로머의 수용해도는 소수성인 분해성 말단기로 구성되는 마크로머의 퍼센트를 다양하게 변화시켜 조절할 수 있다.

상기 마크로머에는 몇가지 변형물이 존재한다. 예를 들어, 중합성 영역은 분해성 영역에 직접 결합될 수 있다; 이와는 달리, 이들 변형물은 분해성 영역에 의해 분리된 중합성 영역과 수용성, 비분해성(nondegradable) 영역을 통하여 간접적으로 결합될 수도 있다. 예를 들어, 상기 마크로머가 분해성 영역과 결합된 단일의 수용성 영역을 포함하면, 하나의 중합성 영역은 수용성 영역에, 그리고 나머지 다른 하나는 분해성 영역에 결합될 수 있다.

본 발명의 다른 구체예에서, 상기 수용성 영역은 마크로머의 중심 코어를 이루며 20이상의 분해성 영역과 결합되어 있다. 20이상의 중합성 영역이 분해성 영역과 결합되어 있기 때문에 이들이 분해될 경우에는 상기 중합성 영역 -특히 중합된 겔 형태- 이 분리된다. 이와는 달리, 상기 마크로머의 중심 코어가 분해성 영역으로 이루어져 있을 경우, 20이상의 수용성 영역은 상기 코어에 결합될 수 있으며 중합성 영역은 각각의 수용성 영역에 결합될 수 있다.

본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 마크로머는 분해성 영역과 결합된 수용성 주쇄 영역(back bone region)을 갖는다. 20이상의 중합성 영역이 분해성 영역에 결합되어 있기 때문에 이들이 분해될 경우에는 겔 형태의 용해물이 수득된다. 본 발명의 추가의 구체예에서, 상기 마크로머의 주쇄는 분해성 주쇄에 결합된 측쇄 또는 그라프트 형태인 수용성 영역을 갖는, 분해성 주쇄로 이루어져 있다. 20이상의 중합성 영역은 상기 수용성 측쇄 또는 그라프트에 결합되어 있다.

다른 변형물에서, 상기 주쇄는 예를 들어, 별-형태(star-shaped) 또는 빗-형태(comb-shaped)와 같은 다수의 측쇄(arms)를 가질 수 있다. 상기 주쇄는 수용성 영역, 생분해성 영역을 포함하거나 또는 수용성 이면서 생분해성인 영역을 포함할 수 있다. 상기 중합성 영역은 이러한 주쇄에 결합되어 있다. 다시 말해서, 상기 중합성 영역은 분해성 영역에 의해서 몇몇 지점에서 분리되어 있음이 분명하다.

본 발명의 명세서중에서, 하기의 축약어들은 본 발명의 특정 마크로머를 나타내는 데에 사용되고 있다. 2개의 특정 구체예에서, 분자량이 4000Da인 폴리(에틸렌 글리콜)로 구성된 수용성 영역을 가지며, 이러한 영역의 양 측면에 5 락테이트기들이 있고 양 측면이 아크릴레이트로 캡핑된 마크로머(capped macromer)를 '4KL5'라 칭한다. 이와 유사하게, 분자량이 3400Da인 폴리(에틸렌 글리콜)로 구성되는 수용성 영역을 포함하고 이러한 영역의 양 측면에 6 카프로락톤기들을 가지며, 양 측면이 아크릴레이트기로 캡핑된 마크로머를 '3.4KL6'라 칭한다.

#### 수용성 영역(water-soluble region)

수용성 영역은 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥시드), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(에틸렌 옥시드)-코-폴리(프로필렌 옥시드)블록 공중합체, 다당류, 탄수화물, 단백질 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다.

본 발명의 마크로머는 친수성 및 수용해도가 높으며 생체 적합성이 우수한 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)을 포함하는 수용성 코어 영역을 포함한다. 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 영역은 바람직하게는 분자량이 약 400-40,000Da이며, 더욱 바람직하게는 분자량이 약 1000-30,000Da, 약 1000-20,000Da, 또는 약 2000-10,000Da이다.

#### 분해성 영역(Degradable region)

상기 분해성 영역은 예를 들어, 폴리( $\alpha$ -히드록시산), 폴리(락톤), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(오소에스테르), 폴리(오소카보네이트) 또는 폴리(포스포에스테르), 또는 상기 중합체의 블랜드 또는 공중합체를 포함할 수 있다.

상기 예로 든 폴리( $\alpha$ -히드록시산)는 폴리(글리콜산), 폴리(DL-락트산) 및 폴리(L-락트산)을 포함한다. 상기 예로 든 폴리(락톤)은 폴리( $\epsilon$ -카프로락톤), 폴리( $\delta$ -발레로락톤), 폴리( $\gamma$ -부티로락톤), 폴리(1,5-디옥세펜-2-온) 및 폴리(트리메탈렌 카보네이트)를 포함한다.

공중합체의 예로서는 카프로락톤 및 글리콜산의 공중합체 및 카프로락톤 및 락트산의 공중합체를 포함한다.

#### 중합성 영역(polymerizable region)

상기 중합성 영역은 바람직하게는 마크로머를 중합시킬 수 있는 탄소-탄소 이중 결합을 포함한다. 적절한 중합성 관능기를 선택하면 중합화 및 겔화를 촉진시킬 수 있다. 아크릴레이트를 포함하는 중합성 영역이 바람직한데, 왜냐하면 상기 영역들은 후술하는 바와 같은 몇몇 개시 시스템을 사용하여 중합될 수 있기 때문이다. 아크릴레이트의 예로서는 아크릴레이트, 메타크릴레이트 및 메틸 메타크릴레이트를 포함한다.

#### 중합 단계(polymerization step)

본 발명의 마크로머는 장파장의 UV 광선, 가시 광선, 열 에너지, 또는 산화-환원 시스템하에서 중합 개시제를 사용하여 중합된다. 본 발명에서 중합 단계는 실온 또는 저온(예를 들어 20°C 미만)에서 수행된다. 중합 단계 동안, 단백질과 같은 물질들은 그 결과로 생성되는 겔의 중합체 그물 구조내에 물리적으로 결합된다.

본 발명의 중합 단계는 시험관내에서 320nm이상 파장을 갖는 광선에 의해 개시될 수 있다. 중합성 영역이 아크릴레이트 관능기를 포함할 경우, 상기 개시제는 예를 들어 크산틴 염료, 아크리딘 염료, 티아진 염료, 펜아진 염료, 캄포퀴논 염료, 아세토페논 염료 또는 트리에탄올아민을 포함하는 에오신 염료,

2,2-디메틸-2-페닐 아세토페논, 및 2-메톡시-2-페닐 아세토페논과 같은 다수의 적당한 염료중의 하나일 수 있다.

본 발명의 중합 단계는 광선 부재하에서도 수행될 수 있다. 예를 들어서, 상기 중합 단계는 산화-환원 시스템으로 개시될 수 있으며, 이에 관하여는 실시예에 더욱 상세히 기술되어 있다. 몇몇의 경우에는 광범위한 온도 범위에서 적당한 속도로 라디칼 개시제를 생성하는 것과 같은 본 발명의 산화-환원 시스템을 사용하여 중합시킬 수 있는 것이 유리하다.

상기 산화-환원 시스템에서 사용될 수 있는 개시제에는 아세틸, 벤조일, 쿠밀 및 t-부틸과 같은 퍼옥시드; t-부틸 및 쿠밀과 같은 히드로퍼옥시드, t-부틸 퍼벤조에이트와 같은 퍼에스테르; 아실 알킬설폰일 퍼옥시드, 디알킬 퍼옥시디카보네이트, 디퍼옥시케탈, 케톤 퍼옥시드, 2,2-아조(비스)이소부티로니트릴(AIBN)와 같은 아조 화합물, 디설파이드 및 테트라젠을 포함할 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

#### 마크로머의 특성

본 발명의 제제(article)은 생분해성이다. 상기 생분해는 긴 올리고머내 결합 부위에서 이루어져, 무독성이고 인체로부터 용이하게 제거되는 단편 및/또는 인체내에서 정상적이고 안전한 화학 중간 생성 물질을 생성시킨다. 상기 물질들은 특히 친수성 물질 전달에 유용한데, 왜냐하면 중합체의 수용성 영역이 상기 중합체내에 트래핑된(trapped) 물질과 물이 접촉할 수 있도록 만들어 주기 때문이다.

더욱 중요한 것은, 본 발명의 제제(article)은 결합된 생물학적 활성 물질이 서방될 수 있는 속도로 생체내에서 분해 가능하다는 점이다. 상기 방출은 상기 물질이 분해후 중합체로부터 확산되거나 또는 중합체가 분해될 때 상기 물질이 확산됨으로써 발생할 수 있다. 상기 중합체가 분해되면 말단 에스테르 결합이 연속적으로 가수분해됨으로써 생체내에서 유리 거대 분자의 느린 방출이 용이해진다. 기타 방출 시스템과 관련된 분출 효과(burst effect)는 본 발명의 제형 범위내에서는 발생하지 않는다.

방출속도는 부분적으로는 수용성 영역내 구성 요소의 분자량과 같은 수용성 영역의 조성에 좌우된다. 생물학적 활성제의 방출속도는 마크로머의 중합도 및 기타 요인에 의해서도 좌우될 수 있다.

본 발명의 생물학적 활성 물질의 방출속도는 또한 마크로머내 분해성 영역의 분해 속도에 의해서도 좌우된다. 예를 들어, 글리콜 에스테르의 경우에는 매우 신속하게 분해가 이루어지며, 락트 에스테르는 이보다는 약간 느리게 분해되고 카프로락트 에스테르는 매우 느리게 분해된다. 상기 분해성 영역이 폴리글리콜산을 포함하는 경우, 방출 시간은 1주 미만이다. 상기 분해성 영역이 폴리(락트산)을 포함하는 경우, 방출 시간은 약 1주이다. 상기 분해성 영역이 카프로락톤 및 락트산의 공중합체 또는 트리메틸렌 카보네이트 및 락트산의 공중합체를 포함하는 경우, 방출 시간은 2-4주이다. 상기 분해성 영역이 폴리(트리메틸렌 카보네이트) 또는 카프로락톤 및 트리메틸렌 카보네이트의 공중합체를 포함할 경우, 방출 시간은 약 3-8주이다. 상기 분해성 영역이 폴리(트리메틸렌 카보네이트) 또는 폴리(카프로락톤)을 포함할 경우, 방출 시간은 약 5주 이상이다.

친수성 및 소수성 구성 요소의 비율을 변경시킴으로써 방출속도를 추가로 정확하게 수정할 수 있다. 예를 들어, 중합후 용해도가 높은 마크로머로부터는 친수성 겔을 수득할 수 있다; 친수성 히드로겔은 소수성 히드로겔보다 더욱 신속하게 분해된다. 중합 히드로겔을 제조하는데에는 친수성 마크로머(예를 들어, 4KL5) 및 소수성이며 수불용성인 마크로머(3.4Kbc)의 블렌드를 사용할 수 있다. 이러한 히드로겔의 방출속도는 락트산만을 포함하는 히드로겔의 방출량 및 카프로락톤만을 포함하는 히드로겔의 방출속도의 중간 정도이다. 분해성 영역이 카프로락톤 및 락트산의 공중합체인 마크로머는 또한 1차 분해성 관능기로서 락트산만을 포함하는 히드로겔의 방출속도 및 1차 분해성 관능기로서 카프로락톤만을 포함하는 히드로겔의 방출속도의 중간 정도이다.

더욱이, 본 발명의 제제(article)의 방출속도는 로딩된 생물학적 활성 물질의 양(최종 조제 산물의 퍼센트); 본 발명의 생물학적 활성 물질의 용해도; 본 발명의 생물학적 활성 물질의 친수성(친수성 물질은 일반적으로 소수성 물질의 경우보다 더욱 신속하게 방출될 것임)에 좌우되며, 현탁액의 경우에는 입자의 크기에 좌우된다. 상기 인자들을 적용시킴으로써 분해 및 서방 속도를 매우 광범위하게 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 방출 시간을 시간, 일 또는 월 단위가 되도록 디자인할 수 있다.

도 1에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 방법은 균일 제제 전달 시스템(homogeneous drug delivery system)으로서의 역할을 하는 입자를 제조할 수 있다. 본 발명의 제제(article)은 균일한 성질을 갖기 때문에, 초기 분출에 의한 방출은 발생하지 않는다. 더욱이, 밀도가 균일하기 때문에 분출식 방출(burst release) 현상을 더욱 최소화시킬 경우, 상대적으로 다량의 단백질과 결합하는 것이 가능하다.

일반적으로, 수용성 물질은 본 발명의 마크로머에 결합할 경우 균일 시스템(homogeneous system)을 형성하게 될 것이다. 본 발명의 마크로머를 제조하는데에 소요되는 시간 내에 물에 용해될 수 없는 물질은 불균일 시스템(heterogeneous system)을 형성하게 될 것이다. 불균일 시스템내에서의 분출량은 현탁액 구성 입자를 작은 입자로 조절함으로써 최소화시킬 수 있다.

본 발명의 생물학적 활성 물질의 방출 형태를 도 2에 나타내었다. 가로축은 제제 투여후 경과된 시간을 나타내며, 세로축은 방출된 생물학적 활성 물질의 양을 나타낸다. 도 2에 나타낸 바와 같이,  $t_{50}$ 은 생물학적 활성 물질의 50%가 방출되는데 소요된 시간이다.  $t_{10}$ 은 생물학적 활성 물질의 10%가 방출되는데 소요된 시간이다. 방출 가능한 활성 물질의 양은 혼입된 활성 물질의 10%가 방출되는데에 소요되는 기간보다 10배 긴 기간 동안 제제로부터 방출되는 양이다.

방출 곡선이 완전한 선형을 이루는 경우에는  $t_{10}=t_{50}$ 의 1/5이다. 초기에 분출이 발생하는 경우,  $t_{10}$ 은  $t_{50}$ 의 1/5미만이다. 본 발명의 방법 및 조성물에서,  $t_{10}$ 은  $t_{50}$ 의 1/10을 초과하는 것이 바람직하다.

다시 말해서, 투약 초기에 상기 생물학적 활성 물질의 '분출식(burst)' 방출 현상은 일어나지 않거나 아주 드물게 일어난다.

본 발명은 또한 불용성 마크로머에 관하여도 기술하고 있다. 상기 마크로머는 하나 이상의 수용성 영역, 하나 이상의 분해성 영역(예를 들어, 가수분해성 영역) 및 하나 이상의 중합성 영역을 포함한다. 상기 분해성 영역은 글리콜산, 락트산 또는 카프로락톤, 트리메틸렌 카보네이트 또는 이들의 블랜드 또는 공중합체를 포함한다. 상기 분해성 영역은 수불용성일 수 있다. 예를 들어, 15-20 락티드 유닛을 포함하는 분해성 영역이 존재하는 마크로머가 제조될 수 있다; 상기 마크로머의 방출속도는 매우 빠르다. 6개의 카프로락톤 유닛, 4 락티드 유닛 및 4 글리코라이드 유닛을 포함하는 분해성 영역을 갖는 마크로머는 방출속도가 빠르며, 3 락티드 유닛 및 7 트리메틸렌 카보네이트 유닛을 포함하는 분해성 영역을 갖는 마크로머는 방출속도가 그의 중간 정도이다.

상기 마크로머의 수용성 영역은 바람직하게는 PEG이다. 상기 수용성 영역에는 다수의 측쇄가 존재할 수 있는데; 예를 들어, 별 형태(star-shaped) 또는 빗 형태(comb-shaped)일 수 있다. 상기 수용성 영역은 바람직하게는 4개, 6개 또는 8개의 측쇄를 가지며 분자량은 10,000-40,000Da이다.

높은 로딩 특성(High Load Characteristics)

치료제는 본원에서 기술된 제제(article)내에 높은 수율로 용이하게 혼입될 수 있다. 예를 들어, 제제(article)은 2.5중량% 이상의 생물학적 활성 물질을 포함하도록 제조될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 제제(article)은 5중량%, 10중량%, 25중량% 또는 40중량% 이상을 포함할 수 있다.

로딩된 생물학적 활성 물질의 양은 상기 제제(article)들을 적당한 용매로 용해시켜서 분광 광도법과 같은 당 업계에서 상용화된 방법으로 생물학적 활성 물질의 존재량을 검정하여 측정될 수 있다.

제제의 성형(shaping of carrier)

상기 방법을 사용하여 제조된 제제(article)를 원하는 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 제제(article)를 특정 성형틀의 공동(body cavity)에 넣어 성형시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 이들을 얇고 평면인 디스크형 또는 마이크로스피어(microsphere)의 형태로 성형할 수 있다. 상기 제제(article)의 형태는 특정 용도에 따라 달라질 수 있다.

본 발명의 입자는 단일 또는 이중 유탁 용매 증류법(emulsion solvent evaporation), 분무 건조법(spray drying) 및 용매 추출법(solvent extraction)을 포함하는 당 업계의 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에서 사용된 '입자(particle)'에는 마이크로스피어 입자를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 마이크로스피어 입자의 경우, 치료제 또는 기타 제제를 입자내에 분산시켜 사용할 수 있다. 상기 입자는 매끄럽고 고른 표면 형태를 갖는 고체 또는 다공성 고체일 수 있다. 마이크로스피어 입자를 제조하는 방법에 관하여는 예를 들어, Mathiowitz 및 Langer 공저, J. Controlled release 5:13-22(1987); Mathiowitz의 다수 공저, Reactive Polymers 6:275-283(1987); Mathiowitz의 다수 공저, J. Appl. Polymer Sci. 35:755-774(1988); Mathiowitz의 다수 공저, Scanning Microscopy 4:329-340(1990); Mathiowitz 외 다수 공저, J. Appl. Polymer Sci., 45:125-134(1992); 및 Benita 외 다수 공저, J. Pharm. Sci. 73:1721-1724(1984)에 기술되어 있다.

Mathiowitz 외 다수(1990), Bentina 외 다수(1984) 및 U.S. 특허 제 4,272,398 호에 예시된 용매 증류법에서는, 중합체를 예를 들어 메틸렌 클로라이드와 같은 휘발성 유기 용매에 용해시킨다. 상기 중합체 용액에 용해성 또는 미세 입자의 형태로 분산된 결합 약제를 임의로 첨가할 수 있으며, 혼합물은 폴리(비닐 알코올)과 같은 계면 활성제를 포함하는 수성 용액내에 현탁될 수 있다. 결과로 수득된 유탁액을 유기 용매가 거의 전부 증발될 때까지 교반시키고 그 결과 생성된 고체 마이크로스피어 입자를 물로 세척시킨후 냉동 건조기에서 건조시킬 수 있다.

용매 제거 과정에서, 치료제 또는 진단제는 메틸렌 클로라이드와 같은 휘발성 유기 용매내 선택된 중합체 용액에 분산 또는 용해된다. 이후 상기 혼합물을 실리콘 오일과 같은 오일에 현탁시킨후 교반하여 유탁액을 제조한다. 상기 용매가 상기 오일-상으로 분산됨에 따라서, 에멀전 점적(emulsion droplet)은 마이크로스피어의 고체 중합물로 경화된다.

분무 단계(atomizing step)에서 거대 분자 용액을 분무시킨후 점적을 건조시켜 회수함으로써 생물 분자의 초미립자를 제조하는 방법에 관하여는 PCT WO 97/41833에 기술되어 있다.

분무 건조법은 치료제와 같은 물질 및 히드로겔 제조시 사용된 중합성 마크로머를 노즐, 스피닝 디스크(spining disk) 또는 상기 혼합물을 분무시켜 미세 점적을 생성시키는 디바이스로 통과시켜 수행될 수 있다. 상기 물질 및 중합성 마크로머는 수용액과 같은 용액 또는 현탁액의 형태로서 제공될 수 있다. 상기 미세 점적을 광선에 노출시킬 경우, 상기 마크로머는 중합되어 생물학적 활성 물질과 결합된 히드로겔 점적을 형성하게 된다.

본 발명의 다른 구체예에서 상기 히드로겔 입자는 유중수(water-in-oil) 에멀전법에 의해서 제조되는데, 중합성 마크로머 및 이에 결합된 생물학적 활성 물질을 유중수(water-in-oil) 에멀전 내에 현탁시킨후 광선에 노출시키면 상기 마크로머는 생물학적 활성 물질과 결합된 히드로겔 입자로 제조된다. 통상적으로 중합은 실온에서 수행된다.

상기 기술을 사용하여 제조된 마이크로스피어 입자는 냉동 건조되었기 때문에, 저장 수명이 길고(즉, 생분해되지 않고) 제제(article)은 생물학적 활성을 나타낸다. 상기 마이크로스피어 입자는 염수 또는 기타 액체와 같은 적당한 용액으로 재구성(reconstitution)하여 주사 제제로 사용된다. 폐에 전달하는 경우에는 냉동 건조되거나 또는 재구성된 입자가 사용될 수 있다.

생물학적 활성 물질

본 발명의 조성물에 혼입될 수 있는 생물학적 활성 물질들은 치료제, 진단제 및 예방 약제(Prophylactic



Agents)를 포함한다. 이 물질들은 천연 화합물, 합성 유기 화합물 또는 무기화합물일 수 있다. 본 발명의 제제에 혼입될 수 있는 물질들로는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 무기질, 항생물질, 항종양성 약제, 국부 마취제, 항액관형성 약제, 혈관작용 약제, 항응혈제, 면역조절물질, 세포독성 제제, 항 바이러스성 제제, 항체, 신경전달물질, 정신활성 제제, 올리고 뉴클레오타이드, 지질, 세포, 조직, 또는 세포 응집체 및 그들의 조합물을 포함한다.

치료제의 예들은 칼시토닌, 과립형 대식세포군 자극인자(GMCSF), 모양체의 향신경성 인자, 부갑상선 호르몬 및 낭종성 섬유형성 이동막 조절 유전자를 포함한다.

다른 특유의 치료학적 제제로는 부갑상선 호르몬 관련 펩타이드, 성장억제호르몬, 남성호르몬, 황체호르몬(프로게스테론), 에스트라디올, 니코틴, 펜타닐, 노르에티스테론, 크로니딘, 스키폴로민, 살리실산염, 살메테롤, 포르메테롤, 알베테롤 및 발롬을 포함한다.

펜타미딘 이세티우에이트(pentamidine isethiouate)를 포함하여 폐렴치료 제제가 사용될 수 있을 것이다. 천식과 같은 폐 질병 치료용 제제가 사용될 수 있는데, 이는 알부테롤 황산염, 베타 작용약, 메타 프로테레놀 황산염, 베클로메타손 디프레피오네이트, 트리암시논 아세트아미드, 부데소나이드 아세트나이드, 이프라트로피움 브로마이드, 플루니솔라이드, 크로모린 소듐, 에르고타민 타르트레이트, 및 단백질 또는 TNF 길항제 또는 인터류킨 길항제 같은 펩타이드 제제(제제)을 포함한다.

다른 치료제로는 사이토카인, 림포카인과 같은 암 화학요법 제제 및 DNA 및 약독화된 인플루엔자 바이러스(attenuated influenza virus)와 같은 백신이 포함된다. 혼입시킬 수 있는 핵산으로는 유전자, 단백질을 코딩하는 cDNA, 발현 벡터, 전사 또는 해독하는 것을 억제하는 상보적인 핵산 서열에 결합하는 안티센스 분자, 그리고 리보자임이 혼입될 수 있다. 예를 들어, 당뇨병 섬유형성과 같은 질병의 치료를 위해 유전자들이 투여될 수 있다. 헤파리과 같은 다당류 또한 투여될 수 있다.

다른 치료학적 제제로는 조직 플라스미노겐 활성화제(t-Pa), 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 카탈라제 황체형성 호르몬 분비 호르몬(LHRH) 길항제, IL-11 혈소판 인자, IL-4 수용체, 엔브렐(enbrel), IL-1 수용체 길항제, TNF 수용체 융합 단백질, 거핵세포의 성장 및 발달 인자(MGDF), 스템젠(stemgen), 인체에 맞게 가공된 단일클론 항체인 항-HER-2와 항 VEGF, 항-Tac 항체, GLP-1아밀린 및 GLP-1 아밀린 유사 물질이 포함된다.

부가적인 치료학적 제제들로는 심방성 나트륨배설증가 인자, 심방성 나트륨배설증가 펩타이드, 베타-사람 융모성 성선자극호르몬, 섬유모세포 성장 인자, 소(牛)의 성장 호르몬, 뼈의 형태발생 단백질, B세포 자극 인자-1, B세포 자극 인자-2, 소의 성장호르몬, 종양 파괴 인자(Carcinobreaking factor), 연골 유도 인자, 부신피질자극호르몬 분비 인자, 콜로니 자극 인자, 분화 인자-1, 내피 세포 성장 인자, 적혈구 분화 인자, 신장 인자 1-알파, 표피의 성장 인자, 에리트로포이에틴, 섬유모세포 성장 인자, 여포 자극 호르몬, 과립형 콜로니 자극 인자, 신경교의 원성유성 산성 단백질, 성장 호르몬 분비 인자, 인체의 알파-1 항트립신, 인체의 심방성 배설증가 인자, 인체의 융모성 성선자극호르몬, 인체의 성장 호르몬, 인체의 백혈병 억제 인자, 적혈구 조혈인자-1, 간세포 성장 인자, 인체의 변형 성장 인자, 인체의 갑상선 자극 호르몬, 인터페론, 면역 글로불린 A, 면역 글로불린 D, 면역글로불린 E, 인슐린 유사 성장 인자-1, 인슐린 유사 성장 인자-2, 면역글로불린 G, 면역글로불린 M, 인터류킨-1, 인터류킨-2, 인터류킨-3, 인터류킨-4, 인터류킨-5, 인터류킨-6, 신장의 플라스미노겐 활성화제, 렉틴 세포 고착 분자, 황체형성 호르몬, 백혈병 억제 인자, 단일클론성 항체, 대식세포 활성화 인자, 대식 세포의 세포 독성 인자, 대식 세포의 콜로니 자극 인자, 거핵세포의 콜로니 자극 인자, 종양괴사성 인자, 대식세포 억제 인자, 멀러리안(mullerian) 억제 물질, 거핵세포 자극 인자, 엘라닌 세포 자극 인자, 뉴트로필 케마타틱 인자 (neutrophil chematactic factor), 신경 성장 인자, 신규한 플라스미노겐 활성화제, 비 스테로이드 계의 항염증제, 골형성 인자 추출물, 항종양 림포카인, 전립선-특이적 항원, 항-혈소판 활성화 인자, 플라스미노젠 활성 억제제, 혈소판-파생 성장 인자, 혈소판-파생 상처 치료제, 혈장성 인체 인터류킨 유도 단백질, 종양 혈관형성 인자, 조직 통제 인자, T 세포 성장 인자, T세포 조절 단백질, 변형 성장 인자, 종양 성장 억제제, 종양 억제 인자, 메탈로프로티나아제의 조직 억제제, 종양 괴사 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 혈전형성제, 갑상선 자극 호르몬, 유로키나제-플라스미노겐 활성화제, 혈관분포성 내피성장 인자, 및 혈관작용성 장 펩타이드를 포함한다.

예로 들만한 진단제는 가스 및 양전자 방사 단층촬영(PET), 컴퓨터 단층촬영(CAT), 단일 양자 방사 컴퓨터 단층촬영, X-ray, 형광 투시법 및 자기 공명 영상(MRI)에서 사용되는 다른 시판중인 조영제들을 포함한다. MRI에서 대조 약제(contrast agent)로서 사용되는데 적합한 물질로는 가돌리니움 킬레이트 뿐만 아니라, 철, 마그네슘, 망간, 구리 및 크롬의 킬레이트가 포함된다. CAT 와 X-레이에 유용한 물질들의 예로는 요오드기를 가진 물질들이 포함된다.

생물학적으로 바람직한 활성물질은 단백질이다. 단백질은 100개 또는 그 이상의 아미노산 잔기들로 구성된 것을 말한다; 펩타이드는 100개 미만의 아미노산잔기들로 구성된다. 달리 언급하지 않는 한, 단백질이라는 용어는 상기 단백질 및 펩타이드 양자를 모두 일컫는다. 단백질은, 예를 들어, 천연 자원으로부터 분리해내거나 재조합시킴으로써 생산될 수 있다. 예로써는 인슐린과 사람의 성장 호르몬 및 소의 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬을 포함하는 기타의 호르몬을 포함한다. 다른 예로들만한 단백질로는 VIII인자, IX인자, VIIa인자 및 인터류킨-4를 포함한 인터류킨, NSAID 또는 코르티코스테로이드와 같은 소염제를 포함한다. 다른 예로들만한 단백질로서는 DNase 및 프로타아제 같은 효소를 포함한다. 또 다른 단백질로서는 사이토카인, 인터페론 알파 및 인터페론 베타를 포함하는 인터페론, 포이에틴, 콜로니-자극인자, 성장 인자, 세레다제, 지베렐린, 오옥신 및 비타민 및 이들의 단편들을 포함한다. 예로들만한 성장인자들로는 맥관 내피의 성장인자(VEGF), 내피세포 성장인자(EGGF), 기본(초기) 섬유아세포 성장인자(bFGF), 및 혈소판에서 파생된 성장인자(PDGF)를 포함한다.

단백질은 본 발명의 히드로겔에서 안정하다. 예를 들어, 다수의 단백질들이 하기 실시예에서 설명하는바와 같이, 이량중합 또는 응집으로부터 보호된다. 단백질 또는 펩타이드의 효소에 의한 분해는

펩티다아제-억제제들을 함께 혼합시킴으로써 보다 최소화 될 수 있다.

투여의 경로( Routes of Administration)

흡입( Inhalation)

본 발명에서의 히드로겔 입자(particle)의 용도는 폐로의 약물의 전달을 향상시키는 것이다. 폐로의 약물 투여는 폐의 조직층을 통과하여 순환계로 운반될 수 있는 약물을 전달하는것으로, 이는 1997년 7월 18일 발행된 미국 특허출원 제 60/053,029호에 기록되어 있다.

활성물질을 폐로 이동시키는데 있어 문제점은 폐의 대식세포가 상기 활성물질들을 취하여, 상기 활성물질들이 조직 및 국부 순환계로 투입되는 것은 막는다는데 있다. 흡수는 그 입자의 표면에 흡착된 단백질이 대식세포의 표면에서 수용체와 결합할 때 일어난다. 흡수를 막기 위해서, 당해 발명은 비이온성 히드로겔, 예를 들어 폴리 에틸렌 글리콜기를 가진 중합체로 형성된 비이온성 히드로겔을 제공한다. 이 히드로겔은 소량의 단백질을 흡수하므로 세포 표면에 거의 부착되지 않는다. 예를 들어 폴리알킬산으로 형성된 것과 같은 음이온성 히드로겔도 비교적 소량의 단백질을 흡수하기 때문에 세포표면에 거의 부착되지 않는다.

본 발명의 추가의 구체예에서, 미국 특허 5,380,536호에 기술된 바와 같이, 생체적합성을 가진 마이크로캡슐이 제조될 수 있으며, 세포 정착에 대한 저항력을 주기위해 그 표면은 폴리에틸렌 옥사이드(PEO)같은 수용성 비이온성 중합체로 처리될 수 있다.

입자들의 크기와 밀도 또한 폐로 이동될 활성 물질의 양을 최대화시키기 위하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 대식세포는 큰 입자들을 작은 입자만큼 능률적으로 흡착하지 못할 것이다. 그러나, 큰 입자들은 작은 입자들만큼 깊게 폐 속으로 전달되지는 못한다. 이러한 상충되는 요소들을 해결하기 위해, 본 발명은 수화될 경우 팽창할 수 있는 작은 입자들을 제공한다. 입자들은 작고(즉, 1-5 um), 건조한 또는 약간 젖은 입자 상태로 폐의 깊은 곳에 투입된다; 수화될 경우, 상기 입자들은 팽창되는데, 이로써 폐의 대식세포에 의해 흡착되는 것을 방지할 수 있게 된다. 팽창은 입자들이 건조한 상태에서부터 수화될 때/ 그리고 온도 변화, pH, 염농도(salt concentration), 또는 예를 들어 히드로겔 중합체의 화학적 및 물리적 성질에 의존하는 다른 용매, 의 존재에 의해 하나의 수화된 상태에서 다른 수화된 상태로 변화될 때 일어난다.

본원에서 사용된, '건조한(dry)'이라는 용어는 분말의 입자들을 에어로졸을 형성시키는 흡입 기구내에서 즉시 분산될 수 있는 것과 같은 정도의 함유량을 갖는 상태를 의미한다. 바람직하게는, 입자의 함유량은 10중량% 미만이고, 더욱 바람직하게는, 5중량% 미만, 또는 임의로 2중량% 미만 이거나 더 낮을 수 있다.

입자의 밀도는 탭 밀도(tap density)로 표현된다. 탭 밀도는 밀봉 질량 밀도(Envelope mass density)의 표준 척도이다. 등방성 입자의 밀봉 질량 밀도는 입자의 질량을 입자를 내포할 수 있는 최소 구형 밀봉 부피로 나눈 값으로 정의 된다. 입자의 밀도는 GeoPyc(Micrometer Instrument Corp., Norcross, GA)또는 Auto Tap(Quantachrome Corp., Boyton Beach, FL)을 사용하여 측정할 수 있다.

예를 들어, 3.4KL5입자들의 밀도는 다음과 같이 측정될 수 있다. 3.4KL5(1.0025 g)과, 200mM TE0A를 함유하는 PBS pH7(1.0260 g) 그리고 1000ppm Eosin(0.1028 g)를 혼합하였다. 이 용액 200mg과 탈크(1.1015 g)을 혼합했다. 그 결과 수득된 현탁액을 100uL 유리 피펫에 취하여 광선으로 15초 동안 중합시켰다.(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics). 이후 막대(rod)를 밀어 빼내어, 알루미늄 호일에 취한뒤, 3.5분 정도 더 중합시켰다. 경화된(hardened) 막대를 18시간동안 냉동 건조시켰다(vacuum 15E-3 mbar, trap temp. 50 C). 건조된 (함수량 <10%)막대를 작은 조각으로 잘라, 헤파에 넣어, 균질화기(homogenizer Silverson L4RT-A)를 이용하여 5,000 rpm에서 작은 입자로 잘게 분쇄하였다. 젖은 입자들을 공기-건조시킨후, 질소 가스 기류에 의해 건조시켰다. 입자의 크기는 1 um- 0.5 um이었다.

이 입자들중 1.645 g을 10mL 눈금이 있는 실린더에 취하였다. 눈금 실린더를 Autotap밀도계(Quantachrome) 꼭대기에 세웠다. 샘플을 100번 태핑하여 입자의 부피를 읽었다. 부피의 변화가 관찰되지 않을때까지 상기 과정을 반복하였다. 최종 부피는 2.8 mL였다. 입자의 탭 밀도는 1.6435 g/2.8 mL= 0.5870 g/mL였다.

입자 뿐만 아니라, 중합체도 폐의 깊은 곳까지 전달되는데 적합한 형태를 가질 수 있다. 예를 들어, PEG 유액 마이크로스피어는 고압 진공하에서 평평한 판위에 아주 가볍고 얇은 층, 예를 들어, 눈(snow)의 박편의 두께(consistency)정도의 얇은층을 형성하는데, 이것은 기압 경도력에 대해 다르게 반응한다. 결과물인 얇은 박편의 두께는 0.01 um, 1 um, 또는 10 um이다. 입자들은 단독으로 호흡기 관에 투여될 수도 있고, 또는 염수와 같은 액체 또는 분말(powder) 형태의 제약학적 적용가능한 부형제 내에 담지되어 투여될 수도 있다. 에어로졸 용량, 제형 및 전달 시스템은 특별한 치료학적 적용을 위해 선택될 수 있는 바, 이는 치료약물 운반시스템에 관한 고찰(1990년 6:273-313)에 실린 Gonda, I. 의 기도(respiratory tract)의 치료제 및 진단제 전달용 에어로졸; 그리고 Aerosols in Medicine에 실린 Moren의 에어로졸 투여 유형(forms) 및 조제물(Principle, Diagnosis and Therapy, Moren, et al., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1985)에 기술되어 있다.

폐로의 약물전달은 액상 분무기(liquid nebulizer), 에어로졸-기준 측정 투여량 흡입 기구(aerosol-based metered dose inhalers), 건조(dry) 분말 분산 장치들과 같은 기구를 이용할 수 있을 것이다. 건조 분말 분산 장치의 이용에 있어서, 치료제와 결합하는 중합체 입자는 예를 들어, 냉동 건조법 또는 분무-건조법에 의하여 제조된 건조 분말이다. 분무 건조법에 의해 생산하는 방법, 제약학적 허용 가능한 양의 치료제를 포함한 조제물에 기초를 둔 건조 분말과 담체는 PCT WO 96/32149에 기술되어 있다.

폐에 투여할 수 있는 약의 예로서는, 인슐린, 안티트립신, 칼시토닌, 알파 인터페론, 베타 인터페론, GLP-1, 및 DNase를 포함하나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

코를 통한 전달(Nasal Delivery)

본 발명의 조성물은 또한 화합물을 코를 통해 투여하는 데에도 이용할 수 있다. 예를 들어, 냉동 건조시키거나 재구성한 마이크로스피어를 포함하는 백신을 코에 투여할 수 있다.

근육 및 피하 투여

본 발명의 제제는 수일에서 3개월에 걸쳐서 분해되는 마이크로스피어를 근육 주사 및 피하 주사를 통해 투여하는데 사용할 수 있다.

예를 들어, 성장 호르몬은 피하를 통해 투여할 수 있다; 상기 호르몬은 분해시 주사 부근에 있는 마이크로스피어를 빠져 나온다. 성장 호르몬은 조직순환계로 들어가, 이후, 그곳에서 직접적으로 그 효과를 발휘하고, 간접적으로는 간에서 소마토메딘 생산을 하도록 유도한다. 이를 적용하기 위해서는, 크기가 0.5 mm이하인 입자가 사용될 수 있다.

다른 구체예로서는, 활성 제제가 테타누스 백신과 같은 백신이거나, 다른 단백질 또는 펩타이드, 더욱 복잡한 면역원(immunogen)일 수 있다. 백신은 일주일에서 수 주에 걸쳐 분비되며, 그 백신에 대한 면역응답을 개선시키게 되는데, 이는 면역원을 동일 총량으로 1회 이상 추가 자극 주사하는 볼루스 주사(bolous injection)와는 비교되는 점이다. 상이한 종류의 마이크로스피어를 혼합시키면 초회 면역화 뿐만 아니라 추가 자극 면역화도 가능하다.

정맥 투여

혈우병에 있어서의 VIII인자 또는 IX인자와 같은 혈액 응집 이상을 치료하는데 유용한 약물을 함유한 히드로겔 마이크로스피어는 정맥 주사를 통해 투여될 수 있다. 약물은 수 일에서 수주에 걸쳐 방출된다. 그 약물이 치료에 적합한 양으로 유지되고 그 결과 더 좋은 임상 결과를 이끌어내게 된다. 게다가, 잠재적으로 약물의 더욱 낮은 총 투여량은 경제적인 이윤 정도에 상응하여 조절할 수 있다. 이러한 접근방식들은 환자를 순응시키는데 도움을 준다.

정맥 주사의 경우, 마이크로스피어는 응집되거나 혈액 세포를 방해하지 않으므로 적용 가능한 약제 내의 마이크로스피어를 조제하는 것이 중요하다. 마이크로스피어는 적당하게 크기에 따라 분류하여야 하며, 그래야 모세혈관 안이 막히지 않는다. 이를 적용하기 위해서는, 입자의 크기는 0.2-0.5 μm가 바람직하다. 많은 염증성 질환에 있어서, 셀렉틴 및 ICAM 발현/호중구 인트라베이션에 의한 결합에 의해 매개되는 염증 반응의 일환으로, 염증 부위의 혈관이 누설된다. 히드로겔 마이크로스피어가 투여될 수 있는데; 상기 마이크로스피어들은 염증이 난 곳에서 혈관으로부터 흘러나온 후 운반한 약물을 국부적으로 상당 기간 분비한다. 이 방법이 유용하게 쓰일 수 있는 질병에는 염증을 수반하는 장 질병, 천식, 류마치스성 관절염, 골관절염, 폐기종 및 섬유증(효소제제로서 DNase와 함께)이 포함될 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

암 치료를 위한 사이토키닌, 림포카인, 또는 다른 화합물을 포함하는 히드로겔 마이크로스피어는 정맥 주사를 통해 투여될 수 있다. 크고 단단한 종양내의 혈관은 일반적으로 누수성이 있으며, 그 종양내의 혈류는 보통 느리다. 그러므로, 마이크로스피어를 단단한 종양들 내부에 채우고 항암제를 국부적으로 분비시키면, 종양세포를 직접적으로 죽이거나 또는 면역 체계를 국부적으로 촉진시켜 종양세포를 파괴시킬 수 있다. 이러한 접근방법은 전신적 또는 국부적 독성으로 인해 투약이 제한되거나 심각한 부작용이 있는, 인터루킨-2와 같은 화합물의 전달에 이용될 수 있다.

본 발명의 마이크로스피어는 순환계로부터 상대적으로 느리게 제거된다. 이와는 달리, 마이크로스피어는 누수성 혈관 또는 더욱 활성이 뛰어난, 예를 들어 수용체 매개성 타겟팅 메커니즘(targeting mechanism)을 통하여 순환계를 빠져나가도록 타겟 될 수 있다.

경구 투여

위장관중 일부는, 위장점막을 통과하여 전신 및 국부 순환계로 단백질을 운반하기가 상대적으로 수월하다. 따라서, 본 발명의 조성물, 예를 들어 단백질을 함유하는 냉동건조된 마이크로스피어들(아주 작은 입자 크기의)은 약물을 함유하는 마이크로스피어들을 효소의 공격 및 상부 위장관 내의 낮은 pH로부터 보호하는 적절한 장용 제형(entric formulation)의 형태로 경구 투여될 수 있다. 이러한 장의 제형(entric formulation)은 또한 장 내의 캡슐이 위장관을 지나면서 약물-함유 마이크로스피어를 서서히 방출시키는 몇가지 유용한 기술을 이용하여 고안되었다. 이것은 가출원 USSN 60/053,029와 Mathiowitz et al., Nature 386(6623): 410-414(1997)에 보다 상세히 기술되어 있다. 이 방법은 단백질 및 다른 분자들, 심지어 작은 분자들을 경구를 통해 운반시키는 다른 방법들보다 많은 이점을 가질 것으로 예상된다. 첫째로, PEG와 단백질은 서로 혼화성이기 때문에 다른 약물 운반 방법에서 발견되는 주요 제조상 및 안정성에 관한 문제점을 피할 수 있다. 둘째로, 건조된 히드로겔은 습윤 조직에 대해 점착도가 매우 높다. 그 미세 입자들은 GI관에 잘 붙어서 위장 순환계를 통해 조직에 운반되거나 그 내용물을 위장점막에 분비할 것이다; 이후 약물은 조직과 위장 순환계로 들어가게 될 것이다. 화학적 강화제(enhancer), 또는 GI관을 통한 조직 순환계로의 운반이 용이하도록 특정 및 불특정 생물학적 운반 메커니즘을 활용한 화합물을 포함하는 조제물(formulation)도 물론 포함될 수 있다.

타겟팅 (Targeting)

타겟팅 리간드(targeting ligand)는 입자상의 반응성 관능기를 통해 입자들에 부착될 수 있다. 타겟팅 리간드는 입자와 폐 내부 또는 신체의 미소혈관계속 다른 지점의 특유한 내피 세포상의 특정 수용체 지점간의 결합 상호작용을 가능하게 한다. 타겟팅 리간드는 특정하게 또는 불특정하게 어느 특정의 타겟에 부착되도록 선택된다. 예로 들만한 타겟팅 리간드는 목표 세포의 표면에 존재하는 특정 수

용체에 부착될 수 있는 항체 가변부위(antibody variable regions), 렉틴, 호르몬, 또는 다른 유기 분자들을 포함하는 항체의 절편 및 항체를 포함한다. 다른 리간드는 Science, Vol. 279, 323-324(1998)에 기술되어 있다.

마이크로스피어는 약제와 타겟팅 분자 모두로부터 만들어 질 수 있다. 또한 이중 마이크로스피어는 약물을 함유하는 내부 공간과 타겟팅 분자 또는 시약을 함유하는 외부의 PEG 껍질의 형태로 제조될 수도 있다.

몇몇 응용예에서 부형제들은 일정하게 폐에 전달되도록 안정성, 분산성, 경도 및 벌킹을 향상시킬 수 있도록 선택될 수 있다. 이러한 부형제들은 예를 들어, 사람 혈청 알부민(HSA), 탄수화물, 아미노산, 펩타이드, pH 조절제, 또는 버퍼 와 같은 부피 조절제(bulking agent) 및 염일 수 있다. 추가의 부형제들은 아연, 아스코르브산, 만니톨, 수크로오스, 트레할로스, 시클로덱스트란, 폴리에틸렌 글리콜, 및 United States Pharmacopeia Convention, Inc에 의해 출판된 미합중국 약전(1995, pp. 2205-2207)에 수록된 것들을 포함하는 기타의 흔히 이용되는 제약학적 부형제들을 포함한다. 탄수화물의 예를 들면 갈락토오스와 같은 단당류, 및 락토오스와 같은 이당류를 포함한다. 단백질들을 안정화하는 부형제들이 특히 유용하다.

몇몇 경우에, 부형제들은 담체(carrier)로 이용된다; 즉, 그들은 활성 화합물들의 방출속도를 조절하는데 이용된다. 예를 들어, 만니톨은 방출을 가속화하거나 지연시키기 위해 이용될 수 있다.

이하에서 본 발명의 조성물들의 제조 및 본 발명의 방법의 실시예들을 상세히 설명한다. 이러한 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.

이하의 몇몇 실시예에서는 아크릴레이트-PLA-PEG-PLA-아크릴레이트의 3원 ABA 블록 공중합체로 만들어진 마크로머가 이용되었다. PEG는 3,400의 분자량을 갖고; 양 측면의 폴리(락트산)은 각 측면 마다 약 5 락테이트 유닛의 평균을 갖는다. 따라서, 본원에서는 이들을 '3.4KL5'로 칭한다. 2,000과 같은 저분자량 PEG가 이용되는 경우, 수득되는 마크로머는 '2KL5'로 칭한다.

다른 실시예에서는 아크릴레이트-PCL-PEG-PCL-아크릴레이트 마크로머가 이용되었다. PEG는 3,400의 분자량을 갖고 각 측면이 평균 6 카프로일(caproyl) 유닛인 폴리카프로락톤을 양 측면에 갖는다. 상기 폴리머를 이하에서는 '3.4KC6'이라 한다.

본원에서 설명된 모든 동물연구들은 국제 동물 보호 및 이용 위원회의 승인하에 수행되었다.

### 실시예

#### 실시예 1; 마크로머 용액의 일반적인 제조

단백질을 평량하고 이하의 성분들을 단백질에 첨가하였다: (i) 90mM TE0A/PBS, pH 8.0; (ii) 35% n-비닐 피롤리돈(n-VP); 및 (iii) 1000 ppm Eosin. 결과로 수득한 혼합물을 약주걱(spatula)을 이용하여 교반하였다. 용액을 양소에서 10분간 놓아 두거나 마크로머가 용액을 모두 흡수할 때까지 또는 용액이 균질해질 때까지 놓아 두었다.

아래와 같은 성분들을 갖는 마크로머 용액들을 제조하였다:

단백질 양	90 mM TE0A의 양	35% n-VP의 양	1000 ppm Eosin의 양	3.4KL5의 양	2KL5의 양	총량
15 mg	57 mg	15 mg	3 mg	45 mg	0 mg	135 mg
15 mg	57 mg	15 mg	3 mg	0 mg	45 mg	135 mg

#### 실시예 2; 수용성 마크로머로부터의 히드로겔의 제조

0.5g의 3.4KC6를 20cc의 신틸레이션 바이알에 넣고, 0.5ml의 20mM TE0A, pH 6.95/PBS 버퍼에 가하여 마크로머들이 팽윤되도록 놓아 두었다. 이어서 마크로머들을 균일한 혼합물이 될 때까지 혼합하였다. 이러한 혼합물에 PBS내의 1000 ppm Eosin 용액 20 $\mu$ l, 10 $\mu$ l의 35% n-VP 용액, 및 0.0845g ZnST를 가하였다.

그 결과로 수득한 용액을 실란화된 유리 슬라이드위에 올려 놓았다. 약 0.4±0.2mm 두께의 플라스틱 시이트 조각들을 스페이서로 이용하여, 다른 실란화된 유리 슬라이드를 그 위에 올려 놓고 바인더 클립을 이용하여 확실하게 고정하였다.

클램프 및 스탠드를 이용하여 광원(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics)을 광원으로부터 유리 슬라이드까지의 조사 거리가 약 5cm가 되도록 조정하였다. 디스크의 양 측면을 각각 2분씩 조사하여 불투명한 디스크가 형성되게 하였다.

#### 실시예 3: 수용성 및 불수용성 마크로머의 50:50 블렌드로부터의 히드로겔의 제조

0.56g의 3.4KL5 및 0.56g을 신틸레이션 바이알에 담았다. 이 바이알을 52°C 오븐에 넣어 두었다: 혼합물을 균일한 혼합물이 될 때까지 간헐적으로 혼합하였다. 이어서 실온으로 냉각시켰다. 0.5g의 상기

혼합물에 0.5ml의 200mM TE0A 및 pH 6.95/PBS 버퍼를 가하였다. 그 결과로 수득한 마크로머를 평운되도록 놓아 두었다.

일단 평운되면, 마크로머를 가루 반죽 같은 정도의 균일한 조성물이 될 때까지 혼합하였다. 이러한 조성물에 20 $\mu$ l의 1000-PPM Eosin 용액/PBS, 10 $\mu$ l 35% n-VP 용액, 및 0.0845g의 ZnBST를 가하였다. 그 결과 용액을 교반한 후, 실란화된 유리 슬라이드위에 올려 놓았다. 약 0.4 $\pm$ 0.2mm 두께의 플라스틱 시이트 조각들을 스페이서로 이용하여, 다른 실란화된 유리 슬라이드를 그 위에 올려 놓고 바인더 클립을 이용하여 확실하게 고정하였다.

광원(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics)을 약 5cm 거리로 조정하였다. 디스크의 중앙을 조사하였다; 디스크의 양 측면을 각각 2분씩 조사하여 불투명한 디스크가 형성되게 하였다.

실시예 4: REDOX 개시 시스템(REDOX Initiating system)을 이용한 마이크로스피어의 제조

300mg의 3.4KL5를 0.5%의 과황산 암모늄을 포함하는 PBS 1ml에 용해시켰다. 30ml의 실리콘 오일(100 cp)를 질소로 탈기시켰다. 마크로머를 포함하는 0.25ml의 수성 매질을 오일에 첨가하여 5/8인치 헤드 가 장착된 Silverson 호모제나이저를 이용하여 2000rpm으로 교반하였다. 화합물을 강하게 5분간 교반한 후, 0.5ml의 테트라메틸에틸렌 디아민을 가하였다. 그 결과로 수득한 에멀전을 30분간 교반하였다. 30분 경과후, 20ml의 헵탄을 가하였다. 그 결과 현탁액을 2000rpm으로 2분간 원심분리하여 마이크로스피어들을 원심분리 튜브 바닥으로부터 회수하였다. 수득한 마이크로스피어들을 위상차(phase contrast)를 이용하여 광 현미경@400X를 이용하여 분석하였다. 평균 마이크로스피어 크기는 2.5 $\mu$ m인 것으로 확인되었다.

실시예 5: bST의 장기 방출(Long Term Release)

디바이스 제조: 분해성(degradable) 마크로머(3.4KL5)와 비분해성(non-degradable) 마크로머(PEG-디아크릴레이트, MW 3,400)의 블렌드를 이용하였다. 단백질로는 ZnBST(Monsanto/Protiva)를 이용하였다. 단백질을 건조중량 기준 20%의 로딩(loading)으로 로딩하였다. 3개의 샘플들을 다음과 같이 제조하였다:

샘플 제조: 20 $\mu$ l의 bST-전구체 용액을 실시예 1과 같이 하여 제조하였다. 혼합물을 실란화 유리 팁(silanized glass tip)을 갖는 양성 변위 파이펫(positive displacement pipette)을 이용하여 파이펫하였다. 용액을 실란화 유리 슬라이드 위에 올려 놓았다. 약 0.4 $\pm$ 0.2mm 두께의 플라스틱 시이트 조각들을 스페이서로 이용하여, 다른 실란화된 유리 슬라이드를 그 위에 올려 놓고 바인더 클립을 이용하여 확실하게 고정하였다. 클램프 및 스탠드를 이용하여 광원(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics)을 유리 슬라이드로부터 약 5cm 거리가 되도록 조정하였다. 디스크의 중앙을 조사하고; 디스크의 양 측면을 각각 2분씩 조사하였다.

클립들, 유리 슬라이드, 및 스페이서들을 조심스럽게 제거하였다. 약주걱 및 핀셋으로, 디스크를 제거하여 깨끗하고, 용기 중량을 측정된 실란화 유리 슬라이드위에 올려 놓고 중량을 측정하였다. 디스크는 열-밀봉된 멤브레인 백(heat-sealed membrane bag) 안에 넣어 두었는데, 이 방법은 이하에서 더욱 상세하게 설명한다. 하나의 20 $\mu$ l 디스크를 각 백 안에 넣었다. 백을 열-밀봉하고, 100rpm으로 회전하는 오비탈 셰이커위에 올려진 2.0ml의 인산염 버퍼 방출 배지(phosphate buffer release media)(0.01% NaNO<sub>3</sub>, 0.05M PBS, pH 7.4)에 넣어 39°C에서 인큐베이션하였다.

각 시점에서, 백을 새로운 2.0ml의 PBS 방출 배지내에 위치시켰다. bST가 방출되는한 매일 샘플들을 회수하여 분석하였다.

멤브레인 백을 다음과 같이 제조하였다. 막 시이트를 약 7 $\times$ 2.5cm 조각들로 절단하였다. 시이트들을 반으로 접었다. Bunsen 버너 또는 프로판 토치를 이용하여, 약주걱을 적색이 될 때까지 가열하였다. 측면들을 밀봉하기 위해, 시이트들의 모서리 부분들을 나란히 정렬시키고, 막의 측면을 빨갈게 달구어진 핀셋으로 컷하였다. 디스크를 일단 백에 넣은 후, 맨끝 측면을 동일한 가열-밀봉 기술에 의해 밀봉하였다.

샘플들을 매일 SEC-HPLC에 의해 분석하였다. 단량체, 이량체, 및 가용성 응집체(soluble aggregates)들은 이 방법에 의해 검출될 수 있다. 이동상(mobile phase)으로는 1.5ml/min의 유속의, pH 2.0으로 조절된 아이소크라틱(isocratic)인, 60/40% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O내의 0.08M TFA를 이용하였다. 신호는 220nm 파장에서 검출하였다. 컬럼으로는 가드 컬럼(Bio-Rad Bio-Sil<sup>®</sup> SEC250 Guard, 5 $\mu$  입경, 80 $\times$ 7.8mm ID)이 장착된 Bio-Rad Bio-Sil<sup>®</sup> SEC250, 5 $\mu$  입경, 300 $\times$ 7.8mm ID를 이용하였다. 주사 부피는 10 $\mu$ l이었다. 표준 보정 곡선은 이동상내의 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 및 1 mg/ml bST이었다.

결과는 도 3에 도시하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, bST는 14일에 걸쳐 방출되었다. 이량체 또는 가용성 응집체는 방출 배지내에서 검출가능한 수준으로 나타나지 않았다. 처음 2일간은 12%의 최소 초기 방출이 있었고, 뒤이어 중간 방출속도의 방출이 관찰되었다.

실시예 6: 인슐린의 단기 방출(Short Term Release)

디바이스 제조: 분해가능한 마크로머(3.4KL5)를 이용하였다. 단백질로는 Zn-인슐린(시그마로부터 구매)을 이용하였다. 단백질을 건조 중량 기준 47%의 로딩(loading)으로 로딩하였다. 3개의 샘플들을 제조하였다.

샘플들을 실시예 4에서 설명된 것과 같이 제조하였다. 샘플들을 단량체, 이량체, 및 가용성 응집체의 검출을 위해, 실시예 5에 기술된 조건을 이용하여 SEC-HPLC에 의해 분석하였다.

결과는 도 4에 도시하였다. 인슐린은 24 시간에 걸쳐 방출되었다; 이량체 또는 가용성 응집체

는 검출되지 않았다. 완전한 방출(100%)은 24시간 이내에 이루어졌다.

실시예 7: 가용성 및 불용성 마크로머들의 블렌드로부터의 약물 방출

디바이스들은 상술한 바와 같이 제조하였다. 가용성 마크로머(3.4KL5) 및 불용성 마크로머(3.4KC6)의 블렌드를 포함하는 마크로머들을 50:50으로 이용하였다. 단백질은 ZnbST(Protiva/Monsanto)를 이용하였다; 단백질을 건조중량 기준으로 25% 로딩으로 로딩하였다. 6 샘플들을 제조하였다. 샘플들을 상술한 바와 같이, SEC-HPLC에 의해 분석하였다. 샘플에 단량체, 이량체, 및 가용성 응집체들이 존재하는지 모니터하였다.

결과는 도 5에 도시하였다. ZnbST의 방출은 20일만에 걸쳐 관찰되었다: 매우 낮은 농도(2% 미만)의 이량체 또는 가용성 응집체가 검출되었다. 또한, 초기대량 방출(initial burst release)은 관찰되지 않았다.

실시예 8: 불용성 및 가용성 마크로머들의 블렌드로부터의 약물 방출

디바이스들은 상술한 바와 같이 제조하였다. 가용성 마크로머(3.4KL5) 및 불용성 마크로머(3.4KC6)의 블렌드를 포함하는 마크로머들을 75:25로 이용하였다. 단백질 ZnbST(Protiva/Monsanto)를 건조중량 기준으로 25% 로딩으로 로딩하였다. 6 샘플들을 제조하였다. 샘플들을 상술한 바와 같이 단량체, 이량체, 및 가용성 응집체들을 검출하기 위해 SEC-HPLC에 의해 분석하였다.

결과는 도 6 및 도 7에 도시하였다. 장기간의 ZnbST의 방출이 17일만에 걸쳐 관찰되었다: 방출 13일 이내에, 혼합된 ZnbST의 90%가 방출되었다. 매우 적은 이량체 또는 가용성 응집체가 검출되었다.

실시예 9: 하이포피섹토마이즈된 쥐(Hypophysectomized Rats)에서의 소 소마토트로핀(Bovine Somatotropin)의 느린 방출

활성 소 소마토트로핀(MW 20Kd)의 느린 전달(controlled delivery)을 하이포피섹토마이즈된 쥐 모델에서 확인해 보았다. 하이포피섹토마이즈된 암컷 쥐를 Taconic Labs(Germantown, NY)로부터 구매하였다. 매일 아침 쥐들의 체중을 측정하였다. 연구 개시 이전에, 쥐들의 성장이 없음을 확인하기 위해 7일간 유지하였다. 연구 제 1일에, 쥐들의 체중은 118±1.5 그램(평균±표준편차, n=18)이었다. 쥐들을 평균 중량이 동일한 3 그룹으로 분류하였다. 그룹 1은 처리하지 않은 그룹으로 음성 대조구으로 이용하였다. 그룹 2에는 3:1 비율의 3.4KL5 및 PEGDA의 블렌드로 이루어진 히드로겔 형태의 bST 임플란트를 이식하였다(각 디바이스는 0.9 내지 1.1 mg의 bST를 포함하였다). 3번째 그룹의 쥐들에게는 연구기간 내내 매일 100µg의 bST를 피하에 주사하였다.

결과는 도 8에 나타내었다. 비처리 대조구 그룹은 연구 기간 중에 성장하지 않았고, 11일후 체중은 119±2.9 그램이었다. 연구기간 내내 매일 100µg의 bST를 투여받은 그룹 3의 쥐들은 지속적인 성장을 보였고 처리 11일후 체중은 151±4 그램이었다. 그룹 2의 쥐들은 그룹 3의 쥐들과 비슷한 속도로 성장하였고 11일 후 체중은 145±3.7 그램이었다(그룹 3과 비교시, p=0.32, t-test).

실시예 10: bST의 방출

약 30%(w/w)의 bST를 포함하는 마크로머 혼합물을 상술한 방법을 이용하여 제조하였다. 마크로머/단백질 혼합물을 내경이 1.12mm 또는 0.61mm인 유리 실린더안에 넣었다. 시스템을 20초간 빛에 노출시킨 후, 유리 실린더로부터 꺼내어, 알루미늄 포일에 올려 놓고, 추가로 3.5분간 빛에 노출시켰다. 그 결과로 수득한 히드로겔 실린더를 1m<sup>2</sup>의 방출 배지(release media)(PBS, pH 7.4)에 넣고, 방출된 bST 방출량을 HPLC로 모니터하였다. 초기 데이터는 직경이 큰 실린더로부터의 방출이 작은 직경의 실린더로부터의 방출에 매우 근접한다는 것을 가리킨다. 또한, bST 방출의 특성은 서방성 시스템의 분해/팽윤을 나타낸다. 시스템은 짧은 시간 간격 중에는 시간 t의 n승의 함수와 같은 방출 분율 M/M<sub>∞</sub>을 보였다:

$M/M_{\infty} = k't^n$ , 상기 식에서, k'는 시스템의 상수 특성(constant characteristic)을 나타내고, n은 수송 모드의 지수 특성(exponent characteristic)이다. n=5인 경우, 약물 방출은 픽-분산 메카니즘(Fickian-diffusion mechanism)을 따른다. n>5인 경우, 픽 거동이 아닌 방출 거동(non-Fickian behavior)이 관찰되었다.

도 9의 데이터는 부식/분산(erosion/diffusion) 방출 메카니즘에 대해 분석한 것이다. 큰 실린더는  $M/M_{\infty} = 1E-06t^2$ 의 값을 가졌고, 작은 실린더의  $M/M_{\infty}$  값은  $3E-05t^2$ 이었다. 따라서, n=2일 때, 픽 거동이 아닌 방출 거동(non-Fickian behavior)이 관찰되었다.

분산에 바탕을 둔 다른 분석에서, 실린더로부터의 유량(flux)을 다음과 같은 픽 식(Fickian equation)을 이용하여 분석하였다:  $J = D^*A \Delta C / \Delta X$ , 이 식에서 J는 유량이고; A는 표면적이며; C는 실린더 내의 농도이고; S는 중심으로부터의 거리를 나타낸다. 이러한 분석에서, 유량은 직경이 큰 실린더로부터 일어났던 직경이 작은 실린더로부터 일어났던 간에 현저하게 달라야 한다. 이론적인 분석에 따르면 픽 분산(Fickian diffusion)하에서, 작은 직경의 실린더가 20%를 방출했을 때, 큰 직경의 실린더는 7%의 약물을 방출할 것으로 예측되었다. 그러나, 실제로는 작은 직경의 실린더가 20%를 방출했을 때, 큰 직경의 실린더는 16%를 방출하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 픽 거동이 아닌 방출 거동(non-Fickian behavior)이 관찰되었다.

이러한 히드로겔 시스템에서, 초기 방출 상(initial release phase)은 수분 흡수(팽윤)를 포함하였다; 그 결과, 매트릭스내의 균일한 약물 농도 거동은 S자형(semimoidal)으로 되었다. 실린더 중앙에는 높은 약물 농도가 존재하였고 디바이스의 가장자리에는 약물이 매우 적거나 거의 없었다. 이러한 실린더

시스템은 실린더의 직경에 관계없는 방출 카이네틱(release kinetics)을 제공한다. 이러한 현상에 대한 상세한 설명은 Ping I. Lee, 'Diffusion Controlled Matrix Systems,' in Treatise on Controlled Drug Delivery, Kydonieus, A., ed. pp. 155-197 (1992)에서 찾아 볼 수 있다.

실시에 11- 쥐에서 에리트로포이에틴의 느린 방출

활성 사람 에리트로포이에틴(EPO)의 느린 전달을 Taconic Labs(Germantown, NY)로부터 구입한 수컷 Sprague-Dawley 쥐에서 확인하였다. 히드로겔 디바이스는 디바이스당 3000 단위를 포함하도록 실시에 14에 기술된 대로 제조하였다. 이들 디바이스들은 비닐 피롤리돈 및 다른 중합성 모노비닐 단량체들이 존재하지 않는 상태에서 제조하였다. 디바이스들중 하나를 3마리의 쥐 각각에 이식하였다. 다른 3마리의 쥐들에게는 3일간 매일 EPO(1000 단위)를 피하주사하였다. 3마리의 대조구 그룹에게는 아무 처리도 하지 않았다.

디바이스 이식 및 피하 주사후 제 5일에, 각각의 쥐들로부터 정맥혈을 채취하여 EDTA내에 보관하였다. 아크리딘 오렌지로 염색한 후 망상적혈구(미성숙한 적혈구 세포)의 분율을 자동 유동세포분석(flow cytometry)에 의해 측정하였다.

결과는 도 10에 도시하였다. 도시된 바와 같이, 대조구 그룹의 쥐들은 약 2.5% 망상적혈구를 가졌다. 5일후 이식받은 쥐들은 약 12%의 망상적혈구를 가졌고 주사를 맞은 쥐들은 약 19%의 망상적혈구를 가졌다.

실시에 12: 당뇨병 쥐에서 인슐린의 느린 방출

Taconic Labs(Germantown, NY)로부터 Sprague-Dawley 쥐들을 구입하였다. 스트렙토조토신(65mg/kg, i.v.)을 처리하여 당뇨병을 일으키고, 48시간 경과후 혈중 글루코오스의 증가(>300 mg/dL)를 확인하였다. 쥐들을 펜토바비탈(35mg/kg)에 의해 마취시키고, 카테터를 경정맥에 삽입하였다. 혈중 글루코오스 농도의 측정을 위해 기준선 혈액 샘플을 취한 후, 1 단위의 인슐린을 포함하는 히드로겔 디바이스를 피하로 이식하였다. 비닐 피롤리돈, 및 기타 중합성 모노비닐 단량체가 존재하지 않는 상태에서 디바이스를 제조하였다. 혈액 샘플을 디바이스의 이식후 15, 30, 60, 120, 및 180분 후에 취하여 혈중 글루코오스 농도 측정에 이용하였다.

결과는 도 11에 도시하였다. 도시된 바와 같이, 혈중 글루코오스 농도는 감소하였다. 이것은 디바이스들이 활성 형태에서 인슐린을 방출시킬 수 있다는 것을 가리킨다.

폐 전달 시스템(pulmonary delivery system)을 시험하기 위해, 목을 중심선 절개에 의해 오픈하여 기관지를 블런트 절개(blunt dissection)에 의해 노출시켰다. 기관을 가느다랗게 절개하여 작은 폴리에틸렌 튜브를 폐안으로 밀어 넣었다. 소량의 인슐린-함유 히드로겔 미소입자들(총 용량은 3 단위 인슐린이었다)을 폐안에 주입하고 튜브를 제거하였다. 혈액 샘플들을 취하여 피하 디바이스에 대하여 상술한 바와 같이 분석하였다.

결과는 도 12에 도시하였다. 글루코오스 농도는 30분 이내에 급감하였고 적어도 180분간 낮은 상태(150mg/dL 미만)로 유지되었다.

실시에 13: 하이포피섹토마이즈된 쥐에 있어서의 사람 성장 호르몬의 느린 방출

활성 사람 성장 호르몬(hGH, MW 20Kd)의 느린 전달을 하이포피섹토마이즈된 쥐 모델에서 확인하였다. Taconic Labs(Germantown, NY)로부터 구매한 하이포피섹토마이즈된 암컷 쥐들의 체중을 측정하였다. 연구 개시 이전에, 쥐들의 성장이 없음을 확인하기 위해 7일간 유지하였다. 쥐들을 평균 중량이 동일한 3 그룹으로 분류하였다. 그룹 1은 처리하지 않은 그룹으로 음성 대조구으로 이용하였다. 그룹 2에는 3:1 비율의 3.4KL5 및 3.4KC6의 블렌드로 이루어진 히드로겔 형태의 hGH 임플란트를 이식하였다(각 디바이스는 1 mg의 hGH를 포함하였다). 3번째 그룹의 쥐들에게는 연구기간 내내 매일 100µg의 hGH를 피하에 주사하였다.

초기 결과는 이전의 bST에 의해 수득된 결과가 hGH를 이용한 경우 그대로 재현됨을 보여주었다. 비처리 대조구 그룹은 연구 기간 중에 성장하지 않았다. 연구기간 내내 매일 100µg의 hGH를 투여받은 그룹 3의 쥐들은 지속적인 성장을 보였다. 그룹 2의 쥐들은 그룹 3의 쥐들과 비슷한 속도로 성장하였다.

실시에 14: 마크로머로부터의 EPO의 방출

멸균된 20ml 바이알에 0.0330g의 TE0A(neat), 1.0076g의 3.4KL5, 0.0598g의 1000 ppm Eosin(PBS내, pH 7.0) 및 2.32g의 EPO 용액(10,000 단위/ml)를 넣었다. 비닐 피롤리돈 및 기타의 중합성 모노비닐 단량체들은 첨가하지 않았다. 그 결과로 얻은 혼합물을 혼합하여 광중합하였다(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics).

시험관내(in vitro) 방출속도를 디스크당 평균 2500 단위를 포함하는 3 디스크로부터의 방출속도를 평균 내어 구하였다. 방출은 39°C 하에서 4ml의 PBS(pH 7.4)내에서 이루어지게 하였다. 방출 배지는 매일 교환해 주었다. 분석은 크기 배제 크로마토그래피[size exclusion chromatography](HPLC; 물에 의해 모델 2690, 컬럼: BioRad에 의해 SEC 250, 이동상: 60% 아크릴로니트릴내의 0.8M TFA @1.5ml/min, 220nm 파장에서 검출)에 의해 행하였다.

결과는 도 13에 도시하였다. 도시된 바와 같이, EPO는 적어도 120시간 동안 방출되었다. 120 시간 후, 500 단위 이상의 EPO가 여전히 방출되었다.

실시에 15: 마크로머 입자들로부터의 인슐린 방출

멸균된 20ml 바이알에 0.2599g의 200mM TE0A(PBS 버퍼내, pH 7.0), 0.2548g의 3.4KL5, 0.0206g의 1000 ppm Eosin(PBS내, pH 7.0) 및 0.0615g의 인슐린(시그마)를 넣었다. 비닐 피롤리돈 및 기타의 중합성 모노비닐 단량체들은 첨가하지 않았다. 그 결과로 얻은 혼합물을 혼합하여 10ml의 유리 튜브에 넣었

다. 튜브를 크세논 광에 10초간 노출시켰다(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics). 변경화된-히드로겔을 유리 튜브로부터 꺼내어 3.5분간 더 중합시켰다. 경화된 히드로겔 로드를 15ml의 헵탄에 넣어 호모제나이저(Silverson L4RT-A)로 30초간 5000rpm으로 분쇄한 후, 30초간 3000rpm으로 분쇄하였다. 헵탄을 따라 버리고, 분말을 질소하에서 건조시켰다. 그 결과로 얻은 입자들의 크기는 2 mm부터 500mm까지 분포하였다.

입자들(16mg)을 다공성(0.8mm) '방출 백(release bag)'(실시에 5에서 설명)에 넣었다. 시험관내(in vitro) 방출량을 2개의 방출 백으로부터의 방출량을 평균내어 구하였다. 방출 백을 39°C 하에서 2ml의 PBS(pH 7.4)내에 넣었다. 방출 배지는 2시간 동안 매 15분마다 그 이후에는 매 30분마다 교환해 주었다. 분석은 크기 배제 크로마토그래피(HPLC; 물에 의해 모델 2690, 컬럼: BioRad에 의해 SEC 250, 이동상: 60% 아크릴로니트릴내의 0.8M TFA @1.5ml/min, 220nm 파장에서 검출)에 의해 행하였다.

결과는 도 14에 도시하였다. 도시된 바와 같이, 인슐린은 적어도 90분 동안 방출되었다. 90분후, 100µg의 인슐린이 여전히 방출되었다.

실시에 16: 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH)의 방출

20ml 바이알에 0.2599g의 200mM TE0A(PBS 버퍼내, pH 7.0), 0.2548g의 1KC3, 0.0206g의 1000 ppm Eosin(PBS내, pH 7.0) 및 0.0615g의 LHRH(시그마)를 넣었다. 비닐 피롤리돈 및 기타의 중합성 모노비닐 단량체들은 첨가하지 않았다. 그 결과로 얻은 혼합물을 두 개의 유리 시이트 사이에 넣어 크세논 광에 각각의 측면을 2분씩 노출시켰다(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics). 최종 히드로겔 시이트를 크리오-밀링(cryo-milled)하여 주사가 가능한 분말을 제조하였다.

실시에 17: 사람 성장 호르몬(hGH)를 포함하는 폐 디바이스(Pulmonary Device)

20ml 바이알에 0.2599g의 200mM TE0A(PBS 버퍼내, pH 7.0), 0.2548g의 3.4KL5, 0.0206g의 1000 ppm Eosin(PBS내, pH 7.0) 및 0.0615g의 hGH(Millipore Centricon<sup>TM</sup>에 의해 정제된, Genentech의 주사가 가능한 hGH 제형)를 넣었다. 비닐 피롤리돈 및 기타의 중합성 모노비닐 단량체들은 첨가하지 않았다. 그 결과로 얻은 혼합물을 교반하여 10ml의 유리 튜브에 넣었다. 튜브를 크세논 광에 10초간 노출시켰다(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics). 변경화된-히드로겔을 유리 튜브로부터 꺼내어 3.5분간 더 중합시켰다. 경화된 히드로겔 로드를 15ml의 헵탄에 넣어 호모제나이저(Silverson L4RT-A)로 30초간 5000rpm으로 분쇄한 후, 30초간 3000rpm으로 분쇄하였다. 헵탄을 따라 버리고, 분말을 질소하에서 건조시켰다. 그 결과로 얻은 입자들을 폐, 구강 또는 피하에 지속적으로 hGH를 전달하는데 이용하였다.

실시에 18: GLP-1의 방출

GLP-1(글루카곤 유사 펩타이드-1)은 타입 II 당뇨병의 치료에 유망한 것으로 입증된 펩타이드 약물이다. 20ml 바이알에 0.2599g의 200mM TE0A(PBS 버퍼내, pH 7.0), 0.2548g의 1KC3, 0.0206g의 1000 ppm Eosin(PBS내, pH 7.0) 및 0.0615g의 GLP-1을 넣었다. 혼합물을 두 개의 유리 시이트 사이에 넣어 크세논 광에 의해 각 측면을 2초간 중합시켰다(ILC Technology, Inc. Xenon Light Source with Fiber Optics). 최종 히드로겔 시이트를 크리오-밀링(cryo-milled)하여 주사가 가능한 분말을 제조하였다.

실시에 19: 단백질의 방출을 위한 경구용 제형

실시에 15의 방법을 이용하여, 인슐린, 사람 성장 호르몬, 사람 알파 인터페론, 또는 에리트로포이에틴 중 하나를 마크로머 입자(macromolecule particle)에 혼입시켰다. 실시에 15의 크리오밀링 또는 밀링 방법을 이용하여, 매우 작은 미소입자들, 바람직하게 약 500 나노미터 미만의 평균 크기를 갖는 입자들을 제조하였다. 이어서 상부 GI 관내의 카테터 주입에 의해 이러한 나노입자들을 쥐 GI 관에 외과수술에 의해 투입하였다. 이러한 나노입자의 투약은 개개의 약물들의 특수한 약물학 특성을 고려할 때 나노입자 형태의 약물의 약 0.5%가 그러한 쥐의 혈액에서 예컨대, RIA에 의해 검출될 것이라는 가정에 기초한다.

인슐린의 경우에, 혈액 샘플들을 t= -15, 0, 30, 60, 90, 120 및 180분에 취하여 RIA에 의해 인슐린에 대해 모니터하고 혈중 글루코오스 농도에 대해 글루코미터로 측정하였다(인슐린이 투여될 때, 당노성 쥐들을 이용하였다).

다른 약물의 경우에, 정상인 쥐들을 이용하고 RIA 또는 ELIZA 기술을 이용하여 혈중 약물 농도를 이러한 동일한 시점에서 측정하였다.

상술한 과정 이외에, 상술한 약물-포함 마이크로스피어들은 그들의 소장, 결장 및 기타의 절당한 GI 관 지역내에서의 흡수를 향상시키기 위해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 소화된 음식으로부터 그들이 지방-유사 입자로 보이도록 마이크로캡슐 주위의 지질 이중층을 침전시키는 과정, 페리틴(ferritin) 같은 분자들을 입자에 가교시키는 과정, 또는 하전 층(charged layer)을 미소입자의 외층에 형성시키는 과정을 포함한다.

기타의 구현예들

전술한 설명으로부터, 본 발명에 대한 다양한 변화 및 변형들이 다양한 용도 및 조건에 적응시키기 위해 가해질 수 있다는 사실이 명백해진다. 이러한 구현예들은 이하의 청구범위의 보호범위내에 포함된다.

본 명세서에 언급된 간행물 및 특허들은 각각의 간행물 또는 특허들이 본원에 첨부된다고 구체적 및 개별적으로 적시된 바와 같이 본원에 참고자료로 첨부되었다.

(57) 청구의 범위



**청구항 1**

아래의 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법으로서:

- (a) 상기 생물학적 활성 물질과 마크로머(macromer)를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제(article)를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 단계(c)를 중합성 모노비닐 단량체가 존재하지 않는 상태에서 진행하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법.

**청구항 2**

아래의 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법으로서:

- (a) 상기 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제 또는 제제의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 단계(c)를 수용성이고 중합성 모노비닐 단량체가 존재하지 않는 상태에서 진행하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법.

**청구항 3**

아래의 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법으로서:

- (a) 상기 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 단계(c)를 비닐 피롤리돈 단량체가 존재하지 않는 상태에서 수행하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법.

**청구항 4**

제 1항에 있어서, 방출가능한 활성 물질의 10%가 방출되는데 소요되는 기간이  $t_{50}$ 의 1/10을 초과하는 방법.

**청구항 5**

제 1항에 있어서, 상기 제제가 적어도 2.5중량%의 활성물질을 포함하는 방법.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 상기 제제가 적어도 5중량%의 활성물질을 포함하는 방법.

**청구항 7**

제 1항에 있어서, 상기 제제가 적어도 10중량%의 활성물질을 포함하는 방법.

**청구항 8**

제 1항에 있어서, 상기 제제가 적어도 25중량%의 활성물질을 포함하는 방법.

**청구항 9**

제 1항에 있어서, 상기 제제가 적어도 40중량%의 활성물질을 포함하는 방법.

**청구항 10**

제 1항에 있어서, 상기 마크로머가

- (a) 중심 코어(central core)를 이루는 수용성 영역(water soluble region);
- (b) 상기 코어에 부착된 적어도 2 개의 분해성 영역(degradable region); 및
- (c) 적어도 2 개의 중합성 말단기들(polymerizable end groups)을 포함하고, 상기 중합성 말단기들이 상기 분해성 영역에 부착되는 방법.

**청구항 11**

제 10항에 있어서, 상기 수용성 영역은(water soluble region)이 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(에틸렌옥사이드), 폴리(비닐알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(에틸렌옥사이드)-코-폴리(프로필렌옥사이드)블록 공중합체, 다당류, 탄수화물, 단백질 및 이들의 화합물로 구성된 그룹으로부터 선택된 중합체를 포함하는 방법.

**청구항 12**

제 10항에 있어서, 상기 분해성 영역(degradable region)이 폴리( $\alpha$ -히드록시산), 폴리(락톤), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(오소에스테르), 폴리(오소카보네이트) 및 폴리(포스포에스테르)로 구성된 그룹으로부터 선택된 중합체를 포함하는 방법.

**청구항 13**

제 10항에 있어서, 상기 분해성 영역이 폴리(트리메틸렌 카보네이트)를 포함하는 방법.

**청구항 14**

제 10항에 있어서, 상기 분해성 영역이 폴리(카프로락톤)을 포함하는 방법.

**청구항 15**

제 12항에 있어서, 상기 폴리( $\alpha$ -히드록시산)가 폴리(글리콜산), 폴리(DL-락트산) 및 폴리(L-락트산)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

**청구항 16**

제 12항에 있어서, 상기 폴리(락톤)가 폴리( $\epsilon$ -카프로락톤), 폴리( $\delta$ -발레로락톤) 및 폴리( $\gamma$ -부티로락톤)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 방법.

**청구항 17**

제 10항에 있어서, 상기 중합성 말단기들(polymerizable end group)은 마크로머를 중합시킬 수 있는 탄소-탄소간 이중결합을 포함하는 방법.

**청구항 18**

제 10항에 있어서, 상기 코어가 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하고; 상기 분해성 영역이 생분해성 폴리( $\alpha$ -히드록시산)를 포함하며; 상기 말단 캡들이 아크릴레이트 올리고머 또는 모노머를 포함하는 방법.

**청구항 19**

제 1항에 있어서, 상기 단계 (d)가 상기 제제를 상기 포유동물의 폐에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 20**

제 1항에 있어서, 상기 단계 (d)가 상기 제제를 상기 포유동물의 정맥내에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 21**

제 1항에 있어서, 상기 단계 (d)가 상기 제제를 상기 포유동물의 피하에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 22**

제 1항에 있어서, 상기 단계 (d)가 상기 제제를 상기 포유동물의 근육내에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 23**

제 1항에 있어서, 상기 단계 (d)가 상기 제제를 상기 포유동물에 경구 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 24**

제 1항에 있어서, 상기 단계 (d)가 상기 제제를 상기 포유동물의 코에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 25**

제 1항에 있어서, 상기 포유동물이 사람인 방법.

**청구항 26**

제 1항에 있어서, 상기 생물학적 활성 물질이 단백질인 방법.

**청구항 27**

제 1항의 방법에 의해 제조된 조성물.

**청구항 28**

제 2항의 방법에 의해 제조된 조성물.

**청구항 29**

제 3항의 방법에 의해 제조된 조성물.

**청구항 30**

아래의 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법으로서:

- (a) 상기 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 제제가 상기 생물학적 활성 물질의 적어도 80%를  $t_{50}$  보다 2.5배 되는 시점에 방출하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법.

**청구항 31**

아래의 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법으로서:

- (a) 상기 생물학적 활성 물질과 마크로머를 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 제제가 적어도  $t_{50}$  보다 2.5배 긴 기간 동안 치료 용량의 상기 생물학적 활성 물질을 방출하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법.

**청구항 32**

히드로겔 및 생물학적 활성 물질을 포함하는 입자들을 포함하며, 상기 입자의 방출 카이네틱(release kinetics)이 입자의 크기에 무관하고, 상기 입자들이 약 50nm 내지 약 1mm의 질량 평균 직경을 갖는 생물학적 활성 물질을 전달하는 조성물

**청구항 33**

아래의 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 서방성 제제들의 제조방법으로서:

- (a) 개시제의 존재하에서 상기 생물학적 활성 물질과 생분해성, 중합성 마크로머를 화합시키는 단계로서, 상기 마크로머가 적어도 하나의 수용성 영역, 생체내 조건하에서 가수분해 가능한 적어도 하나의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 갖는 중합성 말단기들(polymerizable end groups)을 가지며, 여기서 상기 중합성 말단기들이 적어도 하나의 분해성 영역에 의해 분리되는 단계;
- (b) 빛이 없는 상태에서 상기 마크로머를 중합시켜 히드로겔을 제조하고 상기 생물학적 활성 물질을 상기 히드로겔내에 혼입시키는 단계; 및
- (c) 상기 히드로겔을 상기 생물학적 활성 물질을 서방시킬 수 있는 제제로 제조하는 단계를 포함하는 생물학적 활성 물질의 서방성 제제의 제조방법.

**청구항 34**

제 33항에 있어서, 상기 개시제가 라디칼 개시제인 방법.

**청구항 35**

제 33항에 있어서, 상기 개시제가 이온 개시제인 방법.

**청구항 36**

다음의 단계들을 포함하는 중합된 히드로겔의 제조방법으로서:

- (a) 소수성이며 수불용성인 마크로머, 개시제 및 물을 화합시키는 단계;
- (b) 상기 마크로머를 팽윤(swelling)시키는 단계;
- (c) 상기 마크로머를 혼합하여 균일한 혼합물을 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 마크로머를 중합시켜 히드로겔을 제조하는 단계.

**청구항 37**

제 36항에 있어서, 상기 방법이 단계(d)를 수행하기 이전에 상기 혼합물에 생물학적 활성 물질을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 38**

다음의 단계들을 포함하는 중합된 히드로겔의 제조방법으로서:

- (a) 친수성 마크로머 및 소수성이며 수불용성인 마크로머를 화합시키는 단계;

- (b) 상기 단계(a)에서 생성된 화합물을 가열 및 교반시켜 균일한 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 실온으로 냉각시키는 단계;
- (d) 상기 혼합물에 물 및 개시제를 가하여 상기 혼합물을 팽윤(swelling)시키는 단계; 및
- (e) 상기 마크로머를 중합시켜 히드로겔을 제조하는 단계.

**청구항 39**

제 38항에 있어서, 상기 방법이 단계(e)를 수행하기 이전에 상기 혼합물에 생물학적 활성 물질을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 40**

다음 단계들을 포함하는 단백질의 전달 방법.

- (a) 상기 단백질을 중합성 친수성 중합체와 화합시키는 단계;
- (b) 상기 단계(a)에서 제조된 화합물의 혼합물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합물을 중합시켜 제제를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 제제 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 단백질이 원형 그대로의 상태로 유지되며 상기 단백질의 70% 이상이 상기 제제로부터 방출되는 단백질의 전달방법.

**청구항 41**

다음 단계들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법으로서:

- (a) 수용액내 자유 라디칼 개시제의 존재하에서 상기 생물학적 활성 물질을 중합가능하며 생분해성인 마크로머와 화합시키는 단계;
- (b) 상기 용액을 분산시켜 상기 마크로머 및 상기 생물학적 활성 물질을 포함하는 미수적(fine droplet)을 형성시키는 단계;
- (c) 상기 미수적내의 상기 마크로머를 중합시켜 그 안에 상기 생물학적 활성 물질이 혼입된 히드로겔 입자를 제조하는 단계로서, 여기서 상기 입자들은 상기 생물학적 활성 약제를 서방(controlled releasing)시킬 수 있는 단계; 및
- (d) 상기 제제 또는 그의 일부를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 단계(c)를 비닐 피릴리돈 단량체가 존재하지 않는 상태에서 수행하는 생물학적 활성 물질의 전달 방법.

**청구항 42**

제 41항에 있어서, 상기 용액이 분무 건조 또는 유중수(water-in-oil) 에멀전 방법에 의해 분산되는 방법.

**청구항 43**

제 41항에 있어서, 상기 입자의 80% 이상이 약 5 $\mu$ m 미만의 입도를 갖는 방법.

**청구항 44**

생분해성이고, 중합성 마크로머내에 담지된 생물학적 활성 물질을 포함하는 조성물로서, 상기 마크로머가 하나 이상의 수용성 영역, 생체내(in vivo)에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 갖는 중합성 말단기들(polymerizable end groups)을 갖고, 상기 중합성 말단기들이 하나 이상의 분해성 영역에 의해 서로 분리되고, 상기 조성물이 5중량% 이상의 상기 생물학적 활성 물질을 포함하는 조성물.

**청구항 45**

제 44항에 있어서, 상기 조성물이 적어도 10중량%의 상기 생물학적 활성 물질을 포함하는 조성물.

**청구항 46**

제 44항에 있어서, 상기 조성물이 적어도 20중량%의 상기 생물학적 활성 물질을 포함하는 조성물.

**청구항 47**

하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 갖는 중합성 말단기들(polymerizable end groups)을 포함하는 불용성 마크로머로서, 상기 중합성 말단기들이 적어도 하나의 분해성 영역에 의해 분리되는 불용성 마크로머.

**청구항 48**

제 47항에 있어서, 상기 분해성 영역이 적어도 두 개의 상이한 폴리머들의 블렌드를 포함하는 마크로머.

**청구항 49**

제 47항에 있어서, 상기 분해성 영역이 적어도 두 개의 상이한 모노머들의 공중합체를 포함하는 마크로머.

**청구항 50**

제 47항에 있어서, 상기 수용성 영역이 적어도 2 측쇄들(arms)을 포함하는 마크로머.

**청구항 51**

제 47항에 있어서, 상기 수용성 영역이 약 400 내지 8000 달톤의 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)로 필수적으로 구성되는 조성물.

**청구항 52**

하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 갖는 중합성 말단기들(polymerizable end groups)을 포함하는 불용성 마크로머를 포함하고, 상기 중합성 말단기들이 적어도 하나의 분해성 영역에 의해 분리되는 단백질의 지속적인 전달을 위한 조성물.

**청구항 53**

하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유 결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 가진 중합성 말단기들(polymerizable end groups)을 포함하는 마크로머로서, 상기 중합성 말단기들이 하나 이상의 분해성 영역에 의하여 분리되고, 상기 분해성 영역이 폴리(트리메틸렌 카보네이트)로 필수적으로 구성되는 마크로머.

**청구항 54**

분자량이 약 1000Da인 폴리(에틸렌 글리콜) 코어 및 폴리(카프로락톤)으로 구성되는 분해성 영역을 포함하는 LHRH의 피하 투여용 조성물로서, 상기 조성물이 30일을 초과하는 기간 동안 치료 용량의 LHRH를 전달할 수 있는 LHRH의 피하 투여용 조성물.

**청구항 55**

글루카곤 유사 펩타이드-1 및 마크로머를 포함하는 조성물로서, 상기 마크로머가 하나 이상의 수용성 영역, 생체내에서 가수분해 가능한 하나 이상의 분해성 영역(degradable region) 및 추가의 공유결합을 형성하여 마크로머를 중합시킬 수 있는 능력을 가진 중합성 말단기들(polymerizable end group)을 포함하고, 상기 중합성 말단기들이 하나 이상의 분해성 영역에 의하여 분리되는 조성물.

**청구항 56**

생물학적 활성 물질의 서방성 히드로겔 조성물로서, 상기 조성물이 0.4g/cm<sup>3</sup> 미만의 탭 밀도(tap density)를 갖는 입자들을 포함하고, 상기 입자의 50% 이상이 약 5 $\mu$ m 미만의 질량 평균 입경을 가지며, 상기 조성물이 폐 투여용으로 제형화된 생물학적 활성 물질의 서방성 히드로겔 조성물.

**청구항 57**

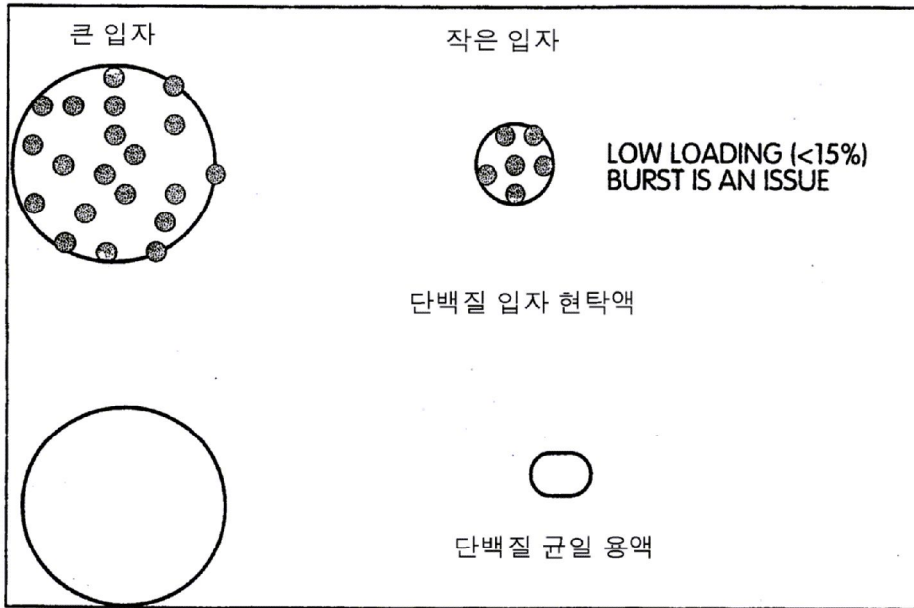
0.4g/cm<sup>3</sup>를 초과하는 탭 밀도(tap density)를 갖는 입자들을 포함하는 생물학적 활성 물질의 지속방출성 조성물.

**청구항 58**

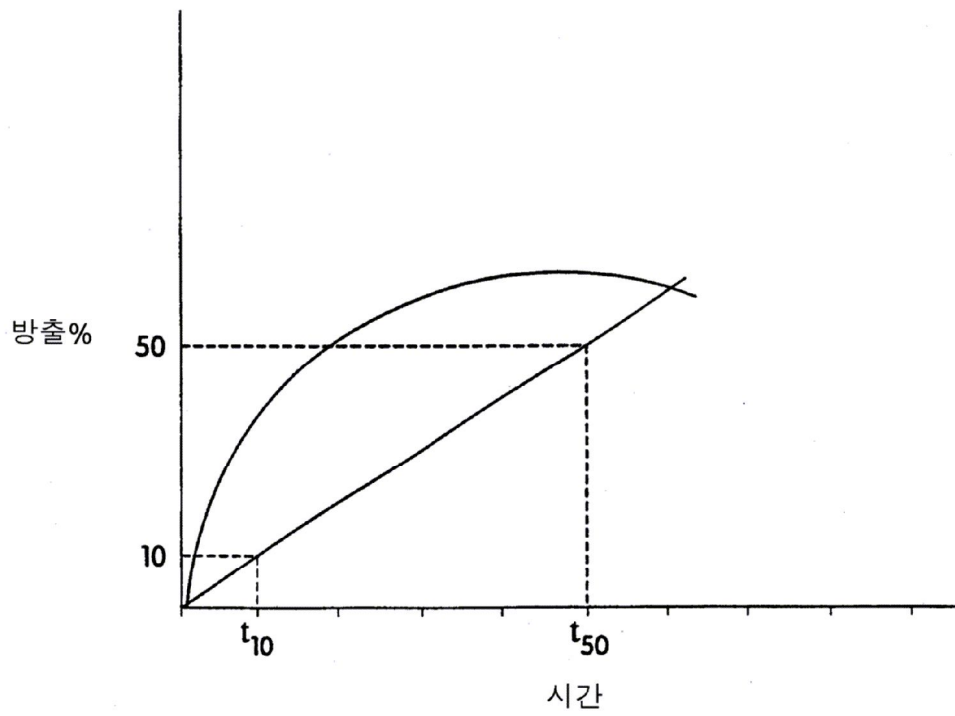
제 57항에 있어서, 상기 조성물이 폐 전달(pulmonary delivery)용으로 제형된 조성물.

**도면**

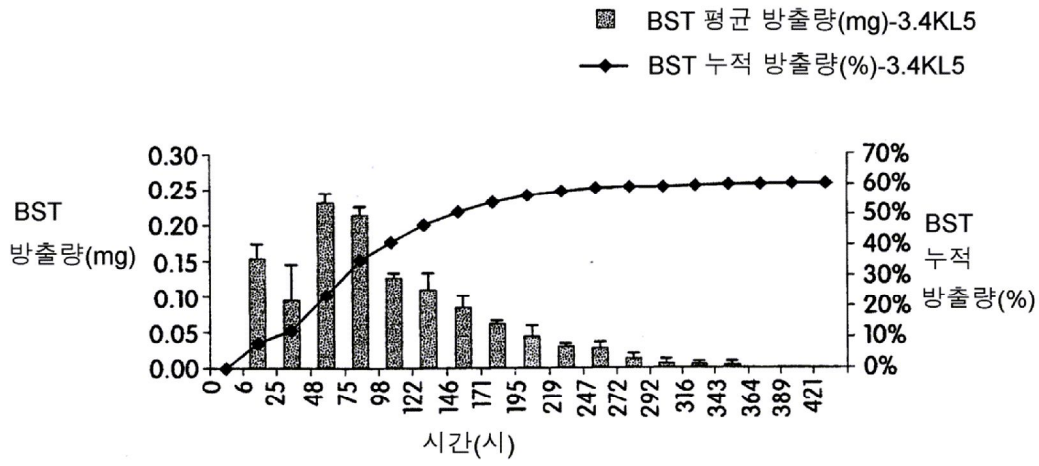
도면1



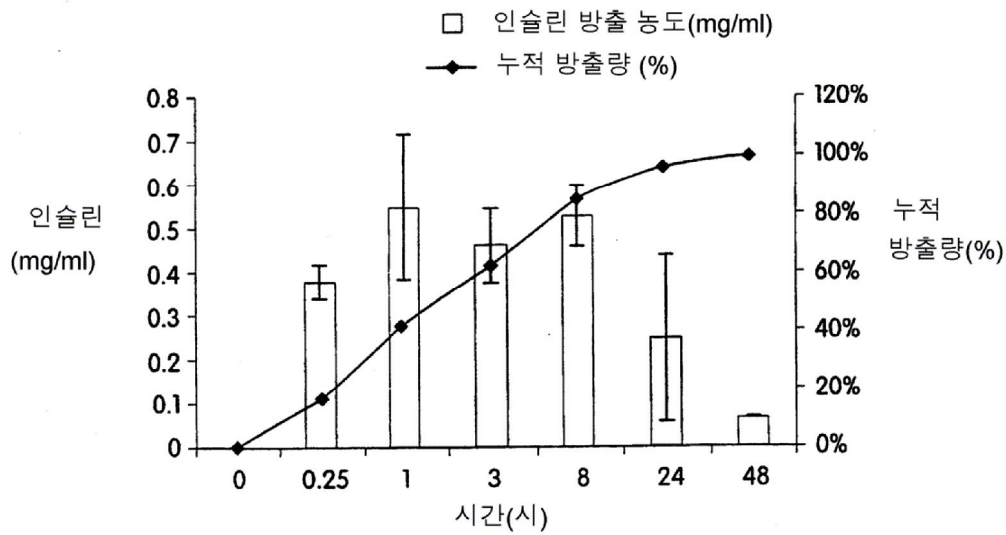
도면2



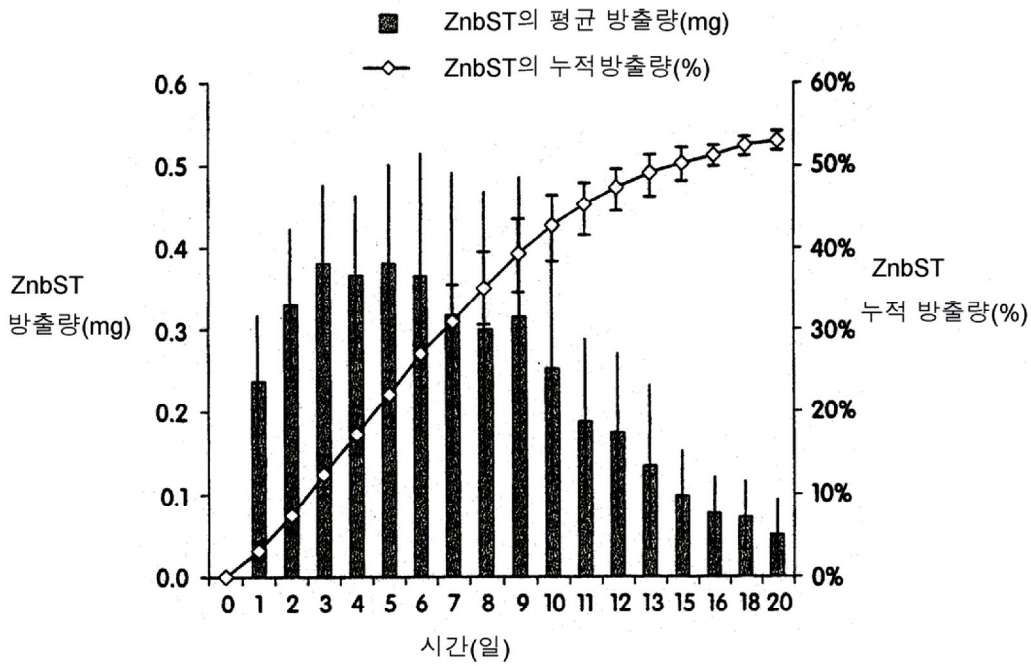
도면3



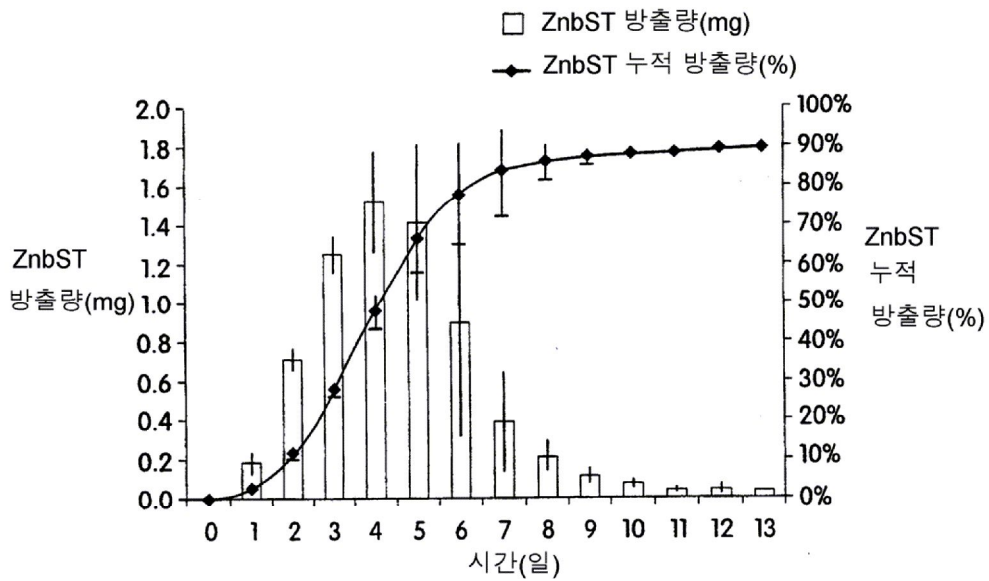
도면4



도면5

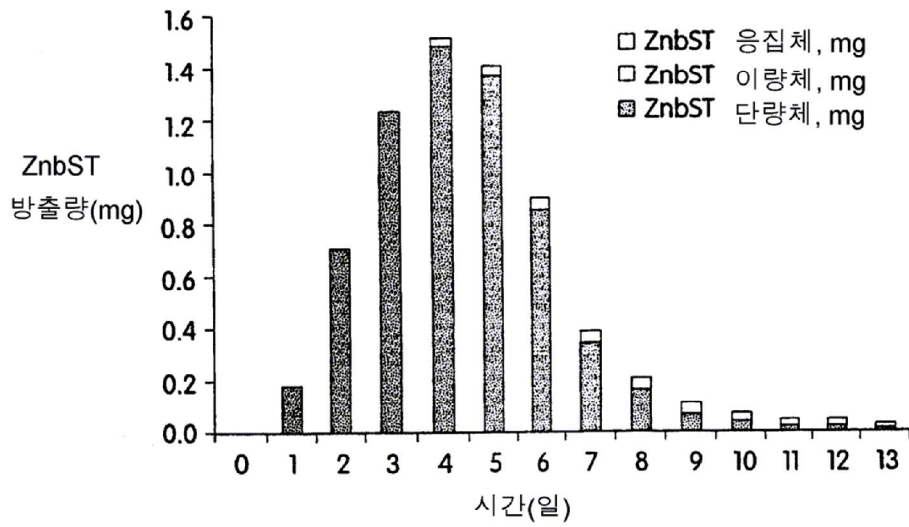


도면6

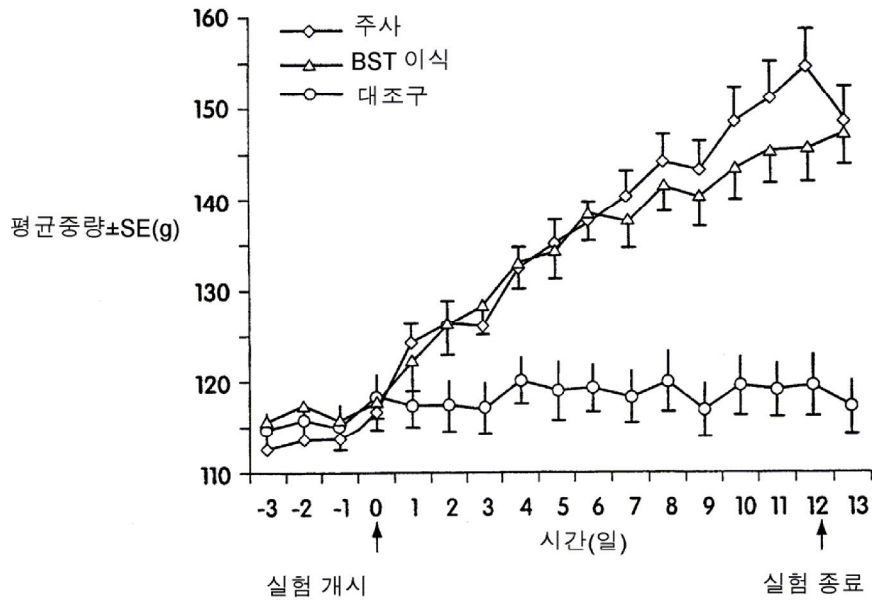




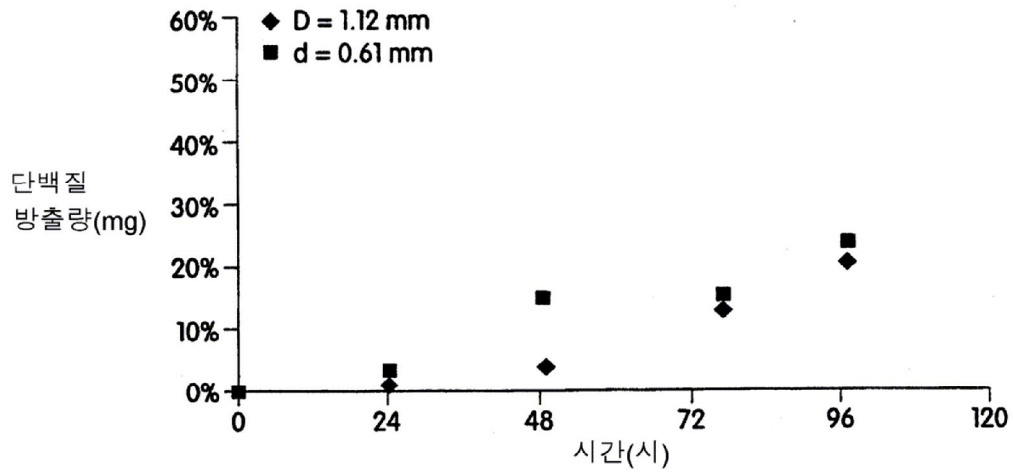
도면7



도면8

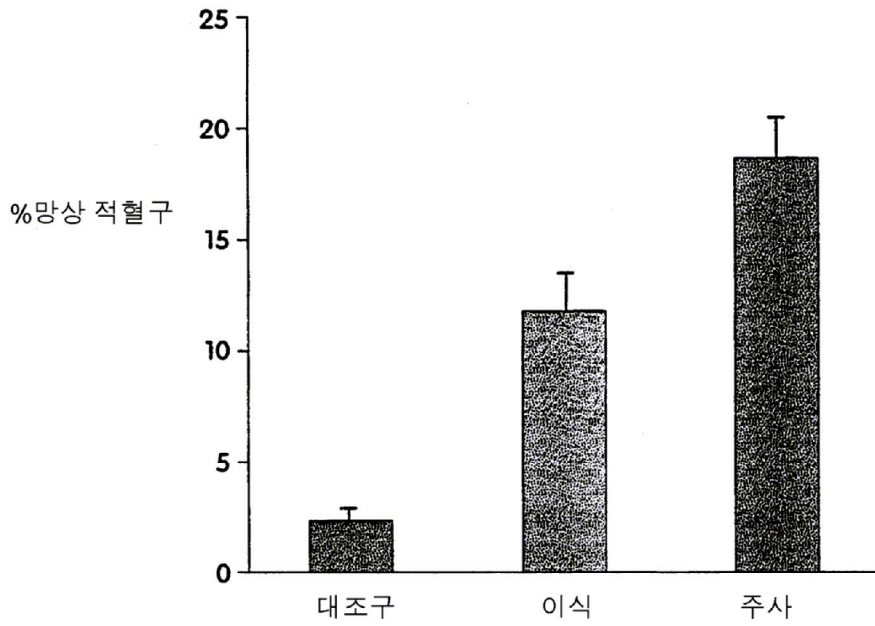


도면9



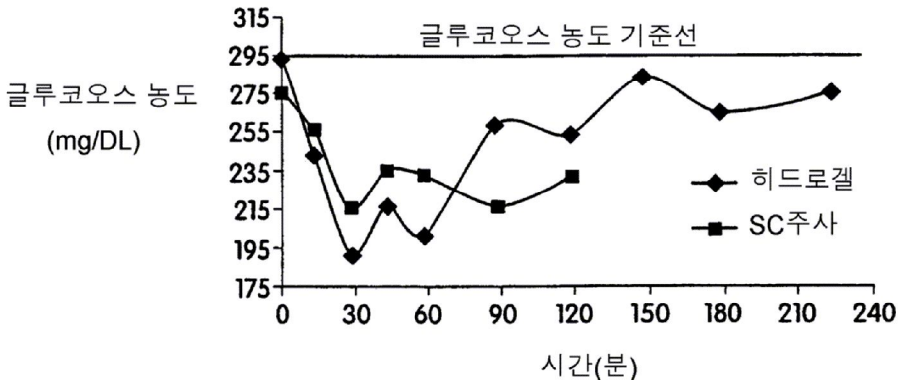
도면10

쥐의 에리트로포에이틴에 미치는 영향



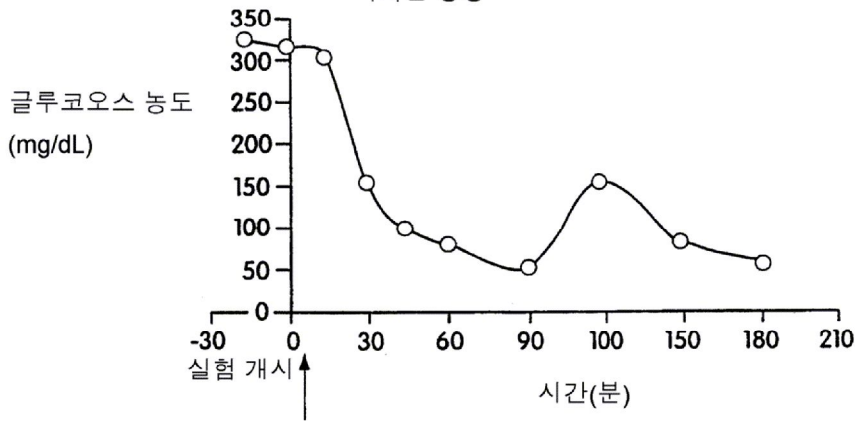
도면11

피하 주입된 인슐린이 당뇨병 쥐의 혈중  
글루코오스 농도에 미치는 영향



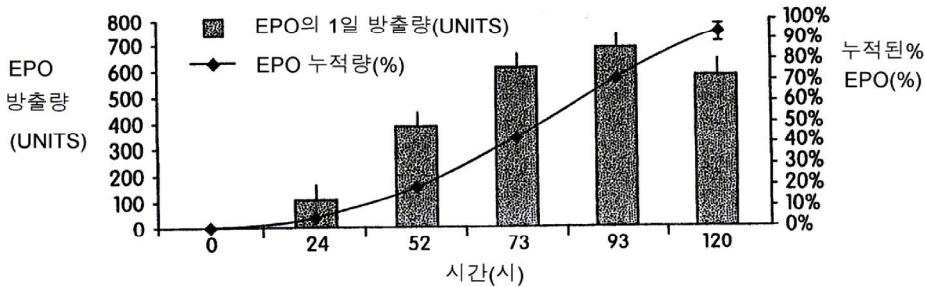
도면12

폐에 주입된 인슐린이 당뇨병 쥐의 혈중 글루코오스 농도에  
미치는 영향



도면13

3.4 KL5로부터의 EPO방출



도면 14

시험관내 3.4KL5 입자로부터의 인슐린의 방출

