

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506951

(P2005-506951A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/19	A 6 1 K 9/19	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	M 4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/04	A 6 1 K 37/36	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/16	A 6 1 K 37/54	
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 37/43	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-554123 (P2002-554123)	(71) 出願人	502433379
(86) (22) 出願日	平成13年12月31日 (2001.12.31)		ベストカ バイオメディカル ラボラトリ
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月27日 (2003.6.27)		ーズ インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/050355		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
(87) 国際公開番号	W02002/053174		8854 ピスカタウェイ イーゼル ロ
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		ード ウェスト 131 スイート 6
(31) 優先権主張番号	60/258,916	(74) 代理人	100095577
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)		弁理士 小西 富雅
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100100424
			弁理士 中村 知公
		(72) 発明者	ベスツカ, シドニー
			アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
			7006 ウェスト カルドウェル ブル
			ックサイド テラス 82

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子のための制御放出系

(57) 【要約】

本発明は、生物活性分子を有機化合物に曝露することで調製された固体の組成物から、前記分子を制御放出送達することに関する。例えば、該有機化合物は、アルコール（例えば好ましくはメタノール、エタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、t-ブタノールなどの低級アルコールなど）、アルコールの混合物、アルデヒド、ケトン、炭化水素（飽和もしくは不飽和）、又は芳香族炭化水素などの有機溶媒である。溶媒は様々な有機溶媒の混合物でもよく、又は、生成される調合物が、様々な凍結乾燥製剤などの混合物でもよく、例えば生成される混合物の放出曲線を制御するのに用いてもよい。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

沈殿物、凍結乾燥物又は結晶が形成されるような条件下で、一種又はそれ以上の生物活性分子を有機溶媒に曝露することで調製される固体の組成物を由来とする前記生物活性分子を含んで成る遅延放出性調合物。

【請求項 2】

ポリペプチドを有機溶媒に曝露することで調製される前記ポリペプチドの沈殿物、凍結乾燥物又は結晶を含んで成る遅延放出性調合物であって、前記ポリペプチドが、水溶液中において前記調合物から少なくとも 7 日間の期間にわたって放出される、遅延放出性調合物。

10

【請求項 3】

生物活性ポリペプチドを極性プロトン性有機溶媒に曝露することで調製される前記ポリペプチドの沈殿物、凍結乾燥物又は結晶を含んで成る調合物であって、患者に投与されたときに、少なくとも前記ポリペプチドの ED_{50} である平均的な安定状態の投薬量を提供する速度で前記ポリペプチドを少なくとも 7 日間にわたって放出する、調合物。

【請求項 4】

前記有機溶媒が、アルコール、アルデヒド、ケトン、炭化水素、芳香族炭化水素、又はこれらの混合物である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の調合物。

【請求項 5】

前記有機溶媒がアルコール又は複数のアルコールの混合物である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の調合物。

20

【請求項 6】

前記アルコールが低級アルコール又はその混合物である、請求項 5 に記載の調合物。

【請求項 7】

前記アルコールが、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、及びt-ブタノール、又はこれらの混合物からなる群より選択される、請求項 5 に記載の調合物。

【請求項 8】

前記有機溶媒が極性のプロトン性溶媒である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の調合物。

30

【請求項 9】

前記有機溶媒が水混和性の極性プロトン性溶媒である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の調合物。

【請求項 10】

前記生物活性分子又はポリペプチドが、前記調合物から、水溶液中で、少なくとも前記生物活性分子又はポリペプチドの ED_{50} である平均的な安定状態の投薬量を提供する速度で少なくとも 50 日間にわたって放出される、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の調合物。

【請求項 11】

前記有機溶媒が、患者に投与されたときに、前記溶媒に有害な副作用がある場合の該副作用に関する IC_{50} の少なくとも一桁下で留まる速度で前記溶媒が前記調合物から放出されるように選択される、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の調合物。

40

【請求項 12】

生物活性分子が、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、糖質、ガングリオシド、又はグリカンからなる群より選択される高分子である、請求項 1 に記載の調合物。

【請求項 13】

前記ポリペプチドが、サイトカイン、成長因子、ソマトトロピン、成長ホルモン、コロニ刺激因子、エリスロポエチン、プラスミノゲン活性化因子、酵素、T細胞受容体、表面膜タンパク質、リポタンパク質、凝固因子、抗凝固因子、腫瘍壊死因子、輸送タンパク質、ホーミング受容体、及びアドレッシンからなる群より選択される、請求項 2 乃至 3 のいずれかに記載の調合物。

50

【請求項 14】

前記ポリペプチドが、レニン；ヒト成長ホルモン；ウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質； α -1-抗トリプシン；インシュリン；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；第VIII因子、第IX因子、組織因子、及びフォン・ウィルブランド因子などの凝固因子；抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性物質；プラスミノゲン活性化因子；ボンベシン；トロンピン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子- α ；腫瘍壊死因子- β ；エンケファリナーゼ；RANTES（活性化時に調節を受け、正常T細胞で発現及び分泌）；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質（MIP-1 α ）；血清アルブミン；ミューラー管阻害物質；レラクシンA鎖；レラクシンB鎖；プロレラクシン；性腺刺激ホルモン関連ペプチド；微生物タンパク質；DNase；インヒピン；アクチピン；血管内皮増殖因子（VEGF）；ホルモン又は成長因子の受容体；インテグリン；プロテインA；プロテインD；リウマチ因子；神経栄養因子；血小板由来成長因子（PDGF）；線維芽増殖因子；上皮増殖因子（EGF）；トランスフォーミング増殖因子（TGF）；インシュリン様成長因子-I；インシュリン様成長因子-II；des(1-3)-IGF-I（脳IGF-I）、インシュリン様成長因子結合タンパク質；CDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導性因子；イムノトキシン；インターフェロン；コロニー刺激因子（CSF）；インターロイキン（IL）；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；抗原；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレッシン；調節タンパク質；免疫グロブリン様タンパク質；抗体；ヌクレアーゼ；及びこれらのフラグメント、からなる群より選択される、請求項13に記載の調合物。

10

20

【請求項 15】

前記生物活性分子が脂質及びステロールからなる群より選択される、請求項1に記載の調合物。

【請求項 16】

前記生物活性分子が小有機化合物である、請求項1に記載の調合物。

【請求項 17】

沈殿物である、請求項1乃至3のいずれかに記載の調合物。

【請求項 18】

凍結乾燥物である、請求項1乃至3のいずれかに記載の調合物。

30

【請求項 19】

ポリペプチドの沈殿物又は凍結乾燥物を含んで成る調合物であって、前記沈殿物又は凍結乾燥物が少なくとも50パーセント（モル）極性プロトン性有機溶媒を含有し、前記調合物が、患者に投与されたときに、少なくとも前記ポリペプチドのED₅₀である平均的な安定状態の投薬量を提供する速度で少なくとも7日間にわたって前記ポリペプチドを放出する、調合物。

【請求項 20】

請求項1乃至3のいずれかに記載の調合物を含んで成る、動物への投与用の薬物。

【請求項 21】

哺乳動物への投与用の、請求項20に記載の薬物。

40

【請求項 22】

ヒトへの投与用の、請求項20に記載の薬物。

【請求項 23】

請求項1乃至3のいずれかに記載の調合物を薬学的に容認可能な医薬品添加物と一緒に調合するステップを含む、薬物を製造する方法。

【請求項 24】

(a) 生物活性分子を有機溶媒に曝露するステップと、
(b) 沈殿物、凍結乾燥物又は結晶を形成するステップとを含む、生物活性分子の遅延放出性調合物を製造する方法。

【請求項 25】

50

- (a) 請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の調合物を調製するステップと、
(b) 市場出荷用の印刷物、及び / 又は、前記調合物の使用に関して健康管理提供者を教育する製品印刷物を提供するステップと、
(c) 前記調合物を健康管理提供者に届ける流通網を提供するステップと
を含む、医薬事業を行う方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

遺伝子工学の到来と共に、タンパク質、糖質及び核酸など、多くの生体高分子が大量に手に入るようになった。しかしながら、組換えにより生成されたこれらのペプチド及びタンパク質の投与には、固有の問題がいくつかある。多くの場合、これらのタンパク質の生物学的効果を維持するには、長期間の投与を要する。これらの作用物質を水性の賦形剤に入れて毎日投与するのは不便であり、また費用もかかるため、持続性又は遅延性の放出が好ましい。加えて、タンパク質は、投与に最も適している水性環境では非常に不安定である。

10

【0002】

さらに、多様な状態の治療で成功を収めるには、このような状態を効果的に治療することが公知の作用物質に重大な副作用がある場合があるために、投薬量を低くしてこれらの副作用を抑えねばならないという制約がある。別の場合としては、治療薬が大変不安定であったり、又は半減期が大変短いために投与を繰り返さねばならないこともある。さらに別の例では、医薬の長期投与が好ましい場合もある。

20

【0003】

これらの場合はすべて、ある一定期間にわたる持続的な制御投薬が可能となれば、解決策が得られるであろう。

【0004】

発明の概要

本発明の局面の一つは、生物活性分子を有機化合物に曝露することで調製された固体の組成物から、前記分子を制御放出送達することに関する。例えば、該有機化合物は、アルコール（例えば好ましくはメタノール、エタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、t-ブタノールなどの低級アルコール）、アルコールの混合物、アルデヒド、ケトン、炭化水素（飽和もしくは不飽和）、又は芳香族炭化水素などの有機溶媒である。溶媒は様々な有機溶媒の混合物でもよく、又は、生成される調合物が、様々な凍結乾燥製剤などの混合物でもよく、例えば生成される混合物の放出曲線を制御するのに用いてもよい。

30

【0005】

制御放出用に調合される本分子は有機化合物であってよい。いくつかの実施態様では、それは高分子、好ましくはタンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、糖質、ガングリオシド、又はグリカンなどの生体高分子である。本分子は脂質、ステロール又は他の親油性成分であってもよい。本制御送達系は、低分子（例えば有機化合物）の制御放出を送達するために使用することができる。

【0006】

いくつかの実施態様では、本製剤を、沈殿及び / 又は凍結乾燥によって調製する。

40

【0007】

発明を実施するための最良の態様

発明の説明

1. 概観

本発明は制御放出送達系に関し、タンパク質及び他の分子、例えば糖質、核酸、及び他の物質など、を有機化合物で処置すると、水性媒質中でのそれらの可溶性を改変できるという発見に基づく。例えば、ある実施態様では、タンパク質を有機溶媒（例えばアルコール）に暴露すると、水分子及び他の関連する部分が有機残基に置換される。いくつかの実施態様では、本製剤は固体、例えば凍結乾燥、沈殿等で形成される粉末又は結晶など、であ

50

る。

【0008】

生成される製剤は、タンパク質の遅延性放出性調合物とすることができ、例えば医薬又は他の水性の用途に用いた場合に、生物学的効果を持続させるために適している。提示する例はタンパク質に言及しているが、本原理は、例えばペプチド、糖質、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、グリカン、ガングリオシド及び他の生体高分子など、他の水溶性生体高分子にも応用できる。結合させた水残基で溶媒化させた有機低分子及び何らかの無機分子は、特定の分子の制御放出を行うよう、同様な態様で処置することができる。

【0009】

さらに、タンパク質の可溶性は、タンパク質の可溶性を変えることのある翻訳後修飾によっても、調節される。解説する本方法は、翻訳後修飾により、及び、翻訳後修飾によらずに、タンパク質の可溶性を変化させることができる。

【0010】

いくつかの実施態様では、有機溶媒を加えることで生体分子を水溶液中で沈殿させた後、凍結乾燥させる。代替的な手法では、有機溶媒を含有する溶液から直接、該溶液を凍結乾燥させ、乾燥後の物質を調合して制御放出系にする方法や、沈殿したタンパク質を水溶液中で洗浄した後に、凍結乾燥を行わずに直接、調合する方法、又は、乾燥タンパク質を有機溶媒で処置した後、溶媒を除去後に調合する方法、がある。

【0011】

いくつかの好適な実施態様では、溶媒は不活性の溶媒、そしてさらにより好ましくは無水有機溶媒である。溶媒は当該高分子を不可逆的に変性させてはならず、例えば、復元までの時間が必要であれば、その時間は、再水和プロセスよりも有意に長くはならない。

【0012】

配合及び物質の大きさは、沈殿のタイミング及び方法や、凍結乾燥条件によって調節できる。当該分子が沈殿したら、この沈殿物を凍結乾燥させて余分な水分を取り除き、水分が有機溶媒にすぐに置換しないようにする。直接的な沈殿の起きないコロイド懸濁液を沈殿液の代わりに用いることもできる。コロイド懸濁液を用いると、小さなサイズの粒子を作製できる。さらに、沈殿又はコロイド形成を行わずに、混合液を直接、凍結乾燥させると、有機-水性溶媒中の当該分子の濃度、沈殿方法及びタンパク質溶液の濃度に依って、様々なサイズの粒子を作製することができる。場合によっては、ゆっくり放出させようとする分子に付いた水分子と置換可能な無機分子を、水系全体に用いても、凍結乾燥後に同じ結果を得ることができる。放出は、用いる特定の有機溶媒、用いる緩衝剤、並びに、沈殿させる及び/又は凍結乾燥させるタンパク質の粒子サイズの影響を受ける。

【0013】

加えて、本発明の方法により、放出曲線をより大幅に調節することができる。本製剤は、短期又は長期の放出動態を示すよう、つまり巨大分子の急速な放出又は持続的な放出のいずれでも可能なよう、作製することができる。いずれの場合も、本製剤は、水溶液から凍結乾燥させた高分子の製剤に比較して、血清又は他の生物体液中での可溶性が低く、例えば、少なくとも24時間、48時間、又はさらに168時間(7日間)といった期間にわたる溶解率が、水溶液から凍結乾燥させた高分子の製剤の少なくとも2分の1、そしてより好ましくは少なくとも10分の1、25分の1、50分の1又は100分の1である、などである。

【0014】

いくつかの好適な実施態様では、本組成物により、少なくとも2日間、そしてより好ましくは少なくとも7日間、14日間、21日間、50日間、又はさらに100日間といった期間にわたって、少なくとも当該活性化合物に関するED₅₀である平均的な一定した状態の投薬量を提供するような速度で、生物活性化合物を放出させることができる。

【0015】

いくつかの好適な実施態様では、患者(特にヒト)に投与した場合に、当該溶媒に有害な副作用がある場合に、この有害な副作用に関するIC₅₀未満に留まる速度、そしてより好ま

10

20

30

40

50

しくは、このような IC_{50} 濃度より少なくとも1桁下、2桁下又は3桁下の濃度で留まる速度で、溶媒が製剤から放出されるよう、溶媒を選択する。

【0016】

いくつかの実施態様では、本有機物質は極性のプロトン性溶媒、例えば脂肪族アルコール、グリコール、グリコールエーテル、及びこれらの混合物など、である。いくつかの好適な実施態様では、本有機物質は水混和性の極性プロトン性溶媒である。

【0017】

ゲル、マイクロスフィア、ウェファー又はインプラントの形の当業で公知の生分解性又は非生分解性物質を、本発明の改変された分子に混合することもできる。

【0018】

これら本調合物は、非経口、経口、筋肉内、皮下、皮膚、静脈内、動脈内、病巣内、鞘内、又は、数多くの疾患の治療、予防及び診断のための他の送達部位で、用いることができる。

【0019】

本発明のさらに別の局面は、例えばヒト又は他の動物の治療のための医薬調合物を調製する方法など、事業を行う方法に関する。このような方法のある例示的な実施態様では、ここに解説した凍結乾燥製剤を作製するための凍結乾燥設備が提供される。該凍結乾燥製剤は、例えば丸剤、錠剤、パッチ、注射液等として、好ましくは政府による認可を受けた設備、例えばFDAによる認可を受けた設備など、でパッケージされる。好適な実施態様では、本凍結乾燥製剤を、もしより大きなロットでパッケージされていても、一回の剤形で提供する。

【0020】

II. 定義

「生体侵食性」とは、物質が、環境による作用、又は特に生物による作用により、溶解又は消化されて成分分子に成り得ること、そして選択的には、代謝又は消化されて、その環境又は生物を毒する又は害することなく、より簡単な構成成分に成り得ることを意味する。

【0021】

「哺乳動物に投与する」とは、活性成分を含有する本組成物を、経口、非経口、腸管内、胃内、局所、経皮、皮下、局所又は全身投与することを意味する。選択的には、本組成物を適した医薬品添加物と一緒に投与してもよく、該医薬品添加物は、生理食塩水、エチルセルロース、アセトテフタレート、マンニトール、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、ブドウ糖、ショ糖、炭酸エステル、等であってよい。

【0022】

「持続放出」又は「持続的な放出」とは、活性成分が、約30分から約2ヶ月又はそれ以上の範囲で、数分、数時間、数日、数週又は数ヶ月といった期間にわたって確認可能かつ操作可能な速度で送達賦形剤から放出されることを指す。

【0023】

略語

HSA ヒト血清アルブミン

HOAc 酢酸

NaOAc 酢酸ナトリウム

KOAc 酢酸カリウム

Mg(OAc)₂ 酢酸マグネシウム

IFN- 001 インターフェロン -001

IFN- 012 インターフェロン -012

PBS リン酸緩衝生理食塩水

【0024】

III. 例示的な生体高分子

10

20

30

40

50

本発明に用いてもよい生体高分子には、タンパク質、糖質、核酸及びこれらの組合せがある。

【0025】

有利な点として、本発明に従い、本方法を用いると、農・食品産業において薬学的に貴重又は価値があるタンパク質を調合することができる。関係するタンパク質には、サイトカイン、成長因子、ソマトトロピン、成長ホルモン、コロニー刺激因子、エリスロポエチン、プラスミノゲン活性化因子、酵素、T細胞受容体、表面膜タンパク質、リポタンパク質、凝固因子、抗凝固因子、腫瘍壊死因子、輸送タンパク質、ホーミング受容体、アドレッシン、等がある。哺乳動物ポリペプチドの例には、レニンなどの分子、ヒト成長ホルモンを含む成長ホルモン；ウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質； α -1-抗トリプシン；インシュリン；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；第VIII因子、第IX因子、組織因子、及びフォン・ウィルブランド因子などの凝固因子；プロテインCなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性物質；ウロキナーゼ又はヒト尿などのプラスミノゲン活性化因子又は組織型プラスミノゲン活性化因子（t-PA）；ボンベシン；トロンピン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子- α 及び β ；エンケファリナーゼ；RANTES（活性化時に調節を受け、正常T細胞で発現及び分泌）；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質（MIP-1 α ）；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミューラー管障害物質；レラクシンA鎖；レラクシンB鎖；プロレラクシン；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；ベータ-ラクタマーゼなどの微生物タンパク質；DNase；インヒピン；アクチビン；血管内皮増殖因子（VEGF）；ホルモン又は成長因子の受容体；インテグリン；プロテインA又はD；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子（BDNF）などの神経栄養因子、ニュートロフィン-3、-4、-5、又は-6（NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6）、又はNGF- α などの神経成長因子；血小板由来成長因子（PDGF）；aFGF及びbFGFなどの線維芽増殖因子；上皮増殖因子（EGF）；TGF- β 、TGF- α 及びBMPなどのトランスフォーミング増殖因子（TGF）；インシュリン様成長因子-I及び-II（IGF-I及びIGF-II）；des(1-3)-IGF-I（脳IGF-I）；インシュリン様成長因子結合タンパク質；CD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19などのCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導性因子；イムノトキシン；骨形態形成タンパク質（BMP）；インターフェロン- α 、 β 、及び γ などのインターフェロン；コロニー刺激因子（CSF）、例えばM-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン（IL）、例えばIL-1乃至IL-10；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；抗原（例えば細菌性及びウイルス性抗原）；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレッシン；調節タンパク質；免疫グロブリン様タンパク質；抗体；ヌクレアーゼ；及び上に挙げたポリペプチドのいずれかのフラグメント、がある。

【0026】

適した治療的及び/又は予防的な生物学的活性のある薬剤の他の例には、アンチセンス分子などの核酸；及び、抗生物質、ステロイド、うっ血除去薬、神経刺激性物質、麻酔剤、鎮静薬、心血管薬、抗腫瘍剤、抗新生物剤、抗ヒスタミン剤、ホルモン（例えばチロキシン）及びビタミンなどの小分子がある。

【0027】

IV. 典型的な方法

タンパク質の制御放出の速度は数多くの変項によって調節することができる。該変項には、有機溶媒の添加速度、タンパク質（又は他の分子）の有機溶媒中の時間（タンパク質が有機溶媒に暴露される時間）、タンパク質を沈殿させるための有機溶媒の濃度、沈殿前の有機溶媒の濃度、溶液を直接凍結乾燥させる前の有機溶媒の濃度、媒質の有機及び非有機の組成、温度、陽イオンの濃度、陰イオンの濃度、沈殿の速度、pH、有機溶媒の混合、かきまぜ、攪拌、他のタンパク質の担体としての存在、複数のタンパク質の制御放出のための他のタンパク質の存在、タンパク質安定化剤、溶存気体、還元剤、酸化剤、当該粒子の質量対表面積、放出のための調製前の試料の洗浄、塩濃度、改質物質への暴露時間、当該タンパク質又は他の高分子の濃度、無機化合物、有機化合物の種類、などがある。無機

10

20

30

40

50

陽イオンは、一価、二価、三価、四価又は五価でもよい。無機陰イオンは一価、二価、三価、四価又は五価でもよい。いくつかの実施態様では、凍結乾燥を省略できる。例えば、沈殿物をn-ヘキサンなどの無極性溶媒で洗浄して、当該タンパク質に影響を与えることなく、有機溶媒を除去することもできる。又は、沈殿物を水性の媒質で洗浄して有機溶媒を除去し、タンパク質の塊体から余分な有機溶媒を除去することもできる。さらに、可溶性タンパク質を除去すると共に、初期放出速度が高くなることを防ぐために、沈殿物を洗浄及び/又はブレインキュベートすることもできる。

【0028】

有機化合物は溶媒である必要はなく、混合液中の構成成分であるだけでもよい。

【0029】

加えて、本タンパク質沈殿物を、ゲル、マイクロスフィア、ウェファー又はインプラントの形の当業で公知の多種の生分解性又は非生分解性材料中に配置することができる。これらの場合、放出は、固有のタンパク質放出速度と、ゲル、マイクロスフィア、ウェファー又はインプラントにより制御される放出速度の両方により、調節される。これらの調合物は非経口、経口、筋肉内、皮下、皮膚、静脈内、動脈内、病巣内、鞘内、又は、数多くの疾患の治療、予防及び診断のための他の送達部位で使用できる。

【0030】

当該タンパク質を溶媒と平衡させる間、用いる有機溶媒は沈殿物中でこのタンパク質に付着する。該有機溶媒は、当該溶液中で可溶性である他の有機化合物に部分的又は完全に置換されてもよい。該有機化合物は、例えば抗生物質、抗菌剤、アミノ配糖体、クロラムフェニコール、マクロライド、抗カビ剤、セファロsporin、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)、アドレナリン作動性アゴニスト、アドレナリン作動性アンタゴニスト、コリン作動性アゴニスト、コリン作動性アンタゴニスト、ムスカリン性アゴニスト、ムスカリン性アンタゴニスト、抗ウィルス剤、交感神経様作動薬、交感神経遮断薬、セロトニンアゴニスト、セロトニンアンタゴニスト、抗高血圧剤、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、利尿薬、抗不整脈薬、ホスホジエステラーゼ阻害剤、ジギタリス配糖体、カルシウムアンタゴニスト、血管拡張剤、プロスタグランジン、オータコイド、脂質低下剤、抗凝固剤、線維素溶解剤、血小板凝集阻害剤、抗うつ剤、ベンゾジアゼピン、抗てんかん薬、抗パーキンソン病薬、鎮痛薬、オピオイド、オピオイドペプチド、阿片剤、ペプチド、抗炎症薬(NSAID、アセトアミノフェン)、バルビツール酸塩、ペプチドホルモン、ステロイド、糖質コルチコイド、塩類コルチコイド、エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲン、抗アンドロゲン、チロキシン、トリヨードチロニン、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、抗新生物薬、及び抗ヒスタミン剤などの活性医薬であってよい。このように、当該タンパク質が放出され、溶解すると、ウシもしくはヒト血清アルブミン又は免疫グロブリンなどの他のタンパク質に連結させた、(薬物として)付着した有機化合物が送達される。従って、有機溶媒を付着させたタンパク質は効果的な送達系として使用が可能である。さらに、特定の組織又は細胞を標的にすることができる免疫グロブリン及び他のタンパク質を用いると、付着させた分子をこの組織又は細胞に送達することができる。

【0031】

本プロセスにより作製した製剤は、活性作用物質の均質もしくは不均質な混合物でもよく、又は、異なる条件(例えば異なる溶媒を用いるなど)下で調製された活性作用物質の製剤であってもよい。

【0032】

ある特定の製剤中に含有させる生物学的に活性な作用物質の量は、当業者であれば、例えば体重、治療しようとする状況、用いる高分子の種類、及び製剤からの放出速度などの因子を考慮して決定できる、治療上、予防上又は診断上の有効量である。

【0033】

生物学的に活性な作用物質はまた、例えば安定化剤、界面活性剤、可溶化剤及び充填剤など、他の医薬品添加物と混合することもできる。安定化剤は、当該作用物質の放出期間に

10

20

30

40

50

わたって、当該作用物質の効力を維持するために加えられる。適した安定化剤には、例えば、糖質、アミノ酸、脂肪酸及び界面活性剤があり、当業者に公知である。可溶化剤は、水溶液中の当該作用物質の溶解度を改変したり、又は、場合によっては、有機溶媒中の当該作用物質の溶解度を改変するために加えられる。適した可溶化剤には、当該作用物質の放出速度を制御するのに用いることができる錯化剤、例えばアルブミン及びプロタミン、がある。充填剤は典型的には不活性の材料を含んで成る。

【0034】

別の実施態様では、生物学的に活性な作用物質は、金属陽イオン成分と一緒に凍結乾燥すると、当該作用物質をさらに安定化させ、また、当該の生物学的に活性な作用物質の放出速度をさらに制御することができる。

10

【0035】

本調合物を治療薬として用いる場合、ヒト又は動物に対し、静脈内、皮下又は筋肉内注射；吸入による投与；関節内投与；粘膜投与；眼内投与；及び局所投与を含め、経口又は非経口投与により、投与してよい。静脈内投与にはカテーテル導入法又は血管形成術が含まれる。

【0036】

他の実施態様では、本製剤は、例えば水供給又は水処理施設への薬剤（例えば酵素）の放出など、治療目的以外の水環境で用いることができる。

【0037】

例えば用いようとする調合物がマイクロ粒子を形成可能にするためなど、本調合物には、活性な作用物質に加え、他の適した高分子を含めることができる。ある好適な実施態様では、この方法で用いる高分子は生体適合性があるものである。ある高分子に生体適合性がある、とは、当該高分子、及び、代謝産物など当該高分子の何らかの分解生成物、が、当該高分子を投与したヒト又は動物にとって有毒でなく、かつ、例えば注射部位における免疫反応など、レシピエントの身体に対して何の有意な有害もしくは薬害作用がないことである。生体適合性のある高分子は生分解性高分子でも、非生分解性高分子でも、これらの混成物でも、又は、これらのコポリマーでもよい。

20

【0038】

適した生体適合性ある、非生分解性高分子には、例えば、ポリアクリレート、エチレン酢酸ビニルポリマー及び他のアシル置換酢酸セルロースのポリマー、非分解性ポリウレタン、ポリスチレン、塩化ポリビニル、フッ化ポリビニル、ポリ(ビニルイミダゾール)、クロロスルホネートポリオレフィン、酸化ポリエチレン、これらの混成物及びコポリマー、がある。

30

【0039】

適した生体適合性ある、生分解性ポリマーには、例えばポリ(ラクチド)、ポリ(グリコリド)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリカーボネート、ポリエステルアミド、ポリ無水物、ポリ(アミノ酸)、ポリオルトエステル、ポリアセタル、ポリシアノアクリレート、ポリエーテルエステル、ポリかプロラクトン、ポリ(ジオキサノン)、ポリ(アルキレンアルキレート)、ポリウレタン、これらの混成物及びコポリマー、がある。ポリ(ラクチド)を含んで成る高分子、ラクチド及びグリコリドのコポリマー、これらの混成物、又はこれらの混合物、がより好ましい。前記高分子は、単一の異性体種の単量体からも、又は、異性体の混合物からも、形成することができる。

40

【0040】

この方法で用いる高分子は、ブロックしてある高分子でも、ブロックしていない高分子でも、又は、ブロックしてある高分子とブロックしていない高分子の混成物でもよい。ブロックしていない高分子は、当業で従来定義されているように、具体的には遊離カルボキシル末端基を有するものである。またブロックしてある高分子とは、当業で従来定義されているように、具体的にはカルボキシル末端基をブロックしてあるものである。一般的に、ブロック基は重合反応の開始材料を由来とし、典型的にはアルキルラジカルである。

50

【0041】

いくつかの実施態様では、本調合物を凍結乾燥により調製する。最も簡単な形の凍結乾燥装置は、湿潤試料材料を中に配置して、蒸発冷却及び凍結により試料を凍結させた後、水蒸気圧を三重点圧未満に維持できるような真空室が、水蒸気を取り除く手段と共に成るものである。

【0042】

実施例 1

アルコール / 水溶液中で沈殿した凍結乾燥させたタンパク質試料からのウシ血清アルブミン (BSA) の放出を最長 8 1 1 時間、測定した。この実施例では、試料の調製及び分析方法を簡単に解説し、BSAの制御放出を示した結果を紹介する。この放出は、用いる特定の

10

【0043】

BSA (USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868) の5%(w/w) 溶液を、0.01Mの酢酸緩衝液で、等容の0.005M酢酸ナトリウム及び0.005M酢酸を用いて調製した。pHはほぼ5だった。アルコールn-プロパノールを濃度が40%(v/v)になるまで加えた。室温で一晩かけて平衡させた後、上清を取り除き、沈殿物を-20で凍結させ、-70にした後に凍結乾燥させた。バイアルを載せる表面と凍結乾燥装置のチャンバを予冷して、凍結乾燥の段階で試料が凍結したままで維持されるようにした。試料は5時間、凍結乾燥させた。この凍結乾燥時間は、凍結乾燥させようとする体積に応じてこれより長くても、又は短くてもよい。凍結乾燥後の試料をへらでいくつかの破片に分割した。これらの破片をガラス製バイアルの壁及び底に向かって押しつぶして小さな粒子に分けた。大きな塊及び小さく破碎された粒子の重さを量り、5乃至10mgの塊及び破碎粒子を別々の1.5ml入りの円錐形のポリプロピレン製試験管に入れた後、1mlのリン酸緩衝生理食塩水を加えた。これらの塊又は粒子をこの液体中に分配した。この試料を分配してから1時間後、試験管の中身を再度混合し、これら試験管を5,000rpmで5分間、遠心分離した (エッペンドルフ・セントリフュージ、モデル番号5415)。0.1mlの試料を検定用に取り出し、0.1mlのPBSに替えた。この手法を繰り返して65時間毎に試料を採取した。98時間目及びその後の各時点で、全体積の放出媒質を取り出し、新鮮な1mlのPBSに替えた。

20

【0044】

96ウェル微量定量プレートを用いた微量定量プレート用のマイクロ検定法 (ブラッドフォード法に基づくバイオ-ラド社のタンパク質検定; クーマシー・プリリアント・ブルー染料、カタログ番号500-0006) により、試料をタンパク質含有量について分析した。標準は5乃至60 μ g/mlのBSAを含有していた。標準及び試料をウェルにまず容積0.16mlになるように加え、次に40 μ lの染料を各ウェルに混合しながら加えてから、630nmでの吸光度を読み取った。添加タンパク質 (BSA) の非存在時の空試験値を補正済みの吸光度から標準曲線を作製した。同じロットのBSAに基づくと共に、BSAの重量対全容積(w/v)に基づいて作製されたこの標準曲線から、試料のタンパク質濃度を計算した。様々な時点で放出されたタンパク質の数値を、供給業者 (USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868) の瓶から直接採ったBSAから量り取って溶液に加えた、凍結乾燥させたBSAのタンパク質濃度の違いを調べることで、調節した。

30

40

【0045】

この制御放出の結果を図1に示す [nPはn-プロパノールを表す]。図示のように、ほとんどもしくは全くバースト効果がなく、放出は基本的に線形である。表面積対質量の比が大きい小さな粒子の方が、より速い速度で放出する。最初の数時間の放出中の放出速度が僅かに速いようである (図1)。このより速い放出速度は、使用前に試料を媒質中でプレインキュベートしておくこと、なくすことができる。

【0046】

実施例 2

アルコール / 水溶液中で沈殿した凍結乾燥させたタンパク質試料からのBSAの放出を最長

50

8 1 1 時間、測定した。この実施例では、試料の調製及び分析方法を簡単に解説し、BSAの制御放出を示した結果を紹介する。この放出は、用いる特定のアルコール、用いる緩衝剤、及び、沈殿及び凍結乾燥させたタンパク質の粒子サイズの影響を受ける。

【 0 0 4 7 】

BSA (USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868) の5%(w/w) 溶液を、0.1Mの酢酸緩衝液で、等容の0.05M酢酸ナトリウム及び0.05M酢酸を用いて調製した。pHはほぼ5だった。アルコールn-プロパノールを濃度が50%(v/v)になるまで加えた。室温で一晩かけて平衡させた後、上清を取り除き、沈殿物を-20で凍結させ、-70にした後に凍結乾燥させた。バイアルを載せる表面と凍結乾燥装置のチャンバを予冷して、凍結乾燥の段階で試料が凍結したままで維持されるようにした。試料は5時間、凍結乾燥させた。この凍結乾燥時間は、凍結乾燥させようとする体積に応じてこれより長くても、又は短くてもよい。凍結乾燥後の試料をへらでいくつかの破片に分割した。これらの破片をガラス製バイアルの壁及び底に向かって押しつぶして小さな粒子に分けた。大きな塊及び小さく破碎された粒子の重さを量り、5乃至10mgの塊及び破碎粒子を別々の1.5ml入りの円錐形のポリプロピレン製試験管に入れた後、1mlのリン酸緩衝生理食塩水を加えた。これらの塊又は粒子をこの液体中に分配した。この試料を分配してから1時間後、試験管の中身を再度混合し、これら試験管を5,000rpmで5分間、遠心分離した(エッペンドルフ・セントリフュージ、モデル番号5415)。0.1mlの試料を検定用に取り出し、0.1mlのPBSに替えた。この手法を繰り返して65時間毎に試料を採取した。98時間目及びその後の各時点で、全体積の放出媒質を取り出し、新鮮な1mlのPBSに替えた。

10

20

【 0 0 4 8 】

96ウェル微量定量プレートを用いた微量定量プレート用のマイクロ検定法(ブラッドフォード法に基づくバイオ-ラド社のタンパク質検定; クーマシー・プリリアント・ブルー染料、カタログ番号500-0006)により、試料をタンパク質含有量について分析した。標準は5乃至60µg/mlのBSAを含有していた。標準及び試料をウェルにまず容積0.16mlになるように加え、次に40µlの染料を各ウェルに混合しながら加えてから、630nmでの吸光度を読み取った。添加タンパク質(BSA)の非存在時の空試験値を補正済みの吸光度から標準曲線を作製した。同じロットのBSAに基づくと共に、BSAの重量対全容積(w/v)に基づいて作製されたこの標準曲線から、試料のタンパク質濃度を計算した。様々な時点で放出されたタンパク質の数値を、供給業者(USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868)の瓶から直接採ったBSAから量り取って溶液に加えた、凍結乾燥させたBSAのタンパク質濃度の違いを調べることで、調節した。

30

【 0 0 4 9 】

この制御放出の結果を図2に示す[nPはn-プロパノールを表す]。図示のように、全くバースト効果がなく、放出は基本的に線形である。表面積対質量の比が大きい小さな粒子の方が、より速い速度で放出する。最初の数時間の放出中の放出速度が僅かに速いようである(図2)。このより速い放出速度は、使用前に試料を媒質中でプレインキュベートしておく、なくすことができる。

【 0 0 5 0 】

実施例3

アルコール/水溶液中で沈殿した凍結乾燥させたタンパク質試料からのBSAの放出を最長811時間、測定した。この実施例では、試料の調製及び分析方法を簡単に解説し、BSAの制御放出を示した結果を紹介する。この放出は、用いる特定のアルコール、用いる緩衝剤、及び、沈殿及び凍結乾燥させたタンパク質の粒子サイズの影響を受ける。

40

【 0 0 5 1 】

BSA (USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868) の5%(w/w) 溶液を、0.01Mの酢酸緩衝液で、等容の0.005M酢酸ナトリウム及び0.005M酢酸を用いて調製した。pHはほぼ5だった。t-ブチルアルコールを濃度が40%(v/v)になるまで加えた。室温で一晩かけて平衡させた後、上清を取り除き、沈殿物を-20で凍結させ、-70にした後に凍結乾燥させた。バイアルを載せる表面と凍結乾燥装置のチャンバを予

50

冷して、凍結乾燥の段階で試料が凍結したままで維持されるようにした。試料は5時間、凍結乾燥させた。この凍結乾燥時間は、凍結乾燥させようとする体積に応じてこれより長くても、又は短くてもよい。凍結乾燥後の試料をへらでいくつかの破片に分割した。これらの破片をガラス製バイアルの壁及び底に向かって押しつぶして小さな粒子に分けた。大きな塊及び小さく破碎された粒子の重さを量り、5乃至10mgの塊及び破碎粒子を別々の1.5ml入りの円錐形のポリプロピレン製試験管に入れた後、1mlのリン酸緩衝生理食塩水を加えた。これらの塊又は粒子をこの液体中に分配した。この試料を分配してから1時間後、試験管の中身を再度混合し、これら試験管を5,000rpmで5分間、遠心分離した(エッペンドルフ・セントリフュージ、モデル番号5415)。0.1mlの試料を検定用に取り出し、0.1mlのPBSに替えた。この手法を繰り返して65時間毎に試料を採取した。98時間目及びその後の各時点で、全体積の放出媒質を取り出し、新鮮な1mlのPBSに替えた。

10

【0052】

96ウェル微量定量プレートを用いた微量定量プレート用のマイクロ検定法(ブラッドフォード法に基づくバイオ-ラド社のタンパク質検定; クーマシー・ブリリアント・ブルー染料、カタログ番号500-0006)により、試料をタンパク質含有量について分析した。標準は5乃至60 μ g/mlのBSAを含有していた。標準及び試料をウェルにまず容積0.16mlになるように加え、次に40 μ lの染料を各ウェルに混合しながら加えてから、630nmでの吸光度を読み取った。添加タンパク質(BSA)の非存在時の空試験値を補正済みの吸光度から標準曲線を作製した。同じロットのBSAに基づくと共に、BSAの重量対全容積(w/v)に基づいて作製されたこの標準曲線から、試料のタンパク質濃度を計算した。様々な時点で放出されたタンパク質の数値を、供給業者(USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868)の瓶から直接採ったBSAから量り取って溶液に加えた、凍結乾燥させたBSAのタンパク質濃度の違いを調べることで、調節した。

20

【0053】

この制御放出の結果を図3に示す[tBAはt-ブチルアルコールを表す]。図示のように、大きなバースト効果はなく、放出は最初の数時間を過ぎた後は基本的に線形である。表面積対質量の比が大きい小さな粒子の方が、より速い速度で放出する。最初の数時間の放出中の放出速度が僅かに速いようである(図3)。このより速い放出速度は、使用前に試料を媒質中でプレインキュベートしておく、なくすことができる。

【0054】

実施例4

アルコール/水溶液中で沈殿した凍結乾燥させたタンパク質試料からのBSAの放出を最長811時間、測定した。この実施例では、試料の調製及び分析方法を簡単に解説し、BSAの制御放出を示した結果を紹介する。この放出は、用いる特定のアルコール、用いる緩衝剤、及び、沈殿及び凍結乾燥させたタンパク質の粒子サイズの影響を受ける。

30

【0055】

BSA(USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868)の5%(w/w)溶液を、0.1Mの酢酸緩衝液で、等容の0.05M酢酸ナトリウム及び0.05M酢酸を用いて調製した。pHはほぼ5だった。アルコールであるt-ブチルアルコールを濃度が40%(v/v)になるまで加えた。室温で一晩かけて平衡させた後、上清を取り除き、沈殿物を-20で凍結させ、-70にした後に凍結乾燥させた。バイアルを載せる表面と凍結乾燥装置のチャンバを予冷して、凍結乾燥の段階で試料が凍結したままで維持されるようにした。試料は5時間、凍結乾燥させた。この凍結乾燥時間は、凍結乾燥させようとする体積に応じてこれより長くても、又は短くてもよい。凍結乾燥後の試料をへらでいくつかの破片に分割した。これらの破片をガラス製バイアルの壁及び底に向かって押しつぶして小さな粒子に分けた。大きな塊及び小さく破碎された粒子の重さを量り、5乃至10mgの塊及び破碎粒子を別々の1.5ml入りの円錐形のポリプロピレン製試験管に入れた後、1mlのリン酸緩衝生理食塩水を加えた。これらの塊又は粒子をこの液体中に分配した。この試料を分配してから1時間後、試験管の中身を再度混合し、これら試験管を5,000rpmで5分間、遠心分離した(エッペンドルフ・セントリフュージ、モデル番号5415)。0.1mlの試料を検定用

40

50

に取り出し、0.1mlのPBSに替えた。この手法を繰り返して65時間毎に試料を採取した。98時間目及びその後の各時点で、全体積の放出媒質を取り出し、新鮮な1mlのPBSに替えた。

【0056】

96ウェル微量定量プレートを用いた微量定量プレート用のマイクロ検定法(ブラッドフォード法に基づくバイオ-ラド社のタンパク質検定; クーマシー・プリリアント・ブルー染料、カタログ番号500-0006)により、試料をタンパク質含有量について分析した。標準は5乃至60 μ g/mlのBSAを含有していた。標準及び試料をウェルにまず容積0.16mlになるように加え、次に40 μ lの染料を各ウェルに混合しながら加えてから、630nmでの吸光度を読み取った。添加タンパク質(BSA)の非存在時の空試験値を補正済みの吸光度から標準曲線を作製した。同じロットのBSAに基づくと共に、BSAの重量対全容積(w/v)に基づいて作製されたこの標準曲線から、試料のタンパク質濃度を計算した。様々な時点で放出されたタンパク質の数値を、供給業者(USB、アマーシャム・ライフ・サイエンセズ社製、カタログ番号10868)の瓶から直接採ったBSAから量り取って溶液に加えた、凍結乾燥させたBSAのタンパク質濃度の違いを調べることで、調節した。

10

【0057】

この制御放出の結果を図4に示す[tBAはt-ブチルアルコールを表す]。図示のように、大きなバースト効果はなく、放出は最初の数時間を過ぎた後は基本的に線形である。表面積対質量の比が大きい小さな粒子の方が、より速い速度で放出する。最初の数時間の放出中の放出速度が僅かに速いようである(図4)。このより速い放出速度は、使用前に試料を媒質中でプレインキュベートしておく、なくすことができる。

20

【0058】

放出データの比較。全試料に関する放出動態の比較を一枚の表(図5)でまとめて示す。これら多様な試料の有する放出動態の継続時間は、500時間(21日間)から約10,000時間(1年を越える)まで様々であることが窺える。試料の組合せにより、様々な時点で多様な放出速度を持つ放出動態を生み出すことができる。小型の粒子は、最も急速に放出する製剤(図5; 図4; 0.1M酢酸塩; t-ブチルアルコール、40%)を例外として、速い放出速度を示した。これらの結果は、塩濃度及びアルコールの種類により、放出速度を広範に調節できることを実証するものである。

30

【0059】

実施例5乃至13の概略的材料及び方法

(i) 材料

- ・ウシ血清アルブミン(カタログ番号10868、ロット番号107331、USB)
- ・ヒト血清アルブミン(カタログ番号10878、ロット番号103077、USB)
- ・アルブミン(ヒト)25%溶液: イムノ-U.S.社製(NDC64193-228-05、ロット番号628808)
- ・アルブミン(ヒト)25%溶液: アルファ・セラピューティック社製(カタログ番号521302、ロット番号NG9856A)
- ・インターフェロン-001(PBL)0.94mg/mlのTris緩衝液溶液[さらに米国特許第5,789,551号、第5,869,293号、第6,001,589号、第6,299,870号、第6,300,474号も参照されたい]
- ・インターフェロン-12(PBL)1.38mg/mlのTris緩衝液溶液
- ・Tris緩衝液(20mmのTris、200mmのNaCl、6%のグリセロール、pH7-8)
- ・インターフェロンELISA(PBL製品番号41110)
- ・PBS(ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、シグマ・ケミカル社製のカタログ番号8537、又はギブコ-BRL社製のカタログ番号14198-144)

40

【0060】

(ii) 方法

タンパク質の沈殿 タンパク質は、有機添加法又は酸添加法という二つの基本的な手法の一つにより、周囲温度(約24)で沈殿させた。有機添加法では、タンパク質溶液を水

50

溶液として調製し、有機成分を添加してタンパク質を沈殿させた。(代替的には、タンパク質を含有する水溶液を有機溶液に添加することもできる。)酸添加法の場合、有機成分の一部を、タンパク質が沈殿しないような条件下でタンパク質溶液に加えた。沈殿は、タンパク質溶液に有機成分を加えるのと同様、又は加えた後で、酸性溶液を添加することで、開始させた。説明に特に他に明示する場合を除き、脱イオン水を用いて調合試薬を希釈した。25%原料材料を1%の最終濃度に希釈することでHSA保存溶液を作製し、提示したデータは、イムノ-U.S.社製ヒト血清アルブミンを用いて得た。

【0061】

pHの調節 . 有機溶媒はpHを正確に測定する際の障害となるため、いずれの調合物に関して明示したpHも、有機成分を加える前の(水)溶液のpHを言うものである。有機添加法の場合、当該タンパク質水溶液のpHを、有機成分を加える直前に所望のpHに調節した。酸添加法で同じ調合物を作製するために、有機溶媒を加える前でなく、最終ステップで、等量の酸を添加した。

10

【0062】

成熟法 . 成熟期間は、沈殿を開始させるために最後の調合物成分を加えた後に開始し、上清から沈殿物を分離するために遠心分離を開始した時点で終了した。沈殿物の放出特性は、成熟期間やこの期間中の調合物の状態に左右される。他に明示しない限り、温度は約24℃という周囲温度であった。容器を回転させて調合物を混合し、試験管内か、又は、磁気攪拌棒を入れたバイアル中で攪拌するか、あるいは最初に混合して後は静置した。さらに、成熟期間中、調合物のいくつかを、成熟期間の終わりにかけて1乃至3回、吸引により注射針を通過させた。

20

【0063】

洗浄法 . 沈殿物を洗浄する最初のステップは、1)遠心分離により、上清から沈殿物を分離する、2)沈殿物に触れないように、できるだけ多くの上清を取り除く、及び3)該沈殿物をPBS/0.01%チメロサル中に再懸濁させる、ことであった。沈殿物を回収し、(PBS/0.01%チメロサル中に入れて、)ベックマン又はエッペンドルフ・マイクロセントリフュージで3,000乃至15,000rpmを2乃至5分間、1回又は2回、遠心分離をかけて、洗浄した。回収した上清の試料をPBS/0.01%チメロサルで10倍に希釈して(有機物及び酸の希釈を通じて)、希釈された上清中でタンパク質がさらに沈殿しないようにした。放出実験をすぐに開始する場合には、最後に回収された洗浄試料をゼロ時間試料とラベルし、再懸濁させた製剤を37℃にしたインキュベータ内に配置した。この37℃という温度ですべての試料について放出を測定した。代替的には、試料を最初の回収後又は洗浄サイクル後に、再懸濁させずに凍結乾燥させてもよい。

30

【0064】

凍結乾燥 . 洗浄を行わずに凍結乾燥させる沈殿物を0乃至4℃まで冷却してから、-20℃、-70℃、及び-135℃まで、各温度で少なくとも15分間、順に冷却した。PBS/0.01%チメロサルで洗浄後に凍結乾燥させる沈殿物は-20℃までにのみ、冷却した。調合物は、ユニット100SMバルク/ストッピング・チャンバを取り付けたウィルテイス・フリーズモービル6で凍結乾燥させた。この凍結乾燥装置の棚は、フリーザからこの棚にバイアルを移すまでにドライアイスで予め冷却しておいた。バイアルは400ml未満で2乃至5時間、凍結乾燥させた。

40

【0065】

放出の測定 . 総量1mlの放出媒質(PBS/0.01%チメロサル)を作製するのに十分なPBSを洗浄及び/又は凍結乾燥させた沈殿物に加えた。各沈殿物を放出媒質(PBS/0.01%チメロサル)に懸濁させてから、この放出試料を37℃のインキュベータ内に配置して、タンパク質の放出の測定を開始した。所定の時間間隔で、放出媒質と一緒に試料を含有する試験管をインキュベータから取り出して、2乃至5分間、3,000乃至15,000rpmで遠心分離した。上清中に放出タンパク質を含有する媒質の大半は通常約0.9mlであり、この約0.9mlを取り出して、等容の新鮮なPBS/0.01%チメロサルと取り替えた。

【0066】

50

試料の分析 . アルブミン試料をそのまま検定するか、又は、バイオ - ラド・プロテイン・アッセイ (バイオ - ラド・ラプズ社製) の範囲まで、PBS/0.01%チメロサルで希釈した。調合物中の原料アルブミン原材料から希釈した保存溶液を検定標準として用いた。インターフェロン試料を、そのままか、又は、PBS/0.01%チメロサルで希釈して、ELISA法で検定した (PBLバイオメディカル・ラボラトリーズ社製、製品番号41110)。

【0067】

計算 . n回目試料中の放出量を、それまでの試料中に放出された量の合計に加算して、各試料時点で放出された分析物の累積量を計算した。典型的には1.0mlの総量のうち0.9mlが各試料間で回収されるため、n回目試料中の放出量を、試験管に残った前回試料分の量について補正した。放出された累積量を、放出された質量に対して、又は、37 °Cでのインキュベーション開始時 (放出の開始時) に沈殿物中に存在する計算上の総分析物のパーセンテージに対して、で表にした。放出の開始時に沈殿物中に存在する総分析物は、上清及び洗浄試料中で回収された分析物量を、調合物に加えられた分析物の当初の量から減算することで、計算した。

10

【0068】

実施例 5

持続性放出の実施態様として、HSA及びヒトIFN- γ 012の放出を、酢酸ナトリウム濃度の関数として、図6に示すように評価した。溶液Iは9.0mgのHSA (イムノ - U . S . 社製) 及び10 μ gのIFN- γ 012を溶かした40%(w/w)n-プロパノール (0.364g n-プロパノール) 水溶液を総重量0.91gにしたものから成った。様々な溶液II組成物は、様々な量の酢酸ナトリウム (1M、pH6.3) 及び脱イオン水及び0.040gをn-プロパノールに溶かして、40% n-プロパノール溶液とし、250、450、及び600mMの最終酢酸ナトリウム濃度とし、総量を0.10gとしたものから成った。溶液II (0.10g) を攪拌しながら溶液I (0.91g) に加え、最終1.01gの各調合物とした。40% n-プロパノール及び25、45、及び60mM濃度の酢酸ナトリウムを含有する該最終1.01gの調合物を2ml入りのガラス製バイアル中で6時間、24 °Cで攪拌した後、25Gの注射針を通過させた直後に、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中のHSA及びIFN- γ 012の量を材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。図示のように、持続放出の初期のバースト相並びにHSA及びヒトIFN- γ 012の放出速度は、酢酸ナトリウム濃度で変化させることができる。酢酸ナトリウム濃度が高いときにバースト速度 (0乃至24時間) が著しく低下し、HSA及びヒトIFN- γ 012の放出速度も低下する (図6A乃至D)。放出は約7日間の分析期間後も続いた。ヒトIFN- γ 012の放出のバースト相は、酢酸ナトリウム濃度に特に感受性が高い。この放出を約160時間 (6日を越えて) 観察した。

20

30

【0069】

実施例 6

HSAの放出に及ぼす、調合物中の陽イオン種の作用を図7A、Bに示す。溶液Iは、8.1mgのHSA (イムノ - U . S . 社製) を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量0.91mlにしたものから成った。様々な溶液II組成物は、多様な塩保存溶液 (それぞれ1M陽イオン濃度、pH6.3) を脱イオン水に加えずに、又は0.025ml加えた後、n-プロパノールを加えて、40%(w/w)n-プロパノールの溶液とし、最終陽イオン濃度は250mM、総量は0.10mlとしたものから成った。溶液II (0.10ml) を0.91mlの溶液Iに攪拌しながら加えて、40%(w/w)n-プロパノールを有する最終1.01ml調合物を生成させた。40%のn-プロパノールと、なし又は25mM濃度の酢酸カリウム、酢酸ナトリウム又は酢酸マグネシウムを含有するこれら最終1.01ml調合物を、2ml入りのガラス製バイアル中で6時間、24 °Cで攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中のHSA量を材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。最初の24時間のバースト速度は、調合物中のナトリウムにより大きく低下し、またマグネシウムによりさらに低下した。その上、放出速度は多様な酢酸塩を用いると上下させることができる。これらの調合物すべてで、25日間を越える (600時間を越える) 放出速度の延長に成功した。放出はグラフで測定された時間を過ぎても継続したと予測された (図7A、B)

40

50

。この放出を600時間即ち25日間を越えて観察した。

【0070】

実施例7

ヒトIFN-012の放出に及ぼす、調合物中の陽イオン種の作用を図8A、Bに示す。溶液Iは、45mgのHSA(イムノ-U.S.社製)及び5.44 μ gのIFN-012を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量4.55mlとしたものから成った。多様な溶液II組成物は、36 μ lの0.1M酢酸(HSA溶液の緩衝能を補正するため)及び0.250gの酢酸カリウム、酢酸ナトリウム又は酢酸マグネシウム溶液(それぞれpH6.3)を、0.314gの脱イオン水及び0.400gのn-プロパノールに加えて40%(w/w)n-プロパノール及び250mM最終酢酸濃度の溶液を、総量1gになるように作製したものから成った。該酢酸カリウム溶液は、0.980gの酢酸カリウム、10.061gの水及び0.274mlの1M酢酸で作製した。該酢酸ナトリウム溶液は、0.823gの酢酸ナトリウム、10.056gの水及び0.245mlの1M酢酸で作製した。該酢酸マグネシウム溶液は、2.144gの酢酸マグネシウム、10gの水及び0.200mlの1M酢酸で作製した。溶液II(0.50ml)を4.55mlの溶液Iに攪拌しながら加えて、40%(w/w)n-プロパノールを有する最終5.05ml調合物を生成させた。この最終調合物を50ml入り円錐形試験管内で6時間、24で攪拌し、沈殿物を5mlのPBS/0.01%チメロサルで洗浄した後、5mlのPBS/0.01%チメロサル中に懸濁させてから、二つの別々の2.5ml試料に分割した後、沈殿物から上清を分離した。放出データは、一方の2.5ml部分の調合物から採った沈殿物のものである。調合物中の塩濃度は、それぞれの溶液中、21mM NaOAc、20mM KOAc及び18mM Mg(OAc)₂である。洗浄後の沈殿物中のIFN-012の量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。バースト速度は、酢酸カリウムから酢酸ナトリウム、そして酢酸マグネシウムへと、この順に大きく低下させることができる(図8)。加えて、放出の全体的速度もこれらの塩で調節できる。IFN-012の放出速度は酢酸カリウムの場合が一番速く、酢酸ナトリウムがそれより遅く、そして酢酸マグネシウムの場合が最も遅い(図8)。放出を約170時間即ち7日間、観察した。

10

20

【0071】

実施例8

ヒトIFN-012の放出に及ぼす、調合物のpHの作用を図9に示す。酢酸(0.1M)を用いて5% HSA保存溶液をpH5.0又はpH7.0に調節した。溶液Iは、pH5.0又はpH7.0のHSA保存溶液のいずれかのうちの10mgのHSA(アルファ・セラピューティック社製)と、6.83 μ gのIFN-012と付加的な水とを、総量0.6gになるようにしたものから成った。最終調合物は、0.4gのn-プロパノールを溶液Iに攪拌しながら加えて濃度を40%(w/w)n-プロパノールにして調製した。最終調合物1gを2ml入りガラス製バイアル内で24時間、24で攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中のIFN-012の量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。バーストはpH5.0及びpH7.0のときの両方で中程度であり、両方のpH値で著明に線形に近づいた(図9)。pHが低い方が、放出速度が大きく上昇した。見られた全体的バースト効果は相対的に小さいか、又は全くなかった。放出を約240時間即ち10日間、観察した。

30

【0072】

実施例9

HSA及びヒトIFN-012の放出に及ぼす、調合物のpHの作用を示す(図10A-D)。溶液Iは、45mgのHSA(イムノ-U.S.社製)及び5.44 μ gのIFN-012を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量4.55mlとしたものから成った。溶液II組成物は以下の通りに調製した。溶液IIa: 1.55mlの1M酢酸を0.82gの無水酢酸ナトリウム及び10gの脱イオン水に加えて、この溶液AのpHを5.52に調節し;その後、0.036mlの0.1M酢酸を0.250gの溶液Aに加えて、HSA溶液の緩衝能を補正した;次に脱イオン水を加えて総重量を0.600gとした;次に0.400gのn-プロパノールを加えて40%(w/w)n-プロパノールの最終溶液を総量1.00g、作製した。溶液IIb: 0.40mlの1M酢酸を0.82gの無水酢酸ナトリウム及び10gの脱イオン水に加えて、この溶液BのpHを6.13に調節した;次に、0.036mlの

40

50

0.1M酢酸を0.250gの溶液Bに加えて、HSA溶液の緩衝能を補正した；次に脱イオン水を加えて総重量を0.600gとした；次に0.400gのn-プロパノールを加えて40%(w/w)n-プロパノールの最終溶液を総重量1.00g、作製した。溶液I I c：0.245mlの1M酢酸を0.823gの無水酢酸ナトリウム及び10.056gの脱イオン水に加えて、この溶液CのpHを6.31に調節した；次に0.036mlの0.1M酢酸を0.250gの溶液Cに加えてHSA溶液の緩衝能を補正した；次に脱イオン水を加えて総重量を0.600gにした。次に0.400gのn-プロパノールを加えて40%(w/w)n-プロパノールの最終溶液を総重量1.00g、作製した。これら最終調合物を調製するためには、0.50mlの溶液I I a、I I b、又はI I cを4.55mlの溶液Iに攪拌しながら加えて、40%(w/w)n-プロパノールを有し、それぞれpH5.52、pH6.13又はpH6.31の三種類の調合物を5.05ml、作製した。最終調合物を50ml入りの円錐形試験管内で6時間、24で攪拌した後、二つの別々の2.52ml試料に分割してから、上清を沈殿物から分離した。放出データはその調合物の一つの2.52ml部分のものである。洗浄後の沈殿物中のIFN-012の量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出は、PBS/0.01%チメロサル中で行わせた。HSAの全体的なバーストはすべてのpH値で僅か(pH5.52、pH6.13及びpH6.31(図10A、B)だったが、ヒトIFN-012については僅かにこれらより大きかった(図10C、D)。HSA及びヒトIFN-012の両方の放出速度は、図9にも示すように、すべての場合で(図10A-D)pHを低下させることにより、上昇した。pHを少し変化させるだけで、放出速度を調節できること、そして放出の全体的な変化はHSA及びIFN-012と同じであることに、注目されたい。

10

20

30

40

50

【0073】

実施例10

HSA及びヒトIFN-001の、25mM酢酸ナトリウムの存在下で形成された沈殿物からの放出に及ぼす、調合物の酸濃度の作用を図11に示す。溶液Iは、8.1mgのHSA(イムノ-U.S.社製)及び0.92 μ gのIFN-001を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量0.9mlにしたものから成った。それぞれ0.004、0.010、0.015及び0.025mlの0.1M酢酸の40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液から成る、いくつかの溶液I I調合物、I I a、I I b、I I c及びI I dを調製した。溶液I I Iは1Mの酢酸ナトリウムの40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量0.025mlにしたものから成った。それぞれ0.071、0.065、0.060及び0.050mlの40%(w/w)n-プロパノールの脱イオン水溶液から成るいくつかの溶液I V調合物、I V a、I V b、I V c及びI V dを調製した。これら最終調合物を調製する際に、溶液I I a、I I b、I I c及びI I dをそれぞれ溶液I V a、I V b、I V c及びI V dに合わせた。溶液I I、I I I及びI Vを一緒にして混合してから、溶液Iを素早くこれらの混合液に加えて、最終1ml調合物を作製した。このようにして、最終濃度25mMの酢酸ナトリウム、40%(w/w)n-プロパノール及び図示した最終酢酸濃度を有する調合物を作製した。調合物を2ml入りのガラス製バイアル内で6時間、24で攪拌してから、沈殿物から上清を分離した。洗浄後、沈殿物を4時間、400mトル未満で凍結乾燥させた。洗浄後の沈殿物中のHSAの量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。酢酸量を増加すると、図9及び10に示すようなpHを低下させたときのバーストの上昇に匹敵するバーストの上昇がある。さらに、酸の量を増加させたときの放出速度も、図9及び10に示すようなpHを低下させたときの放出速度の上昇に匹敵する上昇を見せる。HSA及びヒトIFN-001の放出を、約90時間観察した(図11A-D)。

【0074】

実施例11

1.5mM酢酸の存在下で形成された沈殿物からのHSA及びヒトIFN-001の放出に対し、調合物の塩濃度が及ぼす作用を図12に示す。溶液Iは、8.1mgのHSA(イムノ-U.S.社製)及び0.92 μ gのIFN-001を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量0.9mlにしたものから成った。溶液I Iは、0.1M酢酸及び40%(w/w)n-プロパノールの脱イオン水溶液を総量0.015mlにしたものから成った。それぞれ0、0.015、0.025及び0.035mlの1m酢酸ナトリウムを溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液から成るいくつかの溶

液 I I I 調合物、I I I a、I I I b、I I I c 及び I I I d を調製した。それぞれ 0.085、0.070、0.060 及び 0.050ml の 40% (w/w) n-プロパノールの脱イオン水溶液から成るいくつかの溶液 I V 調合物、I V a、I V b、I V c 及び I V d を調製した。これらの最終調合物を調製する際、溶液 I I I a、I I I b、I I I c 及び I I I d をそれぞれ溶液 I V a、I V b、I V c 及び I V d と合わせた。溶液 I I、I I I 及び I V を混合して一緒にした後、溶液 I を素早くこの混合液に加えて、最終 1ml 調合物を作製した。こうして最終酢酸濃度 1.5mM、40% (w/w) n-プロパノール (w/w) となり、図示した最終的なナトリウム濃度となった。調合物を 2ml 入りのガラス製バイアル内で 6 時間、24 で攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後、沈殿物を 4 時間、400 mトル未満で凍結乾燥させた。洗浄後の沈殿物中の HSA 及び IFN-001 の量を材料及び方法の項で解説したように調べた。放出は PBS/0.01% チメロサル中で行わせた。塩濃度を上昇させると、HSA (図 12 A、B) 及び IFN-001 (図 12 C、D) のバーストが抑えられ、放出速度が低下する。バーストの大半は、酢酸ナトリウム濃度を 15mM より上にするとなくすことができる。放出を約 90 時間、観察した。

10

【0075】

実施例 12

三級ブタノール沈殿物の場合の HSA の放出に及ぼす、調合物の塩濃度及び pH の作用を図 13 に示す。酢酸 (0.1M) を用いて 5% HSA 保存溶液を pH 5.35 又は 7.0 に調節した。溶液 I は、pH 5.35 又は pH 7.0 の 5% 保存溶液から採った 18.0mg の HSA (アルファ・セラピューティック社製)、1.0µg の IFN-012 及び脱イオン水から成り、この溶液の総重量は 0.375g であった。それぞれ 0.02M 及び 0.1M の NaCl 濃度を有する溶液 I I a 及び I I b を調製するために、十分な脱イオン水を 3.75M NaCl 溶液の 0.021 及び 0.0043ml に加えて、各溶液の総重量を 0.425g にした。溶液 I (0.375g) の pH 5.35 及び pH 7.0 変形版の両者を溶液 I I a 及び I I b に加えて、図面に示すように様々な組合せの pH 及び NaCl 濃度を持つ 0.80g を作製してから、0.31 又は 0.47g の t-ブチルアルコールを加えて、28.1% 及び 36.9% (w/w) t-ブチルアルコールとした (表の解説の要約を参照されたい)。最終的な 1.11 乃至 1.27g の調合物を 2ml 入りのガラス製バイアル中で 24 時間、24 で攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中の HSA の量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出は PBS/0.01% チメロサル中で行わせた。t-ブチルアルコールを加えた調合物中では、pH はバーストにほとんど影響を与えていなかった (図 13 A 及び B)。さらに、HSA の放出速度は、n-プロパノールを加えた調合物の場合とは対照的に、pH の低下と共に低下した (図 9 及び 10)。にもかかわらず、HSA の全体的な放出速度は、350 時間の観察にわたって (図 13)。放出速度は、pH 5.35 のときより pH 7.0 のときの方がより線形に近かった。

20

30

【0076】

実施例 13

n-プロパノールによる HSA の沈殿の閾値に及ぼす、調合物の pH 及び塩濃度の作用を図 14 に示す。11% (w/w) HSA (USB) 溶液を 6 時間ずつ 3 回、それぞれ 2L の脱イオン水でピアース・スライド・アライザ (15ml 容量、No.66410、ロット番号 BJ44820B) で透析した。最終濃度は、分光光度法により 280nm で 8.28% (w/w) と分析した。この溶液を 4% (w/w) に脱イオン水で希釈した。4% HSA のうちの量 (0.9g) を 2ml 入りガラス製バイアル中に量り入れた。酢酸ナトリウム (1M)、酢酸 (1M)、水酸化ナトリウム (1M)、及び水を多様な組合せで総重量 0.1g になるように加えて、図面に示すような、1g 調合物で測定される最終ナトリウム濃度及び pH 値とした。次に、n-プロパノールを約 50µl ずつ攪拌しながら加え、最初の沈殿物が安定 (攪拌しても 5 分間以内に再溶解しない) になった時点を記録した。データの点を結んで、ナトリウム濃度が等しい場合を、多様な pH 及び n-プロパノール (w/w) 濃度で示す。HSA の沈殿の閾値は、酢酸ナトリウム濃度により大幅に変更することができる。酢酸ナトリウム濃度が低いときは、最も少ないレベルの n-プロパノールしか、HSA の沈殿を開始させるのに必要としない。これらのデータ (図 14) により、本調合物を調節するための概略的なアプローチが得られる。

40

50

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1-5】BSA製剤の様々な放出曲線を示すグラフである。

【図6A-D】HSA及びIFN-012の放出に及ぼす、調合物の塩濃度の作用を示す。溶液Iは、9.0mgのHSA（イムノ-U.S.社製）及び10 μ gのIFN-012を溶かした40%(w/w)n-プロパノール（0.364g n-プロパノール）水溶液を総重量0.91gとしたものから成った。様々な溶液II組成物は、様々な量の酢酸ナトリウム（1M、pH6.3）及び脱イオン水及び0.040gをn-プロパノールに溶かして、40% n-プロパノールとし、250、450、及び600mMの最終酢酸ナトリウム濃度とし、総量を0.10gとしたものから成った。溶液II（0.10g）を攪拌しながら溶液I（0.91g）に加え、最終的に1.01gの各調合物とした。40% n-プロパノール及び25、45、及び60mM濃度の酢酸ナトリウムを含有する該最終1.01gの調合物を2ml入りのガラス製バイアル中で6時間、24で攪拌した後、25Gの注射針を通過させた直後に、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中のHSA及びIFN-012の量を材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB、それぞれ沈殿したHSAの絶対放出量（mg）及びパーセント放出量。C及びD、それぞれ沈殿したIFN-012の絶対放出量（ng）及びパーセント放出量。

10

【図7A-B】HSAの放出に及ぼす、調合物中の陽イオン種の作用を示す。溶液Iは、8.1mgのHSA（イムノ-U.S.社製）を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量0.91mlにしたものから成った。様々な溶液II組成物は、多様な塩保存溶液（それぞれ1M陽イオン濃度、pH6.3）を脱イオン水に、加えず、又は0.025ml加えた後に、n-プロパノールを加えて、40%(w/w)n-プロパノールの溶液とし、最終陽イオン濃度は250mM、総量は0.10mlとしたものから成った。溶液II（0.10ml）を0.91mlの溶液Iに攪拌しながら加えて、40%(w/w)n-プロパノールを有する最終1.01ml調合物を生成させた。40%のn-プロパノールと、なし又は25mM濃度の酢酸カリウム、酢酸ナトリウム又は酢酸マグネシウムを含有するこの最終1.01ml調合物を、2ml入りのガラス製バイアル中で6時間、24で攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中のHSAの量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB、それぞれ沈殿したHSAの絶対放出量（mg）及びパーセント放出量。塩は酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、及び酢酸マグネシウムであった（それぞれNaOAc、KOAc、及びMg(OAc)₂で示す）。

20

30

【図8A-B】IFN-012の放出に及ぼす、調合物中の陽イオン種の作用を示す。溶液Iは、45mgのHSA（イムノ-U.S.社製）及び5.44 μ gのIFN-012を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量4.55mlとしたものから成った。多様な溶液II組成物は、36 μ lの0.1M酢酸（HSA溶液の緩衝能を補正するため）及び0.250gの酢酸カリウム、酢酸ナトリウム又は酢酸マグネシウム溶液（それぞれpH6.3）を、0.314gの脱イオン水及び0.400gのn-プロパノールに加えて40%(w/w)n-プロパノール及び250mM最終酢酸濃度の溶液を、総重量1gになるように作製したものから成った。該酢酸カリウム溶液は、0.980gの酢酸カリウム、10.061gの水及び0.274mlの1M酢酸で作製した。該酢酸ナトリウム溶液は、0.823gの酢酸ナトリウム、10.056gの水及び0.245mlの1M酢酸で作製した。該酢酸マグネシウム溶液は、2.144gの酢酸マグネシウム、10gの水及び0.200mlの1M酢酸で作製した。溶液II（0.50ml）を4.55mlの溶液Iに攪拌しながら加えて、40%(w/w)n-プロパノールを有する最終5.05ml調合物を生成させた。この最終調合物を50ml入り円錐形試験管内で6時間、24で攪拌し、沈殿物を5mlのPBS/0.01%チメロサルで洗浄した後、5mlのPBS/0.01%チメロサル中に懸濁させてから、二つの別々の2.5ml試料に分割した後、沈殿物から上清を分離した。放出データは、一方の2.5ml部分の調合物から採った沈殿物のものである。洗浄後の沈殿物中のIFN-012の量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB、それぞれ沈殿したIFN-012の絶対放出量（ng）及びパーセント放出量。塩は酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、及び酢酸マグネシウムであった（それぞれ21mM NaOAc、20mM KOAc、及び18mM Mg(OAc)₂で示す）。

40

【図9A-B】IFN-012の放出に及ぼす、調合物の水溶液pHの作用を示す。酢酸（0.1

50

M)を用いて5% HSA保存溶液(アルファ・セラピューティック社製)をpH 5.0又はpH 7.0に調節した。溶液Iは、pH 5.0又はpH 7.0のHSA保存溶液のいずれかのうちの10mgのHSAと、6.83 μ gのIFN-012と付加的な水とを、総重量0.6gになるようにしたものから成った。最終調合物は、0.4gのn-プロパノールを溶液Iに攪拌しながら加えて濃度40%(w/w)n-プロパノールにして調製した。最終調合物1gを2ml入りガラス製バイアル内で24時間、24で攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中のIFN-012の量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB. それぞれ沈殿したIFN-012の絶対放出量(ng)及びパーセント放出量。

【図10A-B】HSA及びIFN-012の放出に及ぼす、調合物の水溶液pHの作用を示す。溶液Iは、45mgのHSA(イムノ-U.S.社製)及び5.44 μ gのIFN-012を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量4.55mlとしたものから成った。溶液II組成物は以下の通りに調製した。溶液IIa:1.55mlの1M酢酸を0.82gの無水酢酸ナトリウム及び10gの脱イオン水に加えて、この溶液AのpHを5.52に調節し;その後、0.036mlの0.1M酢酸を0.250gの溶液Aに加えて、HSA溶液の緩衝能を補正した;次に脱イオン水を加えて総重量を0.600gとした;次に0.400gのn-プロパノールを加えて40%(w/w)n-プロパノールの最終溶液を総重量1.00g、作製した。溶液IIb:0.40mlの1M酢酸を0.82gの無水酢酸ナトリウム及び10gの脱イオン水に加えて、この溶液BのpHを6.13に調節した;次に、0.036mlの0.1M酢酸を0.250gの溶液Bに加えて、HSA溶液の緩衝能を補正した;次に脱イオン水を加えて総重量を0.600gとした;次に0.400gのn-プロパノールを加えて40%(w/w)n-プロパノールの最終溶液を総重量1.00g、作製した。溶液IIc:0.245mlの1M酢酸を0.823gの無水酢酸ナトリウム及び10.056gの脱イオン水に加えて、この溶液CのpHを6.31に調節した;次に0.036mlの0.1M酢酸を0.250gの溶液Cに加えてHSA溶液の緩衝能を補正した;次に脱イオン水を加えて総重量を0.600gにした。次に0.400gのn-プロパノールを加えて40%(w/w)n-プロパノールの最終溶液を総重量1.00g、作製した。この最終調合物を調製するためには、0.50mlの溶液IIa、IIb、又はIIcを4.55mlの溶液Iに攪拌しながら加えて、40%(w/w)n-プロパノールを有し、それぞれpH 5.52、pH 6.13又はpH 6.31の三種類の調合物を5.05ml、作製した。最終調合物を50ml入りの円錐形試験管内で6時間、24で攪拌した後、二つの別々の2.52ml試料に分割してから、上清を沈殿物から分離した。放出データはその調合物の一つの2.52ml部分のものである。洗浄後の沈殿物中のIFN-012の量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出は、PBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB. それぞれ沈殿したHSAの絶対放出量(mg)及びパーセント放出量。C及びD. それぞれ沈殿したIFN-012の絶対放出量及びパーセント放出量。

【図11A-B】HSA及びIFN-001の、25mM酢酸ナトリウムの存在下で形成された沈殿物からの放出に及ぼす、調合物の酸濃度の作用を示す。溶液Iは、8.1mgのHSA(イムノ-U.S.社製)及び0.92 μ gのIFN-001を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量0.9mlにしたものから成った。それぞれ0.004、0.010、0.015及び0.025mlの0.1M酢酸の40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液から成る、いくつかの溶液II調合物、IIa、IIb、IIc及びIIdを調製した。溶液IIIは1Mの酢酸ナトリウム及び40%(w/w)n-プロパノールを溶かした脱イオン水を総量0.025mlにしたものから成った。それぞれ0.071、0.065、0.060及び0.050mlの40%(w/w)n-プロパノールの脱イオン水溶液から成るいくつかの溶液IV調合物、IVa、IVb、IVc及びIVdを調製した。これら最終調合物を調製する際に、溶液IIa、IIb、IIc及びIIdをそれぞれ溶液IVa、IVb、IVc及びIVdに合わせた。溶液II、III及びIVを一緒にして混合してから、溶液Iを素早くこれらの混合液に加えて、最終的な1mlの調合物を生成させた。このようにして、最終濃度25mMの酢酸ナトリウム、40%(w/w)n-プロパノール及び図示した最終濃度の酢酸を有する調合物を作製した。調合物を2ml入りのガラス製バイアル内で6時間、24で攪拌してから、沈殿物から上清を分離した。洗浄後、沈殿物を4時間、400mトル未満で凍結乾燥させた。洗浄後の沈殿物中のHSAの量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB. それぞれ沈

殿したHSAの絶対放出量 (mg) 及びパーセント放出量。C及びD. それぞれ沈殿したIFN-012の絶対放出量 (ng) 及びパーセント放出量。

【図12A-D】1.5mM酢酸の存在下で形成された沈殿物からのHSA及びIFN-001の放出に対し、調合物の塩濃度が及ぼす作用を示す。溶液Iは、8.1mgのHSA(イムノ-U.S.社製)及び0.92 μ gのIFN-001を溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液を総量0.9mlにしたものから成った。溶液IIは、0.1M酢酸及び40%(w/w)n-プロパノールの脱イオン水溶液を総量0.015mlにしたものから成った。それぞれ0、0.015、0.025及び0.035mlの1m酢酸ナトリウムを溶かした40%(w/w)n-プロパノール脱イオン水溶液から成るいくつかの溶液III調合物、IIIa、IIIb、IIIc及びIIdを調製した。それぞれ0.085、0.070、0.060及び0.050mlの40%(w/w)n-プロパノールの脱イオン水溶液から成るいくつかの溶液IV調合物、IVa、IVb、IVc及びIVdを調製した。これら最終調合物を調製する際、溶液IIIa、IIIb、IIIc及びIIdをそれぞれ溶液IVa、IVb、IVc及びIVdと合わせた。溶液II、III及びIVを混合して一緒にした後、溶液Iを素早くこの混合液に加えて、最終的な1mlの調合物を作製した。こうして最終酢酸濃度1.5mM、40%(w/w)n-プロパノール(w/w)となり、その最終的なナトリウム濃度を図面に示す。調合物を2ml入りのガラス製バイアル内で6時間、24で攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後、沈殿物を4時間、400mトル未満で凍結乾燥させた。洗浄後の沈殿物中のHSA及びIFN-001の量を材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB. それぞれ沈殿したHSAの絶対放出量 (mg) 及びパーセント放出量。C及びD. それぞれ沈殿したIFN-001の絶対放出量 (ng) 及びパーセント放出量。

10

20

【図13A-B】三級ブタノール沈殿物の場合のHSAの放出に及ぼす、調合物の塩濃度及びpHの作用を示す。酢酸(0.1M)を用いて5%HSA保存溶液(アルファ・セラピューティック社製)をpH5.35又は7.0に調節した。溶液Iは、pH5.35又はpH7.0の5%保存溶液から採った18.0mgのHSA、1.0 μ gのIFN-012及び脱イオン水から成り、この溶液の総重量は0.375gであった。それぞれ0.02M及び0.1MのNaCl濃度を有する溶液IIa及びIIbを調製するために、十分な脱イオン水を3.75M NaCl溶液の0.021及び0.0043mlに加えて、各溶液の総重量を0.425gにした。溶液I(0.375g)のpH5.35及びpH7.0変形版の両者を溶液IIa及びIIbに加えて、図面に示すように様々な組合せのpH及びNaCl濃度を持つ0.80gを作製してから、0.31又は0.47gのt-ブチルアルコールを加えて、28.1%及び36.9%

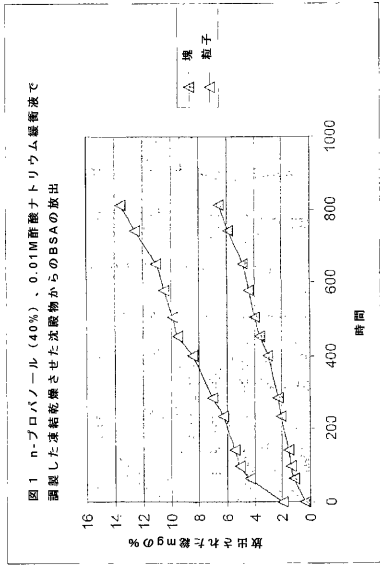
30

(w/w)t-ブチルアルコールとした(表の解説の要約を参照されたい)。最終的な1.11乃至1.27gの調合物を2ml入りのガラス製バイアル中で24時間、24で攪拌してから、上清を沈殿物から分離した。洗浄後の沈殿物中のHSAの量を、材料及び方法の項で解説したように調べた。放出はPBS/0.01%チメロサル中で行わせた。A及びB. それぞれ沈殿したHSAの絶対放出量 (mg) 及びパーセント放出量。

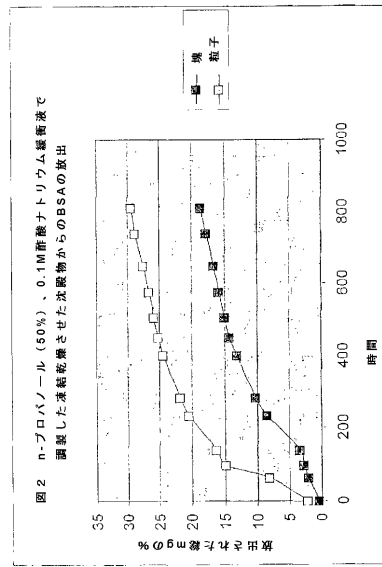
【図14】n-プロパノールによるHSAの沈殿の閾値に及ぼす、調合物のpH及び塩濃度の作用を示す。11%(w/w)HSA(USB社製)溶液を6時間ずつ3回、それぞれ2Lの脱イオン水でピアース・スライド・アライザ(15ml容量、No.66410、ロット番号BJ44820B)で透析した。最終濃度は、分光光度法により280nmで8.28%(w/w)と分析した。この溶液を4%(w/w)に脱イオン水で希釈した。4%HSAのうち(0.9g)を2ml入りガラス製バイアル中に量り入れた。酢酸ナトリウム(1M)、酢酸(1M)、水酸化ナトリウム(1M)、及び水を多様な組合せで総重量0.1gになるように加えて、図面に示すような、1g調合物で測定される最終ナトリウム濃度及びpH値とした。次に、n-プロパノールを約50 μ lずつ攪拌しながら加え、最初の沈殿物が安定(攪拌しても5分間以内に再溶解しない)になった時点を記録した。データの点を結んで、ナトリウム濃度が等しい場合を、多様なpH及びn-プロパノール(w/w)濃度で示す。

40

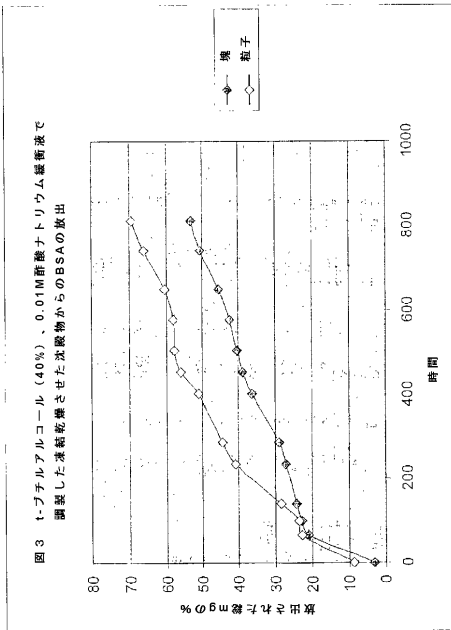
【 図 1 】



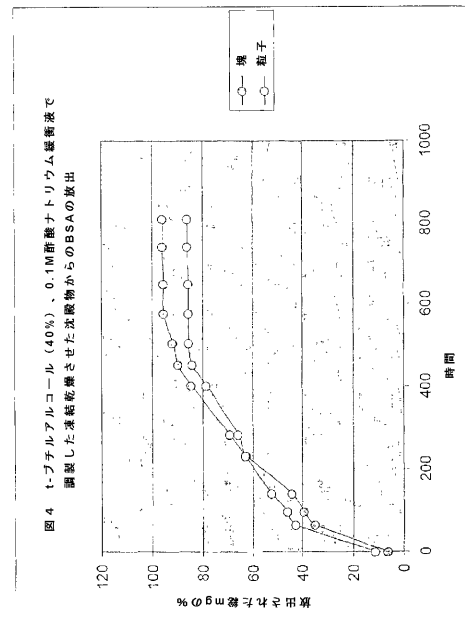
【 図 2 】



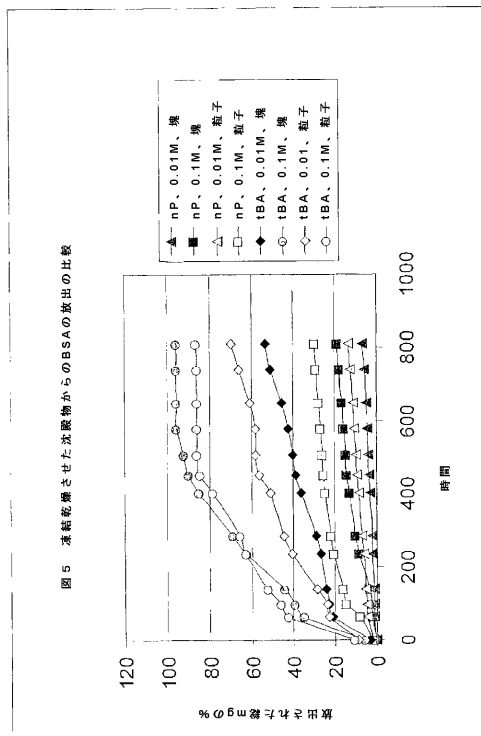
【 図 3 】



【 図 4 】

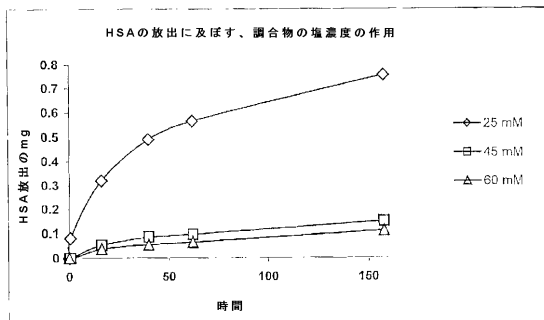


【 図 5 】



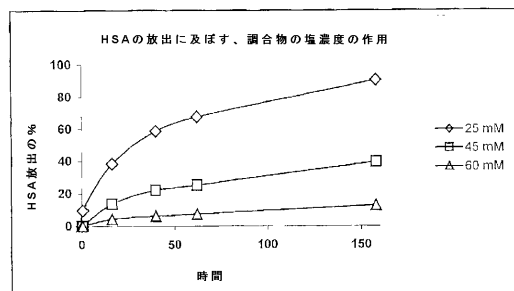
【 図 6 A 】

図 6 A



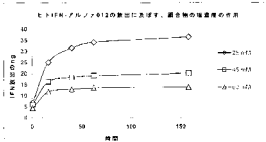
【 図 6 B 】

図 6 B



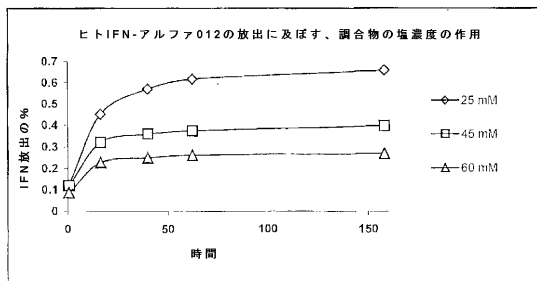
【 図 6 C 】

図 6 C



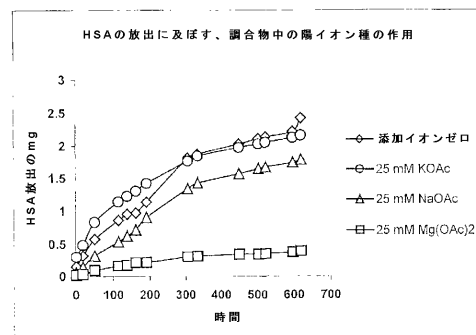
【 図 6 D 】

図 6 D



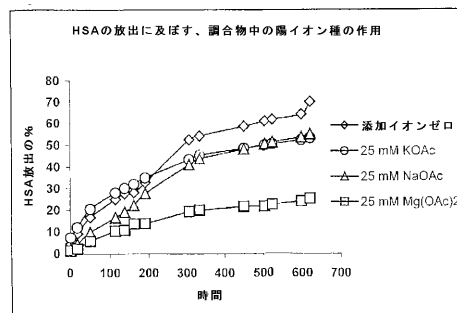
【 図 7 A 】

図 7 A



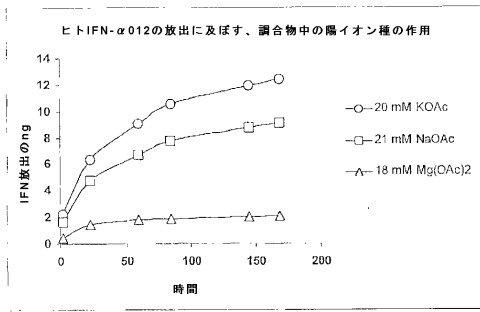
【 図 7 B 】

図 7 B



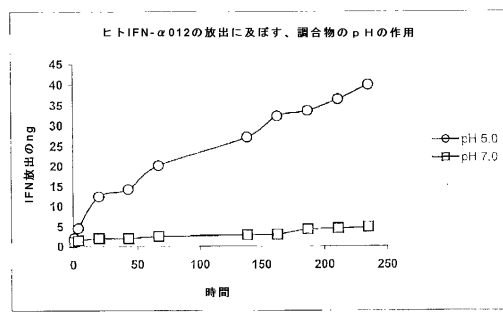
【 図 8 A 】

図 8 A



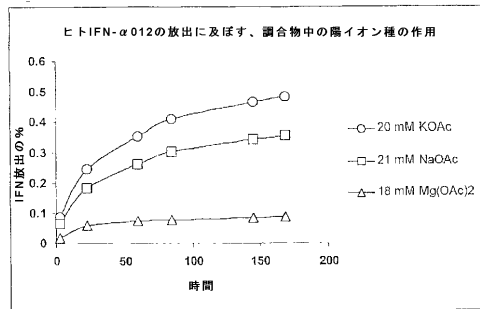
【 図 9 A 】

図 9 A



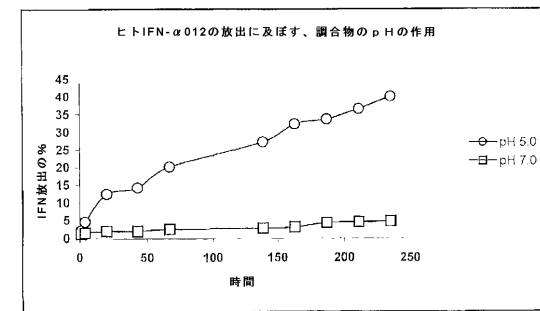
【 図 8 B 】

図 8 B



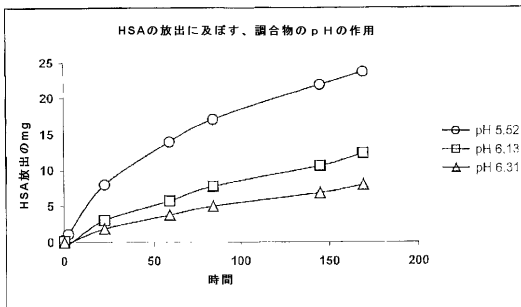
【 図 9 B 】

図 9 B



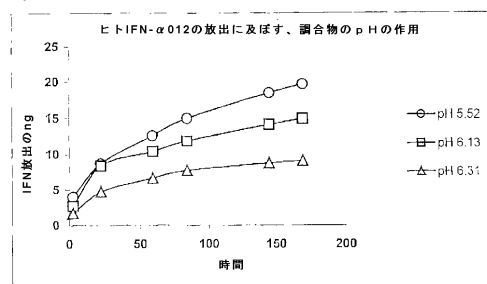
【 図 10 A 】

図 10 A



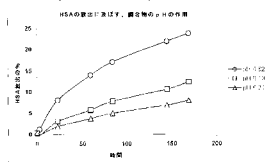
【 図 10 C 】

図 10 C



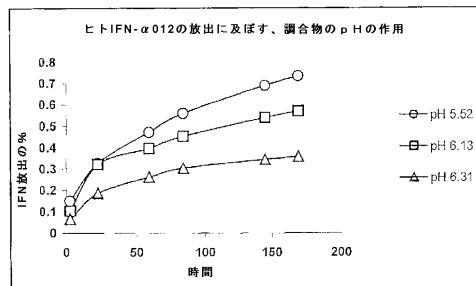
【 図 10 B 】

図 10 B



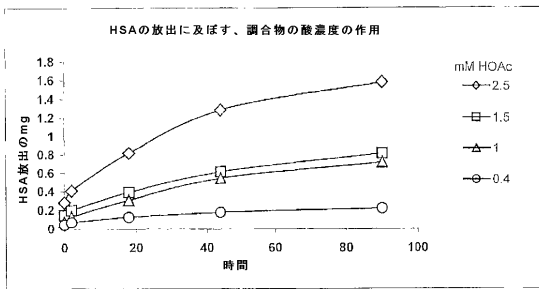
【 図 10 D 】

図 10 D



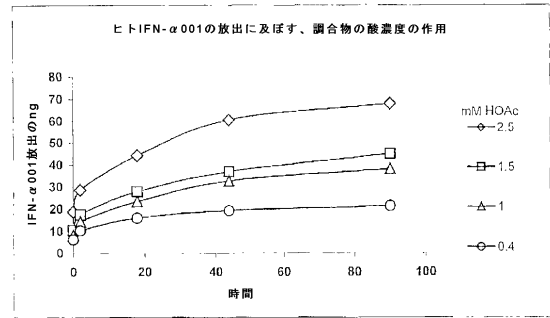
【 図 1 1 A 】

図 1 1 A



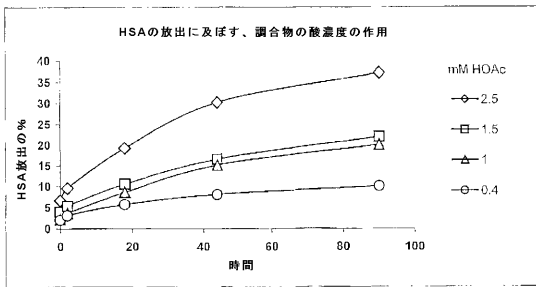
【 図 1 1 C 】

図 1 1 C



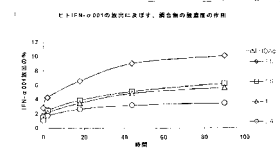
【 図 1 1 B 】

図 1 1 B



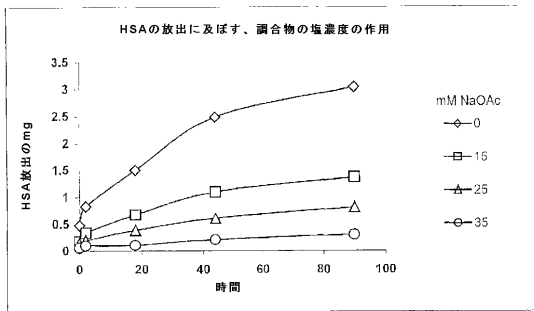
【 図 1 1 D 】

図 1 1 D



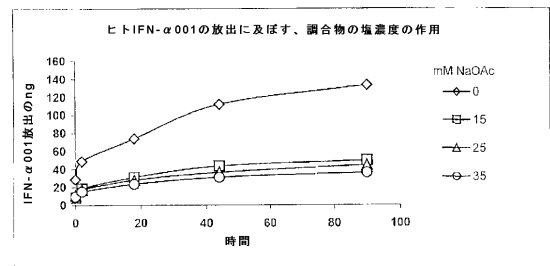
【 図 1 2 A 】

図 1 2 A



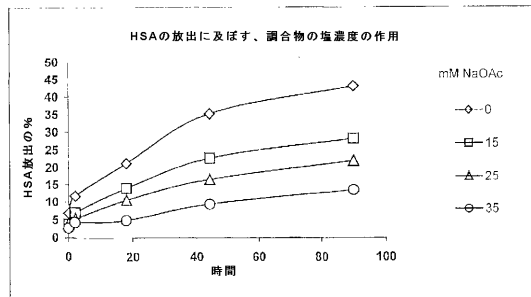
【 図 1 2 C 】

図 1 2 C



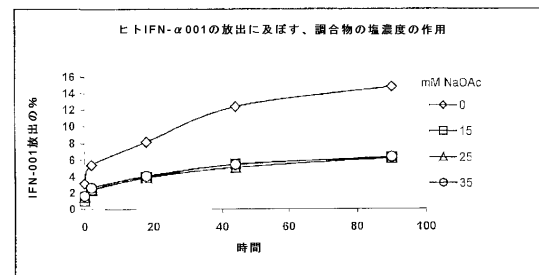
【 図 1 2 B 】

図 1 2 B



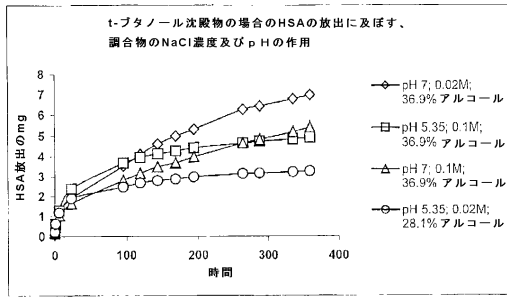
【 図 1 2 D 】

図 1 2 D



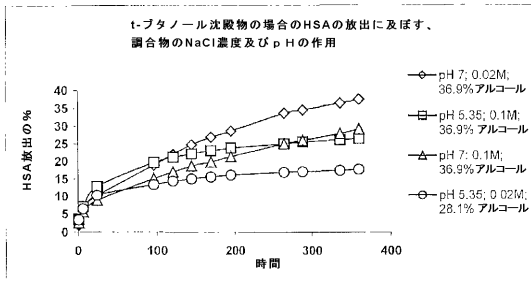
【 図 1 3 A 】

図 1 3 A



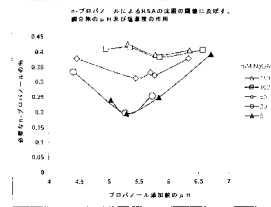
【 図 1 3 B 】

図 1 3 B



【 図 1 4 】

図 1 4



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

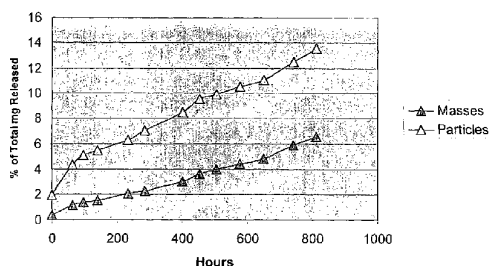
(10) International Publication Number
WO 02/053174 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K 38/00**
- (21) International Application Number: PCT/US01/50355
- (22) International Filing Date: 31 December 2001 (31.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/258,916 29 December 2000 (29.12.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PBL BIOMEDICAL LABORATORIES** [US/US]; 100 Jersey Avenue, Building D, New Brunswick, NJ 08901 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): **PESTKA, Sidney** [US/US]; 82 Brookside Terrace, West Caldwell, NJ 07006 (US).
- (74) Agents: **VINCENT, Matthew, P.** et al.; Repes & Gray, Patent Group, One International Place, Boston, MA 02110 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report.

[Continued on next page]

(54) Title: CONTROLLED RELEASE SYSTEMS FOR POLYMERS

Release of BSA from Lyophilized Precipitates
Prepared in n-Propanol (40%), 0.01M Sodium Acetate Buffer



(57) Abstract: The present invention relates to controlled release delivery of biologically active molecules from a solid composition prepared by exposure of the molecules to an organic compound. For instance, the organic compound is an organic solvent, such as an alcohol (e.g., preferably a lower alcohol, such as methanol, ethanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, isobutanol, t-butanol, etc.), a mixture of alcohols, an aldehyde, a ketone, a hydrocarbon (saturated or unsaturated), or an aromatic hydrocarbon. The solvent can be a mixture of different organic solvents, or the resulting formulation can be a mixture of, e.g., different lyophilized preparations, such as may be used to control the release profile of the resulting admixture.

WO 02/053174 A2

WO 02/053174 A2



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Controlled Release Systems for Polymers

Background of the Invention

With the advent of genetic engineering, the large-scale availability of many bioactive polymers, such as proteins, carbohydrates and nucleic acids, has been achieved. However, the administration of these recombinantly produced peptides and proteins presents a unique set of problems. In many cases the maintenance of the biological effect of these proteins requires long-term administration. Daily administration of these agents in aqueous vehicles is inconvenient and costly; sustained or prolonged release is preferred. In addition, proteins are highly unstable in an aqueous environment most suitable for administration.

Moreover, successful treatment of a variety of conditions is limited by the fact that agents known to effectively treat these conditions may have severe side effects, requiring low dosages to minimize these side effects. In other instances, the therapeutic agents may be very labile, or have very short half-lives requiring repeated administration. In still other instances, the long term administration of a pharmaceutical agent may be desired.

In all these cases, the ability to deliver a controlled dosage in a sustained fashion over a period of time may provide a solution.

Summary of the Invention

One aspect of the present invention relates to controlled release delivery of biologically active molecules from a solid composition prepared by exposure of the molecules to an organic compound. For instance, the organic compound is an organic solvent, such as an alcohol (e.g., preferably a lower alcohol, such as methanol, ethanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, isobutanol, t-butanol, etc.), a mixture of alcohols, an aldehyde, a ketone, a hydrocarbon (saturated or unsaturated), or an aromatic hydrocarbon. The solvent can be a mixture of different organic solvents, or the resulting formulation can be a mixture of, e.g., different lyophilized preparations, such as may be used to control the release profile of the resulting admixture.

The subject molecule to be formulated for controlled release can be an organic compound. In certain embodiments, it is a polymer, preferably a

WO 02/053174

PCT/US01/50355

biopolymer such as a protein, a peptide, a nucleic acid, an oligonucleotide, a carbohydrate, a ganglioside, or a glycan. The subject molecule can be a lipid, a sterol or other lipophilic moiety. The subject controlled delivery system can be used to deliver the controlled release of small molecules (e.g., organic compounds).

5 In certain embodiments, the subject preparations are prepared by precipitation and/or lyophilization.

Brief Description of Drawings

Figures 1-5. Graphs showing various release profiles for BSA preparations.

Figures 6A-D. Effect salt concentration of formulation on release of HSA
10 and IFN- α 012. Solution I consisted of 9.0 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 10 μ g of IFN- α 012 in 40% (w/w) n-propanol (0.364 g n-propanol) in H₂O for a total weight of 0.91 g. The various Solution II compositions consisted of various quantities of sodium acetate (1 M, pH 6.3) and deionized water and 0.040 g n-propanol to make
15 solutions of 40% n-propanol and 250, 450, and 600 mM final sodium acetate concentrations with a total volume of 0.10 g. Solution II (0.10 g) was added to Solution I (0.91 g) with stirring to yield a final 1.01 g of each formulation. The final 1.01 g formulations containing 40% n-propanol and 25, 45, and 60 mM
20 concentrations of sodium acetate were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at 24°C and passed through 25G syringe needles just prior to separating supernatants from precipitates. The quantity of HSA and IFN- α 012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. **A & B.** Absolute (mg) and percent release of precipitated HSA, respectively. **C & D.** Absolute (ng) and percent release of precipitated IFN- α 012, respectively.

Figures 7A-B. Effect of cation species in formulation on release of HSA.
25 Solution I consisted of 8.1 mg of HSA (Immuno-U.S.) in 40% (w/w) n-propanol in deionized water in a total volume of 0.91 ml. The various Solution II compositions consisted of adding none or 0.025 ml of various salt stocks (each at 1 M cation concentration, pH 6.3) to deionized water followed by n-propanol to make solutions
30 40% (w/w) n-propanol and 250 mM final cation concentration in a total volume of 0.10 ml. Solution II (0.10 ml) was added to 0.91 ml of Solution I with stirring to

WO 02/053174

PCT/US01/50355

give a final 1.01 ml formulation having 40% (w/w) n-propanol. The final 1.01 ml formulations containing 40% n-propanol and no or 25 mM concentrations of potassium, sodium or magnesium acetate were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. The quantity of HSA in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. **A & B.** Absolute (mg) and percent release of precipitated HSA, respectively. Salts were sodium, potassium, and magnesium acetate (indicated by NaOAc, KOAc, and Mg(OAc)₂, respectively).

Figure 8A-B. Effect of cation species in formulation on release of IFN- α 012. Solution I consisted of 45 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 5.44 μ g IFN- α 012 in 40% (w/w) n-propanol in deionized water in a total volume of 4.55 ml. The various Solution II compositions consisted of adding 36 μ l of 0.1 M acetic acid (to compensate for the buffer capacity of the HSA solution) and 0.250 g of potassium, sodium or magnesium acetate solution (each at pH 6.3) to 0.314 g of deionized water and 0.400 g of n-propanol to make solutions of 40% (w/w) n-propanol and 250 mM final acetate concentration in a total weight of 1 g. The potassium acetate solution was made with 0.980 g potassium acetate, 10.061 g water and 0.274 ml 1 M acetic acid. The sodium acetate solution was made with 0.823 g sodium acetate, 10.056 g water and 0.245 ml 1 M acetic acid. The magnesium acetate solution was made with 2.144 g magnesium acetate, 10 g water and 0.200 ml 1 M acetic acid. Solution II (0.50 ml) was added to 4.55 ml of Solution I with stirring to give a final 5.05 ml formulation having 40% (w/w) n-propanol. The final formulations were stirred in 50 ml conical tubes for 6 hr at 24°C, the precipitates washed with 5 ml of PBS/0.01% thimerosal, then suspended in 5 ml PBS/0.01% thimerosal, then split into two individual 2.5 ml samples prior to separating supernatants from precipitates. Release data is from the precipitates from one 2.5 ml portion of the formulation. The amount of IFN- α 012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. **A & B.** Absolute (ng) and percent release of precipitated IFN- α 012, respectively. Salts were sodium, potassium, and magnesium acetate (indicated by 21 mM NaOAc, 20 mM KOAc, and 18 mM Mg(OAc)₂, respectively).

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figures 9A-B. Effect of aqueous solution pH of formulation on release of IFN- α 012. Acetic acid (0.1 M) was used to adjust 5% HSA (Alpha Therapeutic) stock solutions to pH 5.0 or pH 7.0. Solution I consisted of 10 mg of HSA from either pH 5.0 or pH 7.0 HSA stock solutions, 6.83 μ g IFN- α 012 and additional water to a total weight of 0.6 g. The final formulations were prepared by adding 0.4 g of n-propanol to Solution I with stirring to yield a concentration of 40% (w/w) n-propanol. Final 1 g formulations were stirred in 2 ml glass vials for 24 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. The quantity of IFN- α 012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. **A & B.** Absolute (ng) and percent release of precipitated IFN- α 012, respectively.

Figure 10A-B. Effect of aqueous solution pH of formulation on release of HSA and IFN- α 012. Solution I consisted of 45 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 5.44 μ g IFN- α 012 in 40% (w/w) n-propanol in deionized water in a total volume of 4.55 ml. Solution II compositions were prepared as follows. Solution IIa: 1.55 ml of 1 M acetic acid was added to 0.82 g anhydrous sodium acetate and 10 g deionized water to adjust pH of this Solution A to 5.52; then 0.036 ml of 0.1 M acetic acid was added to 0.250 g of Solution A to compensate for the buffer capacity of the HSA solution; deionized water was then added to bring the total weight to 0.600 g; then 0.400 g of n-propanol was added to make a final solution of 40% (w/w) n-propanol in a total weight of 1.00 g. Solution IIb: 0.40 ml of 1 M acetic acid was added to 0.82 g anhydrous sodium acetate and 10 g of deionized water to adjust pH of this Solution B to 6.13; then 0.036 ml of 0.1 M acetic acid was added to 0.250 g of Solution B to compensate for the buffer capacity of the HSA solution; deionized water was then added to bring the total weight to 0.600 g; then 0.400 g of n-propanol was added to make a final solution of 40% (w/w) n-propanol in a total weight of 1.00 g. Solution IIc: 0.245 ml of 1 M acetic acid was added to 0.823 g anhydrous sodium acetate and 10.056 g deionized water to adjust pH of this Solution C to 6.31; then 0.036 ml of 0.1 M acetic acid was added to 0.250 g of Solution C to compensate for the buffer capacity of the HSA solution; deionized water was then added to bring the total weight to 0.600 g; then 0.400 g of n-propanol was added to make a final solution of

WO 02/053174

PCT/US01/50355

40% (w/w) n-propanol in a total weight of 1.00 g. To prepare the final formulations, 0.50 ml from Solutions IIa, IIb, or IIc was added to 4.55 ml of Solution I with stirring to yield three 5.05 ml formulations having 40% (w/w) n-propanol and pH 5.52, pH 6.13 or pH 6.31, respectively. Final formulations were stirred in 50 ml conical tubes for 6 hr at 24°C, then split into two individual 2.52 ml samples prior to separating supernatants from precipitates. Release data is from one 2.52 ml portion of the formulation. The amount of IFN- α 012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. **A & B.** Absolute (mg) and percent release of precipitated HSA, respectively. **C & D.** Absolute and percent release of precipitated IFN- α 012, respectively.

Figure 11A-B. Effect of acid concentration of formulation on release of HSA and IFN- α 001 from precipitates formed in the presence of 25 mM sodium acetate. Solution I consisted of 8.1 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 0.92 μ g IFN- α 001 in 40% (w/w) n-propanol in deionized water in a total volume of 0.9 ml. Several Solution II formulations, IIa, IIb, IIc and IId, were prepared consisting of 0.004, 0.010, 0.015 and 0.025 ml of 0.1 M acetic acid, respectively, in 40% (w/w) n-propanol in deionized water. Solution III consisted of 1 M sodium acetate and 40% (w/w) n-propanol in deionized water in a total volume of 0.025 ml. Several Solution IV formulations, IVa, IVb, IVc and IVd, were prepared consisting of 0.071, 0.065, 0.060 and 0.050 ml of 40% (w/w) n-propanol, respectively, in deionized water. In preparing the final formulations, Solutions IIa, IIb, IIc and IId were matched with Solutions IVa, IVb, IVc and IVd, respectively. Solutions II, III and IV were mixed together then Solution I added rapidly to the mixture to give a final 1 ml formulation. This yielded a formulation having a final concentration of 25 mM sodium acetate, 40% (w/w) n-propanol and the final acetic acid concentrations indicated on the Figure. Formulations were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. After washing, precipitates were lyophilized 4 hr at <400 mTorr. The amount of HSA in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. **A & B.** Absolute (mg) and percent release of precipitated

WO 02/053174

PCT/US01/50355

HSA, respectively. C & D. Absolute (ng) and percent release of precipitated IFN- α 012, respectively.

Figure 12A-D. Effect of salt concentration of formulation on release of HSA and IFN- α 001 from precipitates formed in the presence of 1.5 mM acetic acid.

5 Solution I consisted of 8.1 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 0.92 μ g IFN- α 001 in 40% (w/w) n-propanol in deionized water in a total volume of 0.9 ml. Solution II consisted of 0.1 M acetic acid and 40% (w/w) n-propanol in deionized water in a total volume of 0.015 ml. Several Solution III formulations, IIIa, IIIb, IIIc and IIId, were prepared consisting of 0, 0.015, 0.025 and 0.035 ml of 1 M sodium acetate, respectively, in 40% (w/w) n-propanol in deionized water. Several Solution IV formulations, IVa, IVb, IVc and IVd, were prepared consisting of 0.085, 0.070, 0.060 and 0.050 ml of 40% (w/w) n-propanol, respectively, in deionized water. In preparing the final formulations, Solutions IIIa, IIIb, IIIc and IIId were matched with Solutions IVa, IVb, IVc and IVd, respectively. Solutions II, III and IV were mixed together then Solution I added rapidly to the mixture to give a final 1 ml formulation. This yielded a final concentration of 1.5 mM acetic acid, 40% (w/w) n-propanol (w/w) and the final sodium concentrations indicated on the Figure. Formulations were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. After washing, precipitates were lyophilized 4 hr at <400 mTorr. The amounts of HSA and IFN- α 001 in washed precipitates were determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. A & B. Absolute (mg) and percent release of precipitated HSA, respectively. C & D. Absolute (ng) and percent release of precipitated IFN- α 001, respectively.

25 **Figure 13A-B.** Effect of salt concentration and pH of formulation on release of HSA with tertiary butanol precipitates. Acetic acid (0.1 M) was used to adjust 5% HSA stock solutions (Alpha Therapeutic) to pH 5.35 or 7.0. Solution I consisted of 18.0 mg of HSA from the pH 5.35 or pH 7.0 5% stock solution, 1.0 μ g IFN- α 012 and deionized water bringing the total solution weight to 0.375 g. To prepare Solutions IIa and IIb with NaCl concentrations of 0.02 M and 0.1 M, respectively, sufficient deionized water was added to 0.021 and 0.0043 ml of a 3.75 M NaCl

30

WO 02/053174

PCT/US01/50355

solution to bring the total weight of each solution to 0.425 g. Both pH 5.35 and pH 7.0 variants of Solution I (0.375 g) were added to Solutions IIa and IIb to yield 0.80 g of the various combinations of pH and NaCl concentration as shown in the Figure prior to the addition of 0.31 or 0.47 g of tert-butyl alcohol to yield 28.1% and 36.9% (w/w) tert-butyl alcohol (see summary of the chart legends). Final 1.11-1.27 g formulations were stirred in 2 ml glass vials for 24 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. The amount of HSA in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. **A & B.** Absolute (mg) and percent release of precipitated HSA, respectively.

Figure 14. Effect of pH and salt concentration of formulation on threshold of precipitation of HSA by n-propanol. An 11% (w/w) HSA (USB) was dialyzed 3 times for 6 hr each time against 2 L deionized H₂O in a Pierce Slide_alyzer (15 ml capacity, No. 66410, lot # BJ44820B). The final concentration was analyzed by spectrophotometry at 280 nm to be 8.28% (w/w). This solution was diluted to 4% (w/w) with deionized water. Amounts (0.9 g) of 4% HSA were weighed into 2 ml glass vials. Sodium acetate (1 M), acetic acid (1 M), sodium hydroxide (1 M), and water were added in various combinations in a total weight of 0.1 g to yield the final sodium concentrations and pH values measured in 1 g formulations as shown in the Figure. Subsequently, n-propanol was added in about 50 µl increments with stirring, and the point at which initial precipitates were stable (did not re-dissolve with stirring within 5 minutes) was recorded. Connected data points indicate equivalent sodium concentrations at various pH and n-propanol (w/w) concentrations.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

Description of the Invention

I. Overview

The present invention relates to a controlled release delivery system and is based on the discovery that treatment of proteins and other molecules such as carbohydrates, nucleic acids, and other substances with organic compounds can modify their solubility in aqueous media. For example, in one embodiment the exposure of the proteins to the organic solvent (such as an alcohol) replaces the

WO 02/053174

PCT/US01/50355

water molecules and other associated moieties with organic residues. In certain embodiments, the subject preparations are solids, e.g., powders or crystals formed by lyophilization, precipitation or the like.

5 The resulting preparations can provide prolonged release formulations of the proteins, e.g., suitable for sustained biological effects when used as pharmaceuticals or in other aqueous uses. The examples given refer to protein, but the principle can apply to other water soluble biopolymers as well such as peptides, carbohydrates, nucleic acids, oligonucleotides, lipids, glycans, gangliosides and other biopolymers. Small organic molecules and some inorganic molecules that are solvated with
10 attached water residues can be treated in an analogous way to provide controlled delivery of the specific molecules.

Furthermore, solubility of proteins is also modulated by posttranslational modifications that can change the solubility of the proteins. The methods described can alter the solubility of the proteins with and without the post-translational
15 modifications.

In certain embodiment, the biomolecules are precipitated from the aqueous solution by addition of organic solvents and then lyophilized. In alternative procedures, the solution can be lyophilized directly from solution containing organic solvents to provide for the dried material to be formulated into a controlled release
20 system; the precipitated protein washed with aqueous solution and then formulated directly without lyophilization; or the dry protein treated with organic solvent, then formulated after removal of the solvent.

In certain preferred embodiments, the solvent is an inert solvent, and even more preferably an anhydrous organic solvent. The solvent should not irreversibly
25 denature the polymer, e.g., the timescale for renaturation, if any is required, should not be significantly longer than the rehydration process.

Formulation and size of the material can be controlled by the timing and method of precipitation and lyophilization conditions. Upon precipitation of the molecules, the precipitate is lyophilized to remove excess water and prevent water
30 from immediately replacing the organic solvents. Colloidal suspensions without direct precipitation can be used to substitute for precipitation. The colloidal

WO 02/053174

PCT/US01/50355

suspensions can be used to generate particles of small size. Furthermore, the mixtures can be lyophilized directly without precipitation or colloid formation to provide particles of different sizes dependent on the concentration of the molecules in the organic-aqueous media, the method of precipitation and the concentration of the protein solution. In some instances, inorganic molecules that can replace the water molecules on the molecules to be released slowly can be used in a total aqueous system to provide the same results. after lyophilization. The release is affected by the specific organic solvent used, the buffer used, and the particle size of the precipitated and/or lyophilized protein.

In addition, the method of invention permits greater tailoring of release profiles. The subject preparations can be made to exhibit short-term or long-term release kinetics, thereby providing either rapid or sustained release of macromolecules. In any event, the subject preparations have, relative to preparations of the polymer lyophilized from aqueous solutions, a reduced solubility in serum or other biological fluid, e.g., the solubility rate over a period of at least 24, 48, or even 168 hours (7 days) is at least 2 fold less than preparations of the polymer lyophilized from aqueous solution, and more preferably at least 10, 25, 50 or even 100 fold less.

In certain preferred embodiments, the subject compositions permit the release of biologically active compound at a rate which provides an average steady state dosage of at least the ED₅₀ for the active compound for a period of at least 2 days, and more preferably at least 7, 14, 21, 50, or even 100 days.

In certain preferred embodiments, the solvent(s) are chosen such that, when administered to a patient (particularly a human), the solvent released from the formulation is done so at a rate which remains below the IC₅₀ for deleterious side effects, if any, of the solvent, and more preferably at least 1, 2 or even 3 orders of magnitude below such IC₅₀ concentrations.

In certain embodiments, the organic agent is a polar protic solvent, such as for example, aliphatic alcohols, glycols, glycol ethers, and mixtures thereof. In certain preferred embodiments, the organic agent is a water-miscible polar protic solvent.

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Biodegradable or non-biodegradable materials known in the art in the form of gels, microspheres, wafers or implants can be mixed with the subject modified molecules.

5 These subject formulations can be used in parenteral, oral, intramuscular, subcutaneous, dermal, intravenous, intrarterial, intralesional, intrathecal or other sites of delivery for the treatment, prevention and diagnosis of many diseases.

Still another aspect of the invention relates to a method for doing business, e.g., for the preparation of pharmaceutical formulations for the treatment of humans or other animals. In an exemplary embodiment of such methods, there is provided a lyophilization facility for generating the lyophilized preparations described herein. The lyophilized preparations are packaged as e.g., pills, tablets, patches, injectables and the like, preferably at a government approved facility, e.g., an FDA-approved facility. In preferred embodiments, the lyophilized preparation is provided in single dosage form, even if packaged in larger lots.

15 II. Definitions

"Bioerodible" signifies that the material may be dissolved or digested into component molecules by the action of the environment or particularly by the action by living organisms, and optionally metabolized or digested into simpler constituents without poisoning or distressing the environment or the organism.

20 "Administered to a mammal" means that the composition containing an active ingredient is administered orally, parenterally, enterically, gastrically, topically, transdermally, subcutaneously, locally or systemically. The composition may optionally be administered together with a suitable pharmaceutical excipient, which may be a saline solution, ethyl cellulose, acetotephtalates, mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, glucose, sucrose, carbonate, and the like.

25 "Sustained delivery" or "sustained time release" denotes that the active ingredient is released from the delivery vehicle at an ascertainable and manipulatable rate over a period of minutes, hours, days, weeks or months, ranging from about 30 thirty minutes to about two months or longer.

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Abbreviations

	HSA	Human serum albumin
	HOAc	Acetic acid
	NaOAc	Sodium acetate
5	KOAc	Potassium acetate
	Mg(OAc) ₂	Magnesium acetate
	IFN- α 001	Interferon α -001
	IFN- α 012	Interferon α -012
	PBS	Phosphate-buffered saline

10 III. Exemplary Biopolymers

The biopolymers which may be used in the present invention include proteins, carbohydrates, nucleic acids and combinations thereof.

Advantageously, according to the present invention, the subject method can be used to formulate a protein which is pharmaceutically valuable or of value in the agri-foodstuffs industry. Proteins of interest include cytokines, growth factors, somatotropin, growth hormones, colony stimulating factors, erythropoietin, plasminogen activators, enzymes, T-cell receptors, surface membrane proteins, lipoproteins, clotting factors, anticoagulating factors, tumor necrosis factors, transport proteins, homing receptors, addressins, etc. Examples of mammalian polypeptides include molecules such as renin, a growth hormone, including human growth hormone; bovine growth hormone; growth hormone releasing factor; parathyroid hormone; thyroid stimulating hormone; lipoproteins; α -1-antitrypsin; insulin; proinsulin; follicle stimulating hormone; calcitonin; luteinizing hormone; glucagon; clotting factors such as factor VIIIc, factor IX, tissue factor, and von Willebrand's factor; anti-clotting factors such as Protein C; atrial natriuretic factor; lung surfactant; a plasminogen activator, such as urokinase or human urine or tissue-type plasminogen activator (t-PA); bombesin; thrombin; hemopoietic growth factor; tumor necrosis factor- α and - β ; enkephalinase; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); human macrophage inflammatory protein (MIP-1- α); a serum albumin such as human serum albumin; mullerian-inhibiting substance; relaxin A-chain; relaxin B-chain; prorelaxin; mouse gonadotropin-

WO 02/053174

PCT/US01/50355

associated peptide; a microbial protein, such as beta-lactamase; DNase; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor (VEGF); receptors for hormones or growth factors; integrin; protein A or D; rheumatoid factors; a neurotrophic factor such as bone-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3, -4, -5, or -6 (NT-3, NT-4, NT-5, or NT-6), or a nerve growth factor such as NGF- β ; platelet-derived growth factor (PDGF); fibroblast growth factor such as aFGF and bFGF; epidermal growth factor (EGF); transforming growth factors (TGF) such as TGF- α , TGF- β and BMPs; insulin-like growth factor-I and -II (IGF-I and IGF-II); des(1-3)-IGF-I (brain IGF-I), insulin-like growth factor binding proteins; CD proteins such as CD-3, CD-4, CD-8, and CD-19; erythropoietin; osteoinductive factors; immunotoxins; a bone morphogenetic protein (BMP); an interferon such as interferon- α , - β , and - γ ; colony stimulating factors (CSFs), e.g., M-CSF, GM-CSF, and G-CSF; interleukins (ILs), e.g., IL-1 to IL-10; superoxide dismutase; T-cell receptors; surface membrane proteins; decay accelerating factor; antigens (e.g., bacterial and viral antigens); transport proteins; homing receptors; addressins; regulatory proteins; immunoglobulin-like proteins; antibodies; nucleases; and fragments of any of the above-listed polypeptides.

Other examples of suitable therapeutic and/or prophylactic biologically active agents include nucleic acids, such as antisense molecules; and small molecules, such as antibiotics, steroids, decongestants, neuroactive agents, anesthetics, sedatives, cardiovascular agents, anti-tumor agents, antineoplastics, antihistamines, hormones (e.g., thyroxine) and vitamins.

IV. Exemplary Methods

The rate of controlled release of the protein can be modified by many variables. The variables include rate of addition of organic solvent, time of protein (or other molecule) in organic solvent (time of exposure of protein to organic solvent), concentration of organic solvents for precipitation of the protein, concentration of the organic solvents prior to precipitation, concentration of the organic solvents prior to lyophilization from solution directly, organic and non-organic composition of media, temperature, concentration of cations, concentration of anions, rate of precipitation, pH, mixtures of organic solvents, stirring, agitation,

WO 02/053174

PCT/US01/50355

presence of other proteins as carriers, presence of other proteins for controlled release of multiple proteins, protein stabilizers, dissolved gasses, reducing agents, oxidizing agents, mass to surface area of the particles, washing of samples prior to preparation for release, salt concentration, length of time exposed to modifier agents, concentration of the proteins or other polymer, inorganic compounds, type of organic compounds, for example. Inorganic cations can be monovalent, divalent, trivalent, tetravalent or pentavalent; inorganic anions can be monovalent, divalent, trivalent, tetravalent or pentavalent. In some embodiments, lyophilization can be omitted. For example, the precipitate can be washed with a nonpolar solvent such as *n*-hexane to remove the organic solvent without affecting the protein; or the precipitate can be washed with an aqueous medium to remove the organic solvent removing the excess organic solvent from the protein mass. Furthermore, the precipitate can be washed and/or preincubated to remove soluble protein and eliminate the higher initial release rate.

Organic compound does not need to be solvent, just constituent in the mixture.

In addition, the protein precipitates can be placed into a variety of biodegradable or non-biodegradable materials known in the art in the form of gels, microspheres, wafers or implants. In these cases, the release is controlled by both the intrinsic protein release rate and the rate of release controlled by the gels, microspheres, wafers or implants. These formulations can be used in parenteral, oral, intramuscular, subcutaneous, dermal, intravenous, intrarterial, intralesional, intrathecal or other sites of delivery for the treatment, prevention and diagnosis of many diseases.

During equilibration of the protein with the solvent, the organic solvent used is attached to the protein in the precipitates. The organic solvent can be replaced partially or completely with other organic compounds soluble in the solution. The organic compounds can be active pharmaceuticals such as antibiotics, antimicrobial agents, aminoglycosides, chloramphenicol, macrolides, antifungals, cephalosporins, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), adrenergic agonists, adrenergic antagonists, cholinergic agonists, cholinergic antagonists, muscarinic agonists, muscarinic

WO 02/053174

PCT/US01/50355

antagonists, antiviral agents, sympathomimetics, sympatholytics, serotonin agonists, serotonin antagonists, antihypertensive agents, monoamine oxidase inhibitors, diuretics, antiarrhythmic drugs, phosphodiesterase inhibitors, digitalis glycosides, calcium antagonists, vasodilators, prostaglandins, autacoids, lipid lowering drugs, 5 anticoagulants, fibrinolytics, platelet aggregation inhibitors, antidepressants, benzodiazepines, antiepileptics, antiparkinson agents, analgesics, opioids, opioid peptides, opiates, peptides, antiinflammatory drugs (NSAIDs, acetaminophen), barbiturates, peptide hormones, steroids, glucocorticoids, mineralocorticoids, estrogens, progestins, androgens, antiandrogens, thyroxine, triiodothyronine, 10 cyclooxygenase inhibitors, growth hormone releasing hormone (GHRH), antineoplastic drugs, and antihistamines. The attached organic compounds (as drugs) linked to bovine or human serum albumin or other proteins such as immunoglobulins can then be delivered as the protein is released and dissolved. The proteins with attached organic solvents are thus able to be used as effective delivery 15 systems. Furthermore, with the use of immunoglobulins and other proteins that can target to specific tissues or cells, the attached molecules can then be delivered to the tissues or cells.

Preparations made by the subject process can be either homogeneous or heterogeneous mixtures of active agents, or of preparations of active agents prepared 20 under different conditions (e.g., using different solvents, etc).

The amount of a biologically active agent, which is contained in a specific preparation, is a therapeutically, prophylactically or diagnostically effective amount, which can be determined by a person of ordinary skill in the art taking into consideration factors such as body weight, condition to be treated, type of polymer 25 used, and release rate from the preparation.

The biologically active agent can also be mixed with other excipients, such as stabilizers, surfactants, solubility agents and bulking agents. Stabilizers are added to maintain the potency of the agent over the duration of the agent's release. Suitable stabilizers include, for example, carbohydrates, amino acids, fatty acids and 30 surfactants and are known to those skilled in the art. Solubility agents are added to modify the solubility of the agent in aqueous solution or, as the case may be, in

WO 02/053174

PCT/US01/50355

organic solvents. Suitable solubility agents include complexing agents, such as albumin and protamine, which can be used to control the release rate of the agent. Bulking agents typically comprise inert materials.

5 In another embodiment, a biologically active agent can be lyophilized with a metal cation component, to further stabilize the agent and control the release rate of the biologically active agent.

The subject formulations, if used as therapeutics, may be administered to a human or animal by oral or parenteral administration, including intravenous, subcutaneous or intramuscular injection; administration by inhalation; intraarticular 10 administration; mucosal administration; ophthalmic administration; and topical administration. Intravenous administration includes catheterization or angioplasty.

In other embodiments, the subject preparations can be used in non-therapeutic aqueous environments, such as for the release of agents (such as enzymes) into a water supply or water treatment facility.

15 In addition to the active agent, the formulation can include other suitable polymers, e.g., to permit the resulting formulation to be used to form a microparticle. In a preferred embodiment, a polymer used in this method is biocompatible. A polymer is biocompatible if the polymer, and any degradation products of the polymer, such as metabolic products, are non-toxic to humans or animals, to whom 20 the polymer was administered, and also present no significant deleterious or untoward effects on the recipient's body, such as an immunological reaction at the injection site. Biocompatible polymers can be biodegradable polymers, non-biodegradable polymers, a blend thereof or copolymers thereof.

Suitable biocompatible, non-biodegradable polymers include, for instance, 25 polyacrylates, polymers of ethylene-vinyl acetates and other acyl substituted cellulose acetates, non-degradable polyurethanes, polystyrenes, polyvinyl chloride, polyvinyl fluoride, poly(vinyl imidazole), chlorosulphonate polyolefins, polyethylene oxide, blends and copolymers thereof.

Suitable biocompatible, biodegradable polymers include, for example, 30 poly(lactide)s, poly(glycolide)s, poly(lactide-co-glycolide)s, poly(lactic acid)s, poly(glycolic acid)s, polycarbonates, polyesteramides, polyanhydrides, poly(amino

WO 02/053174

PCT/US01/50355

acids), polyorthoesters, polyacetals, polycyanoacrylates, polyetheresters, polycaprolactone, poly(dioxanone)s, poly(alkylene alkylate)s, polyurethanes, blends and copolymers thereof. Polymers comprising poly(lactides), copolymers of lactides and glycolides, blends thereof, or mixtures thereof are more preferred. Said polymers
5 can be formed from monomers of a single isomeric type or a mixture of isomers.

A polymer used in this method can be blocked, unblocked or a blend of blocked and unblocked polymers. An unblocked polymer is as classically defined in the art, specifically having free carboxyl end groups. A blocked polymer is also as classically defined in the art, specifically having blocked carboxyl end groups.
10 Generally, the blocking group is derived from the initiator of the polymerization reaction and is typically an alkyl radical.

In certain embodiments, the subject formulations are prepared by lyophilization. The simplest form of lyophilizer would consist of a vacuum chamber into which wet sample material could be placed, together with a means of removing
15 water vapor so as to freeze the sample by evaporative cooling and freezing and then maintain the water-vapor pressure below the triple-point pressure.

Example 1

Release of bovine serum albumin (BSA) was measured up to 811 hours from samples of lyophilized protein precipitated from an alcohol/aqueous solution. This
20 example briefly describes sample preparation and analytical methodology and presents results showing controlled release of BSA. The release is affected by the specific alcohol used, the buffer used, and the particle size of the precipitated and lyophilized protein.

Solutions of BSA (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) at 5 %
25 (w/w) were prepared in 0.01 M acetate buffer using an equivalent volume of 0.005 M sodium acetate and 0.005 M acetic acid. The pH was approximately 5. The alcohol *n*-propanol was added to a concentration of 40% (v/v). After overnight equilibration at room temperature, the supernatant was removed and the precipitate frozen at -20 C and brought to -70 C before lyophilization. The surface upon which
30 the vials were placed and the lyophilizer chamber was precooled to maintain the samples frozen during the lyophilization procedure. The sample was lyophilized for

WO 02/053174

PCT/US01/50355

5 hours. The time of lyophilization can be longer or shorter depending on the volume to be lyophilized. The lyophilized sample was divided into several pieces with a spatula. The pieces were divided into small particles by crushing the pieces against the wall and bottom of the glass vial. The larger masses and small crushed particles were weighed so that 5 to 10 mg of the masses and the crushed particles were placed into separate 1.5 ml conical polypropylene tubes, then 1 ml of phosphate buffered saline was added. The masses or particles were dispersed into the liquid. One hour after dispersing the samples, the contents of the tubes were mixed again and then the tubes centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm (Eppendorf Centrifuge, Model No. 5415). A sample of 0.1 ml was removed for assay and replaced with 0.1 ml of PBS. This procedure was repeated to take samples at 65 hours. At 98 hours and each time point thereafter, the full volume of release medium was removed and replaced with a fresh 1 ml of PBS.

Samples were analyzed for protein content with the microassay procedure for microtiter plates (Bio-Rad protein assay, based on the method of Bradford; Coomassie Brilliant Blue Dye, Cat. No. 500-0006) with 96 well microtiter plates. Standards contained 5 to 60 $\mu\text{g/ml}$ of BSA. Standards and samples were added to the wells in a volume of 0.16 ml first, then 40 μl of dye was added to each well with mixing before reading the absorbance at 630 nm. Standard curves were constructed from absorbances corrected for the blank values in the absence of added protein (BSA). Protein concentrations of the samples were calculated from the standard curve that was based on the same lot of BSA and prepared on the basis of weight of BSA to total volume (w/v). The values for the protein released at various times were adjusted by determining differences in the protein concentration of the lyophilized BSA that was weighed and placed in solution from the BSA taken directly from the bottle of the commercial supplier (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) and placed in solution.

The results of the controlled release are shown in Fig. 1 [nP, represents *n*-propanol]. As can be seen, there is little or no burst effect and the release is essentially linear. The smaller particles with a large surface area to mass ratio release at a faster rate. There appears to be a slightly faster rate of release during the

WO 02/053174

PCT/US01/50355

first hours of release (Fig. 1). This faster release rate can be eliminated by preincubating the samples in medium prior to use.

Example 2

5 Release of BSA was measured up to 811 hours from samples of lyophilized protein precipitated from alcohol/aqueous solution. This example briefly describes sample preparation and analytical methodology and presents results showing controlled release of BSA. The release is affected by the specific alcohol used, the buffer used, and the particle size of the precipitated and lyophilized protein.

10 Solutions of BSA (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) at 5 % (w/w) were prepared in 0.1 M acetate buffer using an equivalent volume of 0.05 M sodium acetate and 0.05 M acetic acid. The pH was approximately 5. The alcohol *n*-propanol was added to a concentration of 50% (v/v). After overnight equilibration at room temperature, the supernatant was removed and the precipitate frozen at -20 C and brought to -70 C before lyophilization. The surface upon which the vials were
15 placed and the lyophilizer chamber was precooled to maintain the samples frozen during the lyophilization procedure. The sample was lyophilized for 5 hours. The time of lyophilization can be longer or shorter depending on the volume to be lyophilized. The lyophilized sample was divided into several pieces with a spatula. The pieces were divided into small particles by crushing the pieces against the wall
20 and bottom of the glass vial. The larger masses and small crushed particles were weighed so that 5 to 10 mg of the masses and the crushed particles were placed into separate 1.5 ml conical polypropylene tubes, then 1 ml of phosphate buffered saline was added. The masses or particles were disbursed into the liquid. One hour after
25 disbursing the samples, the contents of the tubes were mixed again and then the tubes centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm (Eppendorf Centrifuge, Model No. 5415). A sample of 0.1 ml was removed for assay and replaced with 0.1 ml of PBS. This procedure was repeated to take samples at 65 hours. At 98 hours and each time point thereafter, the full volume of release medium was removed and replaced with a fresh 1 ml of PBS.

30 Samples were analyzed for protein content with the microassay procedure for microtiter plates (Bio-Rad protein assay, based on the method of Bradford;

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Coomassie Brilliant Blue Dye, Cat. No. 500-0006) with 96 well microtiter plates. Standards contained 5 to 60 $\mu\text{g/ml}$ of BSA. Standards and samples were added to the wells in a volume of 0.16 ml first, then 40 μl of dye was added to each well with mixing before reading the absorbance at 630 nm. Standard curves were constructed from absorbances corrected for the blank values in the absence of added protein (BSA). Protein concentrations of the samples were calculated from the standard curve that was based on the same lot of BSA and prepared on the basis of weight of BSA to total volume (w/v). The values for the protein released at various times were adjusted by determining differences in the protein concentration of the lyophilized BSA that was weighed and placed in solution from the BSA taken directly from the bottle of the commercial supplier (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) and placed in solution.

The results of the controlled release are shown in Fig. 2 [nP, represents *n*-propanol]. As can be seen, there is no burst effect and the release is essentially linear. The smaller particles with a large surface area to mass ratio release at a faster rate. There appears to be a slightly faster rate of release during the first hours of release (Fig. 2). This faster release rate can be eliminated by preincubating the samples in medium prior to use.

Example 3

Release of BSA was measured up to 811 hours from samples of lyophilized protein precipitated from alcohol/aqueous solution. This example briefly describes sample preparation and analytical methodology and presents results showing controlled release of BSA. The release is affected by the specific alcohol used, the buffer used, and the particle size of the precipitated and lyophilized protein.

Solutions of BSA (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) at 5 % (w/w) were prepared in 0.01 M acetate buffer using an equivalent volume of 0.005 M sodium acetate and 0.005 M acetic acid. The pH was approximately 5. The *t*-butyl alcohol was added to a concentration of 40% (v/v). After overnight equilibration at room temperature, the supernatant was removed and the precipitate frozen at -20 C and brought to -70 C before lyophilization. The surface upon which the vials were placed and the lyophilizer chamber was precooled to maintain the

WO 02/053174

PCT/US01/50355

samples frozen during the lyophilization procedure. The sample was lyophilized for 5 hours. The time of lyophilization can be longer or shorter depending on the volume to be lyophilized. The lyophilized sample was divided into several pieces with a spatula. The pieces were divided into small particles by crushing the pieces against the wall and bottom of the glass vial. The larger masses and small crushed particles were weighed so that 5 to 10 mg of the masses and the crushed particles were placed into separate 1.5 ml conical polypropylene tubes, then 1 ml of phosphate buffered saline was added. The masses or particles were dispersed into the liquid. One hour after dispersing the samples, the contents of the tubes were mixed again and then the tubes centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm (Eppendorf Centrifuge, Model No. 5415). A sample of 0.1 ml was removed for assay and replaced with 0.1 ml of PBS. This procedure was repeated to take samples at 65 hours. At 98 hours and each time point thereafter, the full volume of release medium was removed and replaced with a fresh 1 ml of PBS.

Samples were analyzed for protein content with the microassay procedure for microtiter plates (Bio-Rad protein assay, based on the method of Bradford; Coomassie Brilliant Blue Dye, Cat. No. 500-0006) with 96 well microtiter plates. Standards contained 5 to 60 $\mu\text{g/ml}$ of BSA. Standards and samples were added to the wells in a volume of 0.16 ml first, then 40 μl of dye was added to each well with mixing before reading the absorbance at 630 nm. Standard curves were constructed from absorbances corrected for the blank values in the absence of added protein (BSA). Protein concentrations of the samples were calculated from the standard curve that was based on the same lot of BSA and prepared on the basis of weight of BSA to total volume (w/v). The values for the protein released at various times were adjusted by determining differences in the protein concentration of the lyophilized BSA that was weighed and placed in solution from the BSA taken directly from the bottle of the commercial supplier (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) and placed in solution.

The results of the controlled release are shown in Fig. 3 [tBA, represents *t*-butyl alcohol]. As can be seen, there is no major burst effect and the release is essentially linear after the first hours. The smaller particles with a large surface area

WO 02/053174

PCT/US01/50355

to mass ratio release at a faster rate. There appears to be a slightly faster rate of release during the first hours of release (Fig. 3). This faster release rate can be eliminated by preincubating the samples in medium prior to use.

Example 4

- 5 Release of BSA was measured up to 811 hours from samples of lyophilized protein precipitated from alcohol/aqueous solution. This example briefly describes sample preparation and analytical methodology and presents results showing controlled release of BSA. The release is affected by the specific alcohol used, the buffer used, and the particle size of the precipitated and lyophilized protein.
- 10 Solutions of BSA (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) at 5 % (w/w) were prepared in 0.1 M acetate buffer using an equivalent volume of 0.05 M sodium acetate and 0.05 M acetic acid. The pH was approximately 5. The alcohol *t*-butyl alcohol was added to a concentration of 40% (v/v). After overnight equilibration at room temperature, the supernatant was removed and the precipitate
- 15 frozen at -20 C and brought to -70 C before lyophilization. The surface upon which the vials were placed and the lyophilizer chamber was precooled to maintain the samples frozen during the lyophilization procedure. The sample was lyophilized for 5 hours. The time of lyophilization can be longer or shorter depending on the volume to be lyophilized. The lyophilized sample was divided into several pieces
- 20 with a spatula. The pieces were divided into small particles by crushing the pieces against the wall and bottom of the glass vial. The larger masses and small crushed particles were weighed so that 5 to 10 mg of the masses and the crushed particles were placed into separate 1.5 ml conical polypropylene tubes, then 1 ml of phosphate buffered saline was added. The masses or particles were disbursed into the liquid.
- 25 One hour after disbursing the samples, the contents of the tubes were mixed again and then the tubes centrifuged for 5 minutes at 5,000 rpm (Eppendorf Centrifuge, Model No. 5415). A sample of 0.1 ml was removed for assay and replaced with 0.1 ml of PBS. This procedure was repeated to take samples at 65 hours. At 98 hours and each time point thereafter, the full volume of release medium was removed and
- 30 replaced with a fresh 1 ml of PBS.

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Samples were analyzed for protein content with the microassay procedure for microtiter plates (Bio-Rad protein assay, based on the method of Bradford; Coomassie Brilliant Blue Dye, Cat. No. 500-0006) with 96 well microtiter plates. Standards contained 5 to 60 $\mu\text{g/ml}$ of BSA. Standards and samples were added to the wells in a volume of 0.16 ml first, then 40 μl of dye was added to each well with mixing before reading the absorbance at 630 nm. Standard curves were constructed from absorbances corrected for the blank values in the absence of added protein (BSA). Protein concentrations of the samples were calculated from the standard curve that was based on the same lot of BSA and prepared on the basis of weight of BSA to total volume (w/v). The values for the protein released at various times were adjusted by determining differences in the protein concentration of the lyophilized BSA that was weighed and placed in solution from the BSA taken directly from the bottle of the commercial supplier (USB, Amersham Life Sciences, Cat. No. 10868) and placed in solution.

The results of the controlled release are shown in Fig. 4 [tBA, represents *t*-butyl alcohol]. As can be seen, there is no major burst effect and the release is essentially linear after the first hours. The smaller particles with a large surface area to mass ratio release at a faster rate. There appears to be a slightly faster rate of release during the first hours of release (Fig. 4). This faster release rate can be eliminated by preincubating the samples in medium prior to use.

Comparison of the Release Data. A comparison of the release kinetics for all the samples are shown together on a single chart (Fig. 5). It can be seen that the various samples have release kinetics that will last for a wide variety of periods: from 500 hrs (21 days) to about 10,000 hrs (over 1 year). Combinations of the samples can produce release kinetics with a variety of release rates at different times. The small particles exhibited faster release rates except for the most rapidly releasing preparation (Fig. 5; Fig. 4; 0.1 M acetate; *t*-butyl alcohol, 40%). The results demonstrate that salt concentrations and the type of alcohol can modify the release rates extensively.

30

WO 02/053174

PCT/US01/50355

General Materials and Methods for Examples 5-13*(i) Materials*

- Bovine Serum Albumin (Cat. #10868, lot # 107331, USB)
- Human Serum Albumin (Cat. #10878, lot # 103077, USB)
- 5 • Albumin (Human) 25% Solution: Immuno-U.S., Inc. (NDC 64193-228-05, lot # 628808)
- Albumin (Human) 25% Solution: Alpha Therapeutic (Cat # 521302, lot # NG9856A)
- Interferon- α 001 (PBL) 0.94 mg/ml in Tris Buffer [see also U. S. Patents
- 10 5,789,551, 5,869,293, 6,001,589, 6,299,870, 6,300,474]
- Interferon- α 012 (PBL) 1.38 mg/ml in Tris Buffer
- Tris Buffer (20 mm Tris, 200 mm NaCl, 6% glycerol, pH 7-8)
- Interferon ELISA (PBL product #41110)
- 15 • PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Cat. #8537, Sigma Chemical Co., or Cat. #14198-144, Gibco-BRL)

(ii) Methods

Protein precipitation. Proteins were precipitated at ambient temperature (about 24°C) by one of two basic procedures: the organic addition method or the acid addition method. With the organic addition method, the protein solution was prepared in aqueous solution and an organic component added to precipitate the protein. (Alternatively, an aqueous solution containing protein can be added to the organic solution.) For the acid addition method, a portion of the organic component was added to the protein solution under conditions that do not precipitate the protein. Precipitation was initiated by adding an acidified solution concurrent with or after

20 addition of organic components to the protein solution. Unless otherwise stated in the legends, deionized water was used to dilute formulation reagents. HSA stock solutions were made by diluting 25% source material to 1% final concentration, and data presented were obtained using Immuno-U.S. Human Serum Albumin.

Adjustment of pH. Because organic solvent hinders the ability to accurately measure pH, the pH specified for any formulation refers to the pH of the (aqueous) solution prior to addition of the organic component. In the case of the organic

30

WO 02/053174

PCT/US01/50355

addition method, the pH of an aqueous protein solution was adjusted to the desired pH just prior to adding the organic component. To make the same formulation by the acid addition method, an equivalent amount of acid was added in the final step rather than prior to addition of the organic solvent.

5 Maturation procedures. The maturation period began after addition of the final formulation component to initiate precipitation and ended when centrifugation was initiated to separate precipitate from supernatant. The release properties of the precipitate depend on the maturation time as well as the conditions of the formulation during this period. Temperature was ambient, about 24°C unless
10 otherwise noted. Formulations were mixed by vessel rotation, stirred in tubes or in vials containing a magnetic stir-bar, or mixed initially and left undisturbed. In addition, during the maturation period some formulations were drawn through a syringe needle one to three times toward the end of the maturation period.

Wash procedures. The first steps in washing precipitates were to 1) separate
15 the precipitate from supernatant by centrifugation, 2) remove as much supernatant as possible without disturbing the precipitate, and 3) re-suspend the precipitate in PBS/0.01% thimerosal. Precipitates were harvested and washed (PBS/0.01% thimerosal) once or twice by centrifugation for 2-5 min at 3,000 to 15,000 rpm in a Beckman or Eppendorf microcentrifuge. A sample of the harvested supernatant was
20 diluted 10-fold in PBS/0.01% thimerosal to prevent (through dilution of organic and acid) further precipitation of protein in the diluted supernatant. If the release experiment was to begin immediately, the last harvested wash sample was labeled as the zero time sample and the resuspended preparations placed in an incubator at 37 °C at which temperature release was measured for all samples. Alternatively, the
25 sample could be lyophilized without resuspension after initial harvest or after wash cycles.

Lyophilization. Precipitates to be lyophilized without washing were cooled to 0-4°C, then sequentially at -20 °C, -70 °C, and -135 °C, at least 15 min at each temperature. Precipitates to be lyophilized after washing with PBS/0.01%
30 thimerosal were frozen only at -20 °C. Formulations were lyophilized in a Virtis Freezemobile 6 equipped with a Unitop 100 SM Bulk/Stoppering Chamber. The

WO 02/053174

PCT/US01/50355

lyophilizer shelf was pre-cooled with dry ice before transferring vials from the freezer to the shelf. Vials were lyophilized for 2-5 hr at <400 mTorr.

Release measurements. Sufficient PBS to make a total volume of 1 ml of release medium (PBS/0.01% thimerosal) was added to the washed and/or lyophilized precipitates. Each precipitate was suspended in release medium (PBS/0.01% thimerosal) before placing the release sample in a 37°C incubator to begin measuring release of the proteins. At selected time intervals, tubes containing the samples with the release medium were removed from the incubator and centrifuged for 2-5 min at 3,000 to 15,000 rpm. The majority of the medium containing the released protein in the supernatant, usually about 0.9 ml, was removed and replaced with an equal volume of fresh PBS/0.01% thimerosal.

Sample analysis. Albumin samples were assayed as is or diluted with PBS/0.01% thimerosal to the range of the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Labs). Stock solutions diluted from the source albumin raw material in the formulations were used as assay standards. Interferon samples, as is or diluted with PBS/0.01% thimerosal, were assayed by ELISA (PBL Biomedical Laboratories, product # 41110).

Calculations. The cumulative quantity of analyte released at each sample time was calculated by adding the amount released in the n^{th} sample to the sum of the quantities released in the previous samples. The quantity released in the n^{th} sample was corrected for the residual quantity left in the tube from the previous sample since typically 0.9 ml of the total volume of 1.0 ml was collected at each sample interval. Cumulative quantities released were plotted as the mass released or as a percentage of the calculated total analyte present in the precipitate at the start of incubation at 37 °C (start of the release). The total analyte present in the precipitates at the start of the release was calculated by subtracting the quantity of analyte recovered in the supernatant and wash samples from the original amount of analyte added to the formulation.

Example 5

As an embodiment of the sustained release, the release of HSA and human IFN- α 012 as a function of sodium acetate concentration was evaluated as shown in

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Fig. 6. Solution I consisted of 9.0 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 10 µg of IFN-α012 in 40% (w/w) *n*-propanol (0.364 g *n*-propanol) in H₂O for a total weight of 0.91 g. The various Solution II compositions consisted of various quantities of sodium acetate (1 M, pH 6.3) and deionized water and 0.040 g *n*-propanol to make solutions of 40% *n*-propanol and 250, 450, and 600 mM final sodium acetate concentrations with a total volume of 0.10 g. Solution II (0.10 g) was added to Solution I (0.91 g) with stirring to yield a final 1.01 g of each formulation. The final 1.01 g formulations containing 40% *n*-propanol and 25, 45, and 60 mM concentrations of sodium acetate were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at 24°C and passed through 25G syringe needles just prior to separating supernatants from precipitates. The quantity of HSA and IFN-α012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. As can be seen the early burst phase of the sustained release and the rate of release of HSA and human IFN-α012 can be altered by the sodium acetate concentration. Higher sodium acetate concentration decreased the burst rate (0 - 24 hour period) extensively and decrease the rate of release of the HSA and human IFN-α012 (Fig. 6A-D). Release continued after analysis period of about 7 days. The burst phase for release of human IFN-α012 was especially sensitive to the sodium acetate concentration. The release was monitored for about 160 hrs (over six days).

Example 6

Effect of cation species in formulation on release of HSA is shown in Fig. 7A,B. Solution I consisted of 8.1 mg of HSA (Immuno-U.S.) in 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water in a total volume of 0.91 ml. The various Solution II compositions consisted of adding none or 0.025 ml of various salt stocks (each at 1 M cation concentration, pH 6.3) to deionized water followed by *n*-propanol to make solutions 40% (w/w) *n*-propanol and 250 mM final cation concentration in a total volume of 0.10 ml. Solution II (0.10 ml) was added to 0.91 ml of Solution I with stirring to give a final 1.01 ml formulation having 40% (w/w) *n*-propanol. The final 1.01 ml formulations containing 40% *n*-propanol and no or 25 mM concentrations of potassium, sodium or magnesium acetate were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at

WO 02/053174

PCT/US01/50355

24°C prior to separating supernatants from precipitates. The quantity of HSA in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. The burst rate in the first 24 hours was reduced substantially by sodium and even further by magnesium in the formulation.

5 Furthermore, the release rate can be increased or reduced by use of the various acetates. Extended release rates of over 25 days (over 600 hrs) were achieved with all these formulations. Release was projected to continue beyond the time measured by the graphs (Fig. 7A,B). The release was monitored for over 600 hrs or 25 days.

Example 7

10 Effect of cation species in formulation on release of human IFN- α 012 is shown in Fig. 8A,B. Solution I consisted of 45 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 5.44 μ g IFN- α 012 in 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water in a total volume of 4.55 ml. The various Solution II compositions consisted of adding 36 μ l of 0.1 M acetic acid (to compensate for the buffer capacity of the HSA solution) and 0.250 g of
15 potassium, sodium or magnesium acetate solution (each at pH 6.3) to 0.314 g of deionized water and 0.400 g of *n*-propanol to make solutions of 40% (w/w) *n*-propanol and 250 mM final acetate concentration in a total weight of 1 g. The potassium acetate solution was made with 0.980 g potassium acetate, 10.061 g water and 0.274 ml 1 M acetic acid. The sodium acetate solution was made with 0.823 g
20 sodium acetate, 10.056 g water and 0.245 ml 1 M acetic acid. The magnesium acetate solution was made with 2.144 g magnesium acetate, 10 g water and 0.200 ml 1 M acetic acid. Solution II (0.50 ml) was added to 4.55 ml of Solution I with stirring to give a final 5.05 ml formulation having 40% (w/w) *n*-propanol. The final formulations were stirred in 50 ml conical tubes for 6 hr at 24°C, the precipitates
25 washed with 5 ml of PBS/0.01% thimerosal, then suspended in 5 ml PBS/0.01% thimerosal, then split into two individual 2.5 ml samples prior to separating supernatants from precipitates. Release data are from the precipitates from one 2.5 ml portion of the formulation. The salt concentrations in the formulations were 21 mM NaOAc, 20 mM KOAc and 18 mM Mg(OAc)₂ in the respective solutions. The
30 quantity of IFN- α 012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. The

WO 02/053174

PCT/US01/50355

burst rate can be reduced extensively from potassium to sodium and to magnesium acetate in that order (Fig. 8). In addition, the overall rate of release can be modulated by these salts: the rate of release of IFN- α 012 is fastest with potassium acetate, less with sodium acetate and slowest with magnesium acetate (Fig. 8). The release was monitored for about 170 hrs or seven days.

Example 8

Effect of pH of formulation on release of human IFN- α 012 is shown in Fig. 9. Acetic acid (0.1 M) was used to adjust 5% HSA stock solutions to pH 5.0 or pH 7.0. Solution I consisted of 10 mg of HSA (Alpha Therapeutic) from either pH 5.0 or pH 7.0 HSA stock solutions, 6.83 μ g IFN- α 012 and additional water to a total weight of 0.6 g. The final formulations were prepared by adding 0.4 g of *n*-propanol to Solution I with stirring to yield a concentration of 40% (w/w) *n*-propanol. Final 1 g formulations were stirred in 2 ml glass vials for 24 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. The quantity of IFN- α 012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. The burst was modest at both pH 5.0 and pH 7.0 and was remarkably approaching linearity at both pH values (Fig. 9). The lower pH increased the rate of release extensively. Relatively little or no overall burst effect was evident. The release was monitored for about 240 hrs or ten days.

Example 9

Effect of pH of formulation on release of HSA and human IFN- α 012 is shown (Fig. 10A-D). Solution I consisted of 45 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 5.44 μ g IFN- α 012 in 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water in a total volume of 4.55 ml. Solution II compositions were prepared as follows. Solution IIa: 1.55 ml of 1 M acetic acid was added to 0.82 g anhydrous sodium acetate and 10 g deionized water to adjust pH of this Solution A to 5.52; then 0.036 ml of 0.1 M acetic acid was added to 0.250 g of Solution A to compensate for the buffer capacity of the HSA solution; deionized water was then added to bring the total weight to 0.600 g; then 0.400 g of *n*-propanol was added to make a final solution of 40% (w/w) *n*-propanol in a total weight of 1.00 g. Solution IIb: 0.40 ml of 1 M acetic acid was added to 0.82 g anhydrous sodium acetate and 10 g of deionized water to adjust pH of this

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Solution B to 6.13; then 0.036 ml of 0.1 M acetic acid was added to 0.250 g of Solution B to compensate for the buffer capacity of the HSA solution; deionized water was then added to bring the total weight to 0.600 g; then 0.400 g of *n*-propanol was added to make a final solution of 40% (w/w) *n*-propanol in a total weight of 1.00 g. Solution IIc: 0.245 ml of 1 M acetic acid was added to 0.823 g anhydrous sodium acetate and 10.056 g deionized water to adjust pH of this Solution C to 6.31; then 0.036 ml of 0.1 M acetic acid was added to 0.250 g of Solution C to compensate for the buffer capacity of the HSA solution; deionized water was then added to bring the total weight to 0.600 g; then 0.400 g of *n*-propanol was added to make a final solution of 40% (w/w) *n*-propanol in a total weight of 1.00 g. To prepare the final formulations, 0.50 ml from Solutions IIa, IIb, or IIc was added to 4.55 ml of Solution I with stirring to yield three 5.05 ml formulations having 40% (w/w) *n*-propanol and pH 5.52, pH 6.13 or pH 6.31, respectively. Final formulations were stirred in 50 ml conical tubes for 6 hr at 24°C, then split into two individual 2.52 ml samples prior to separating supernatants from precipitates. Release data is from one 2.52 ml portion of the formulation. The amount of IFN- α 012 in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. The overall burst was minimal at all pH values (pH 5.52, pH 6.13 and pH 6.31 (Fig. 10A,B) for HSA, but slightly greater for human IFN- α 012 (Fig. 10C,D). The rate of release of both HSA and human IFN- α 012 was increased by lowering the pH in all cases (Fig. 10A-D) as also shown in Fig. 9. Of note is that small changes in the pH can modulate the rate of release and that overall changes in release are the same for HSA and IFN- α 012.

Example 10

Effect of acid concentration of formulation on release of HSA and human IFN- α 001 from precipitates formed in the presence of 25 mM sodium acetate is shown in Fig. 11. Solution I consisted of 8.1 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 0.92 μ g IFN- α 001 in 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water in a total volume of 0.9 ml. Several Solution II formulations, IIa, IIb, IIc and IId, were prepared consisting of 0.004, 0.010, 0.015 and 0.025 ml of 0.1 M acetic acid, respectively, in 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water. Solution III consisted of 1 M sodium acetate and 40%

WO 02/053174

PCT/US01/50355

(w/w) *n*-propanol in deionized water in a total volume of 0.025 ml. Several Solution IV formulations, IVa, IVb, IVc and IVd, were prepared consisting of 0.071, 0.065, 0.060 and 0.050 ml of 40% (w/w) *n*-propanol, respectively, in deionized water. In preparing the final formulations, Solutions IIa, IIb, IIc and IId were matched with Solutions IVa, IVb, IVc and IVd, respectively. Solutions II, III and IV were mixed together then Solution I added rapidly to the mixture to give a final 1 ml formulation. This yielded a formulation having a final concentration of 25 mM sodium acetate, 40% (w/w) *n*-propanol and the final acetic acid concentrations indicated on the Figure. Formulations were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. After washing, precipitates were lyophilized 4 hr at <400 mTorr. The amount of HSA in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. The burst is increased by increased quantity of acetic acid comparable to the increase in burst on decrease of pH as seen in Figs. 9 and 10. Furthermore, the rate of release increases with the quantity of acid also comparable to the increase in rate of release with decrease in pH as seen in Figs. 9 and 10. The release of HSA and human IFN- α 001 was monitored for about 90 hrs (Fig. 11A-D).

Example 11

Effect of salt concentration of formulation on release of HSA and human IFN- α 001 from precipitates formed in the presence of 1.5 mM acetic acid is shown in Fig. 12. Solution I consisted of 8.1 mg of HSA (Immuno-U.S.) and 0.92 μ g IFN- α 001 in 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water in a total volume of 0.9 ml. Solution II consisted of 0.1 M acetic acid and 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water in a total volume of 0.015 ml. Several Solution III formulations, IIIa, IIIb, IIIc and III d, were prepared consisting of 0, 0.015, 0.025 and 0.035 ml of 1 M sodium acetate, respectively, in 40% (w/w) *n*-propanol in deionized water. Several Solution IV formulations, IVa, IVb, IVc and IVd, were prepared consisting of 0.085, 0.070, 0.060 and 0.050 ml of 40% (w/w) *n*-propanol, respectively, in deionized water. In preparing the final formulations, Solutions IIIa, IIIb, IIIc and III d were matched with Solutions IVa, IVb, IVc and IVd, respectively. Solutions II, III and IV were mixed together then Solution I added rapidly to the mixture to give a final 1 ml

WO 02/053174

PCT/US01/50355

formulation. This yielded a final concentration of 1.5 mM acetic acid, 40% (w/w) *n*-propanol (w/w) and the final sodium concentrations indicated on the Figure. Formulations were stirred in 2 ml glass vials for 6 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. After washing, precipitates were lyophilized 4 hr at 5 <math><400</math> mTorr. The amounts of HSA and IFN- α 001 in washed precipitates were determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. Increased salt concentration minimizes the burst and reduces the rate of release of HSA (Fig. 12A, B) and IFN- α 001 (Fig. 12C, D). Much of the burst can be eliminated by sodium acetate concentrations above 15 mM. The release was monitored for about 90 hrs.

Example 12

Effect of salt concentration and pH of formulation on release of HSA with tertiary butanol precipitates is shown in Fig 13. Acetic acid (0.1 M) was used to adjust 5% HSA stock solutions to pH 5.35 or 7.0. Solution I consisted of 18.0 mg of HSA (Alpha Therapeutic) from the pH 5.35 or pH 7.0 5% stock solution, 1.0 μ g IFN- α 012 and deionized water bringing the total solution weight to 0.375 g. To prepare Solutions IIa and IIb with NaCl concentrations of 0.02 M and 0.1 M, respectively, sufficient deionized water was added to 0.021 and 0.0043 ml of a 3.75 M NaCl solution to bring the total weight of each solution to 0.425 g. Both pH 5.35 and pH 7.0 variants of Solution I (0.375 g) were added to Solutions IIa and IIb to yield 0.80 g of the various combinations of pH and NaCl concentration as shown in the Figure prior to the addition of 0.31 or 0.47 g of *tert*-butyl alcohol to yield 28.1% and 36.9% (w/w) *tert*-butyl alcohol (see summary of the chart legends). Final 1.11-1.27 g formulations were stirred in 2 ml glass vials for 24 hr at 24°C prior to separating supernatants from precipitates. The amount of HSA in washed precipitates was determined as described in Materials and Methods. Release was performed in PBS/0.01% thimerosal. The pH had very little effect on the burst in the formulations with tertiary butyl alcohol (Fig. 13A and B). Furthermore, the rate of release of HSA was decreased by decrease in pH in contrast to the formulations with *n*-propanol (Figs. 9 and 10). Nevertheless, the overall rate of release of HSA over the 350 hrs of monitoring (Fig. 13). The release rates were more near linearity

WO 02/053174

PCT/US01/50355

at pH 7.0 than at pH 5.35.

Example 13

Effect of pH and salt concentration of formulation on threshold of precipitation of HSA by *n*-propanol is shown in Fig. 14. An 11% (w/w) HSA (USB) solution was dialyzed 3 times for 6 hr each time against 2 L deionized H₂O in a Pierce Slide_alyzer (15 ml capacity, No. 66410, lot # B344820B). The final concentration was analyzed by spectrophotometry at 280 nm to be 8.28% (w/w). This solution was diluted to 4% (w/w) with deionized water. Amounts (0.9 g) of 4% HSA were weighed into 2 ml glass vials. Sodium acetate (1 M), acetic acid (1 M), sodium hydroxide (1 M), and water were added in various combinations in a total weight of 0.1 g to yield the final sodium concentrations and pH values measured in 1 g formulations as shown in the Figure. Subsequently, *n*-propanol was added in about 50 μ l increments with stirring, and the point at which initial precipitates were stable (did not re-dissolve with stirring within 5 minutes) was recorded. Connected data points indicate equivalent sodium concentrations at various pH and *n*-propanol (w/w) concentrations. The threshold of precipitation of HSA can be modified greatly by the sodium acetate concentration. At low sodium acetate concentrations, the least level of *n*-propanol is required to initiate precipitation of the HSA. These data (Fig. 14) provide general approaches to modulate the formulations.

20

WO 02/053174

PCT/US01/50355

Claims

1. A slow release formulation comprising one or more biologically active molecules from a solid composition prepared by exposure of the biologically active molecules to an organic solvent under conditions wherein a precipitate, lyophilate or crystal is formed.
- 5 2. A slow release formulation comprising precipitate, lyophilate or crystals of a polypeptide prepared by exposure of the polypeptide to an organic solvent, which polypeptide is released from the formulation in aqueous solution for a period of at least 7 days.
- 10 3. A formulation comprising precipitate, lyophilate or crystals of a biologically active polypeptide prepared by exposure of the polypeptide to a polar protic organic solvent, which formulation, when administered to a patient, releases said polypeptide at a rate providing an average steady state dosage of at least the ED₅₀ for the polypeptide for a period of at least 7 days.
- 15 4. The formulation of any of claims 1-3, wherein the organic solvent is an alcohol, an aldehyde, a ketone, a hydrocarbon, an aromatic hydrocarbon, or a mixture thereof.
5. The formulation of any of claims 1-3, wherein the organic solvent is an alcohol or mix of alcohols.
- 20 6. The formulation of claim 5, wherein the alcohol is a lower alcohol, or mixture thereof.
7. The formulation of claim 5, wherein the alcohol is selected from the group consisting of methanol, ethanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, isobutanol, and t-butanol, or a mixture thereof.
- 25 8. The formulation of any of claims 1-3, wherein the organic solvent is a polar protic solvent.
9. The formulation of any of claims 1-3, wherein the organic solvent is a water-miscible polar protic solvent.
- 30 10. The formulation of any of claims 1-3, wherein the biologically active molecules or polypeptides are released from the formulation in aqueous solution at a rate which provides an average steady state dosage of at least the

WO 02/053174

PCT/US01/50355

- ED₅₀ for the biologically active molecules or polypeptides for a period of at least 50 days.
11. The formulation of any of claims 1-3, wherein the organic solvent(s) are chosen such that, when administered to a patient, the solvent released from the formulation at a rate which remains at least one order of magnitude below the IC₅₀ for deleterious side effects, if any, of the solvent.
12. The formulation of claim 1, wherein biologically active molecule is a polymer selected from the group consisting of a protein, a peptide, a nucleic acid, an oligonucleotide, a carbohydrate, a ganglioside, or a glycan.
13. The formulation of any of claims 2-3, wherein the polypeptide is selected from the group consisting of cytokines, growth factors, somatotropin, growth hormones, colony stimulating factors, erythropoietin, plasminogen activators, enzymes, T-cell receptors, surface membrane proteins, lipoproteins, clotting factors, anticoagulating factors, tumor necrosis factors, transport proteins, homing receptors, and addressins.
14. The formulation of claim 13, wherein the polypeptide is selected from the group consisting of rennin; human growth hormone; bovine growth hormone; growth hormone releasing factor; parathyroid hormone; thyroid stimulating hormone; lipoproteins; α -1-antitrypsin; insulin; proinsulin; follicle stimulating hormone; calcitonin; luteinizing hormone; glucagon; a clotting factor such as factor VIIIc, factor IX, tissue factor, and von Willebrands factor; anti-clotting factors; atrial natriuretic factor; lung surfactant; a plasminogen activator; bombesin; thrombin; hemopoietic growth factor; tumor necrosis factor- α ; tumor necrosis factor- β ; enkephalinase; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); human macrophage inflammatory protein (MIP-1- α); a serum albumin; mullerian-inhibiting substance; relaxin A-chain; relaxin B-chain; prorelaxin; gonadotropin-associated peptide; a microbial protein; DNase; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor (VEGF); receptors for hormones or growth factors; integrin; protein A; protein D; rheumatoid factors; a neurotrophic factor; platelet-derived growth factor (PDGF); a fibroblast

WO 02/053174

PCT/US01/50355

- growth factor; epidermal growth factor (EGF); transforming growth factors (TGF); insulin-like growth factor-I; insulin-like growth factor-II; des(1-3)-IGF-I (brain IGF-I); insulin-like growth factor binding proteins; CD proteins; erythropoietin; osteoinductive factors; immunotoxins;; an interferon; colony stimulating factors (CSFs); interleukins (ILs); superoxide dismutase; T-cell receptors; surface membrane proteins; decay accelerating factor; antigens; transport proteins; homing receptors; addressins; regulatory proteins; immunoglobulin-like proteins; antibodies; and nucleases, or fragments thereof.
- 5
- 10 15. The formulation of claim 1, wherein biologically active molecule is selected from the group consisting of a lipid and a sterol.
16. The formulation of claim 1, wherein biologically active molecule is a small organic compound.
17. The formulation of any of claims 1-3, which is a precipitate.
18. The formulation of any of claims 1-3, which is a lyophilate.
19. A formulation comprising a precipitate or lyophilate of a polypeptide, which precipitate or lyophilate includes at least 50 percent (molar) polar protic organic solvent(s), and which formulation, when administered to a patient, releases said polypeptide at a rate providing an average steady state dosage of
- 20 at least the ED₅₀ for the polypeptide for a period of at least 7 days.
20. A medicament for administration to an animal, comprising the formulation of any of claims 1-3.
21. The medicament of claim 20, for administration to a mammal.
22. The medicament of claim 20, for administration to a human.
- 25 23. A method for manufacturing a medicament comprising formulating the formulation of any of claims 1-3 with a pharmaceutically acceptable excipient.
24. A method method for manufacturing a slow release formulation of a biologically active molecule, comprising (a) exposing said biologically active
- 30 molecules to an organic solvent, and (b) forming a precipitate, lyophilate or crystal.

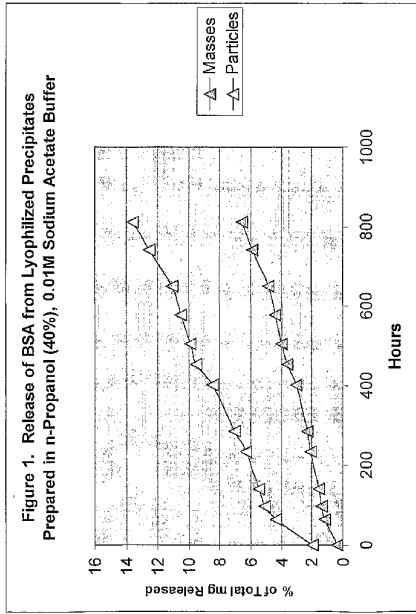
WO 02/053174

PCT/US01/50355

25. A method for conducting a pharmaceutical business comprising:
- (a) preparing a formulation of any of claims 1-3;
 - (b) providing marketing and/or product literature for instructing healthcare providers on the use of said formulations; and
 - 5 (c) providing a distribution network for delivering said formulation to healthcare providers.

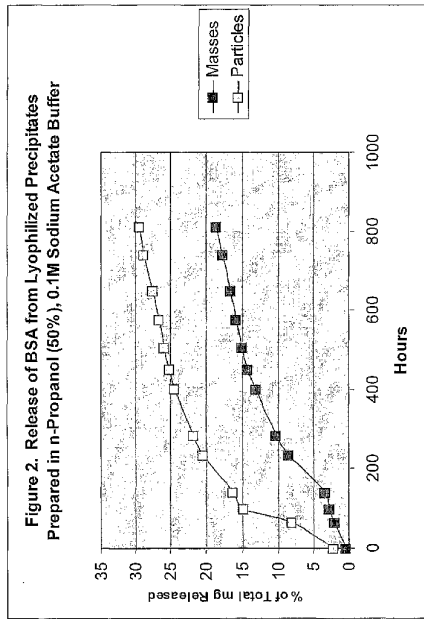
WO 02/053174

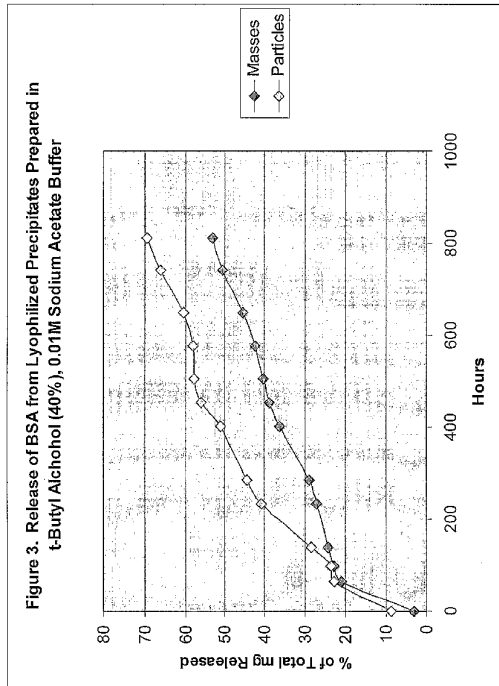
PCT/US01/50355

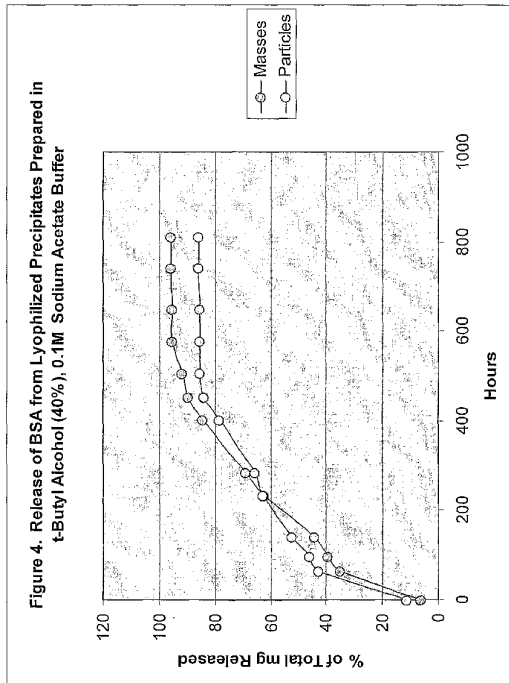


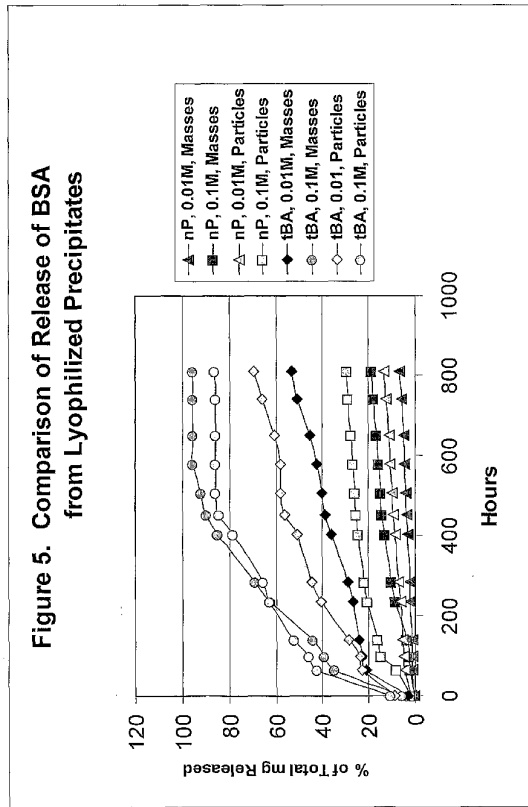
WO 02/053174

PCT/US01/50355









WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 6A

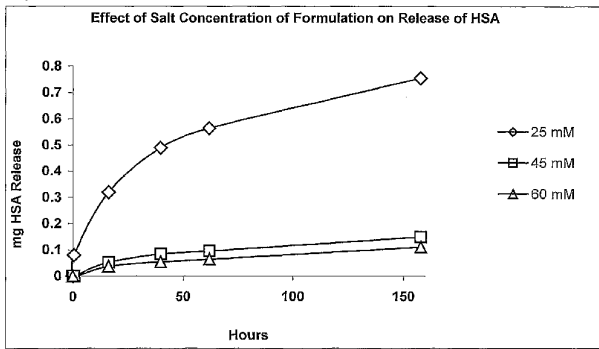
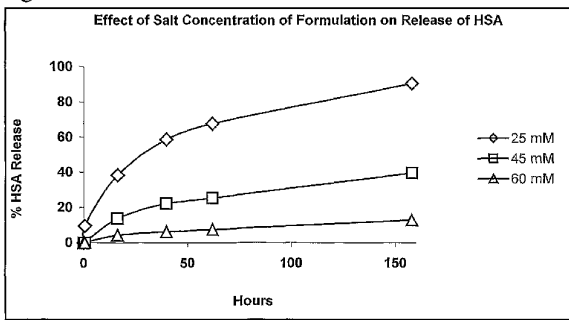


Figure 6B



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 6C

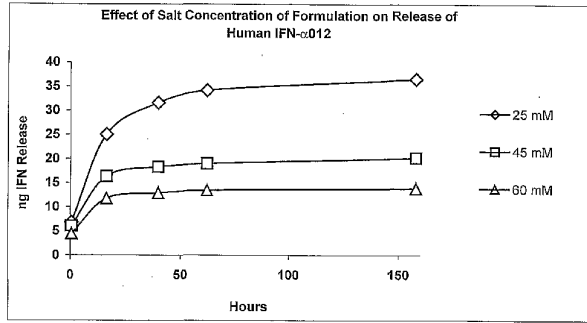
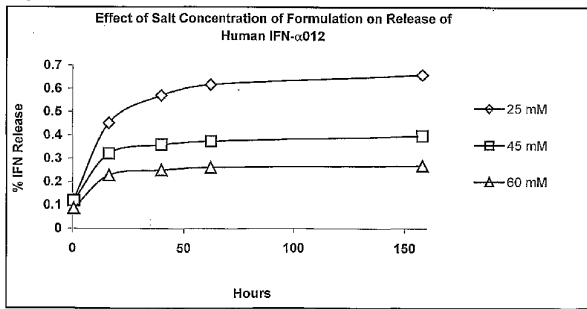


Figure 6D



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 7A

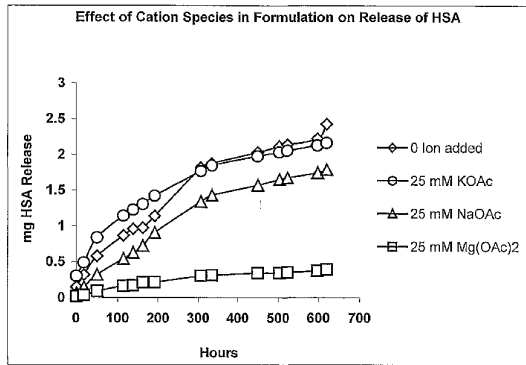
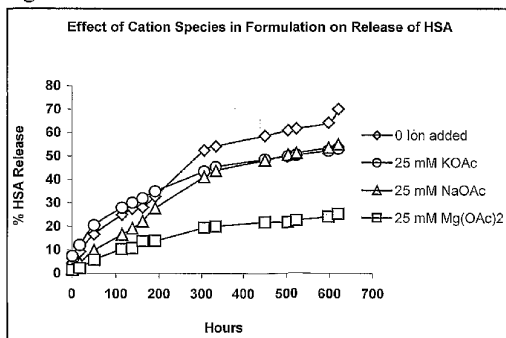


Figure 7B



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 8A

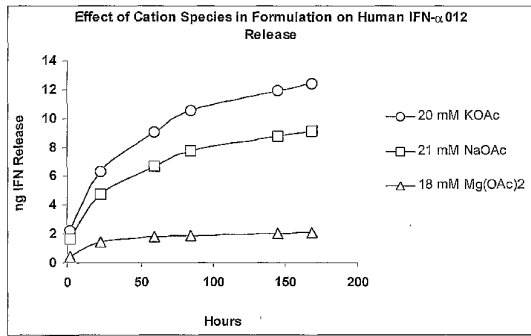


Figure 8B

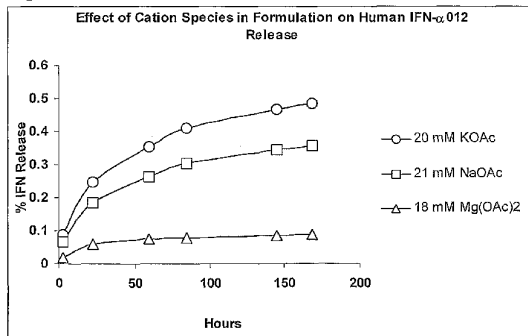


Figure 9A

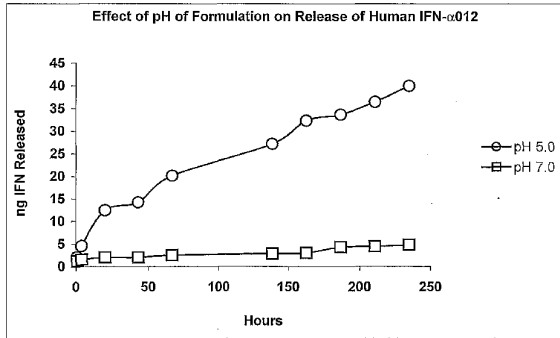
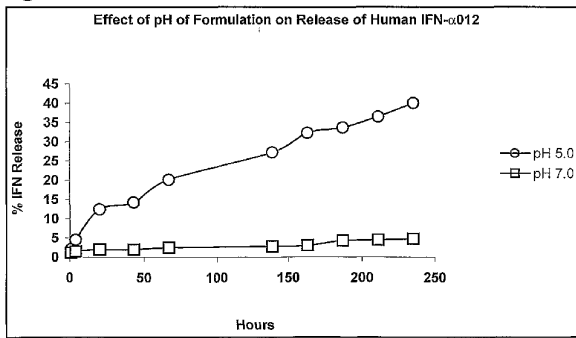


Figure 9B



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 10A

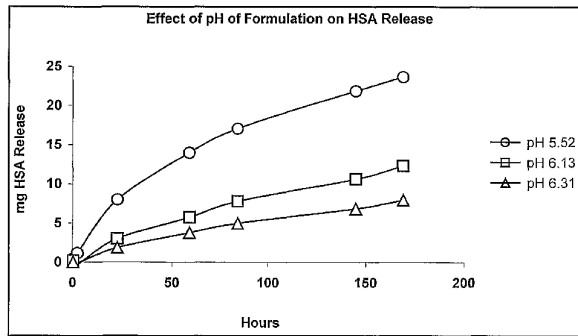
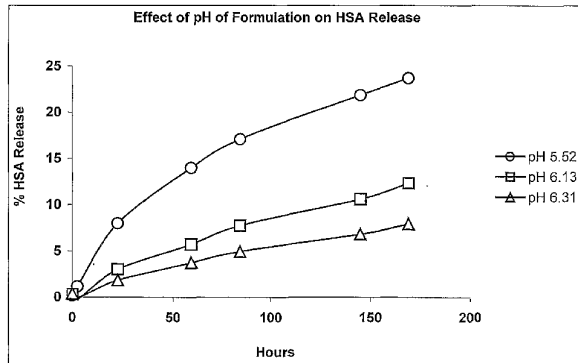


Figure 10B



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 10C

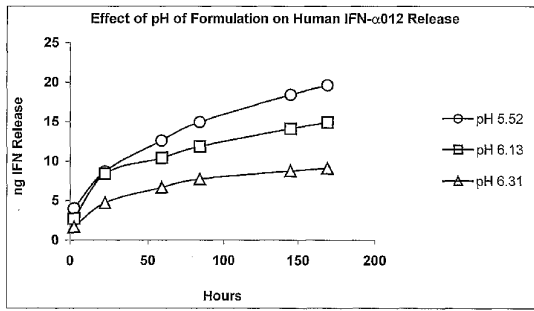


Figure 10D

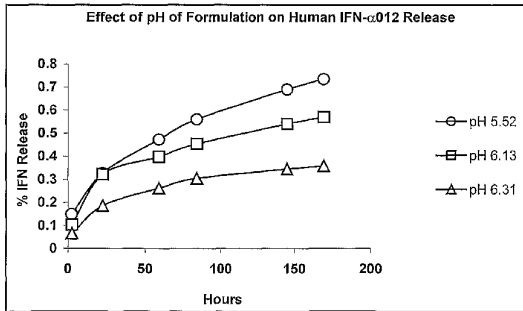


Figure 11A

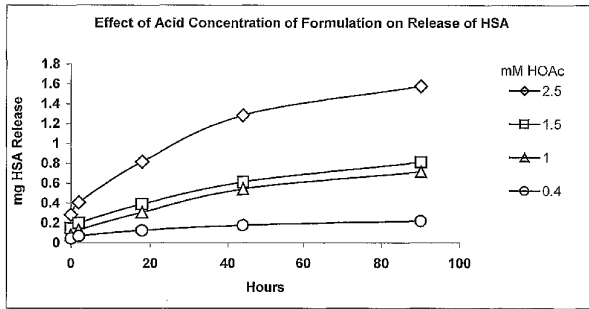


Figure 11B

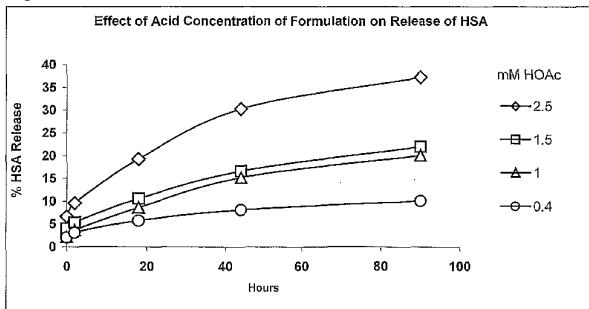


Figure 11C

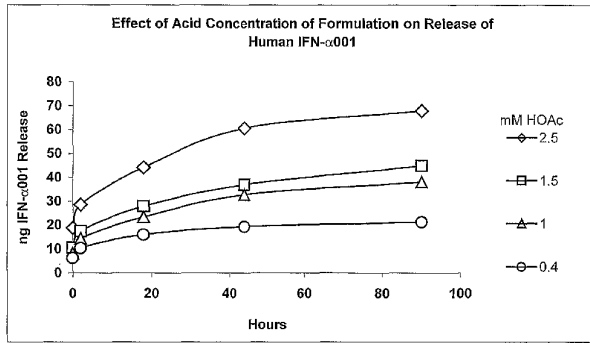
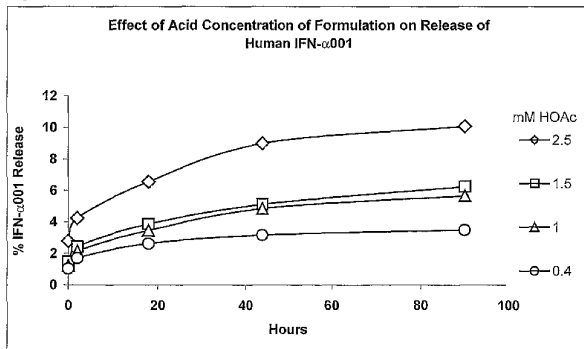


Figure 11D



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 12A

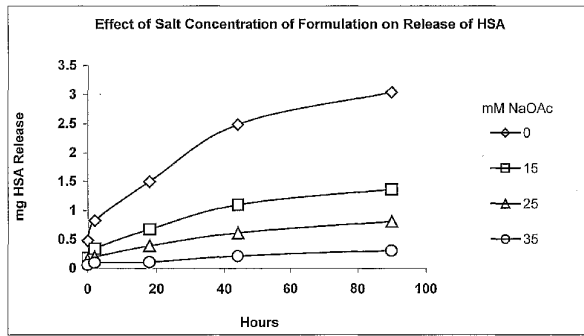
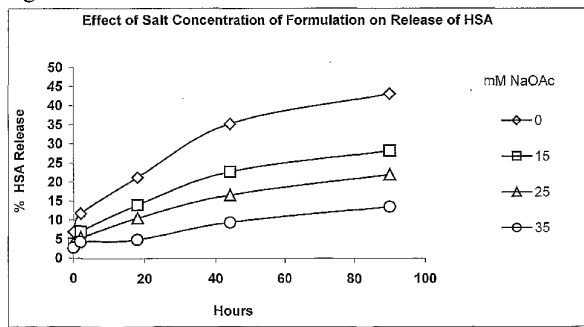


Figure 12B



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 12C

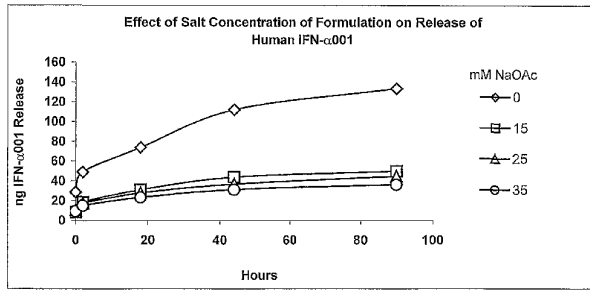


Figure 12D

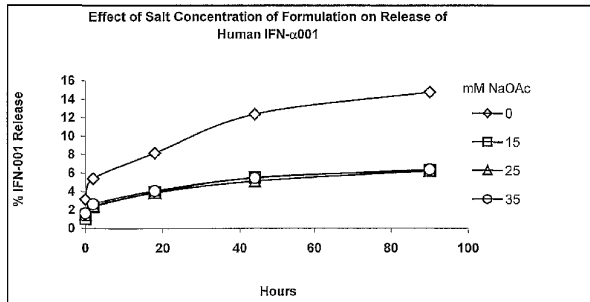


Figure 13A

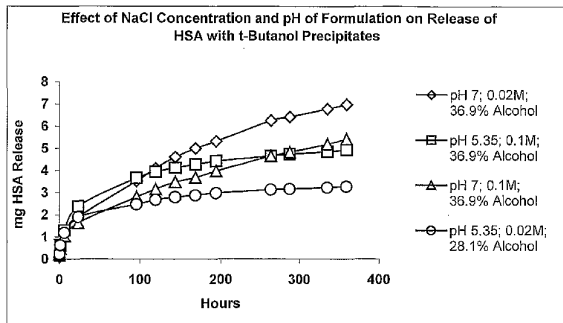
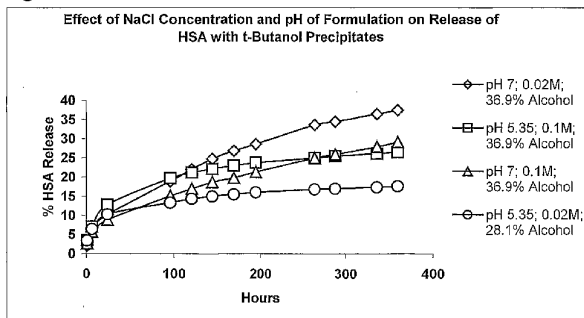


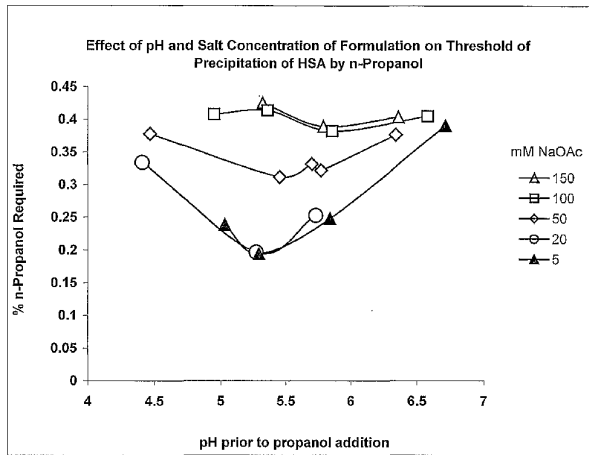
Figure 13B



WO 02/053174

PCT/US01/50355

Figure 14



【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053174 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/21, 9/26 (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/50355 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 31 December 2001 (31.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/258,916 29 December 2000 (29.12.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PBL BIOMEDICAL LABORATORIES [US/US]; 100 Jersey Avenue, Building D, New Brunswick, NJ 08901 (US).

Published:
with international search report

- (72) Inventor; and
- (73) Inventor/Applicant (for US only): PESTKA, Sidney [US/US]; 82 Brookside Terrace, West Caldwell, NJ 07006 (US).
- (74) Agents: VINCENT, Matthew, P. et al.; Ropes & Gray, Patent Group, One International Place, Boston, MA 02110 (US).
- (88) Date of publication of the international search report: 21 August 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/053174 A3

(54) Title: CONTROLLED RELEASE PHARMACEUTICAL SYSTEMS

(57) Abstract: The present invention relates to controlled release delivery of biologically active molecules from a solid composition prepared by exposure of the molecules to an organic compound. For instance, the organic compound is an organic solvent, such as an alcohol (e.g., preferably a lower alcohol, such as methanol, ethanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, isobutanol, t-butanol, etc.), a mixture of alcohols, an aldehyde, a ketone, a hydrocarbon (saturated or unsaturated), or an aromatic hydrocarbon. The solvent can be a mixture of different organic solvents, or the resulting formulation can be a mixture of, e.g., different lyophilized preparations, such as may be used to control the release profile of the resulting admixture.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/50355
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/21 A61K9/26		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 711 968 A (KHAN M AMIN ET AL) 27 January 1998 (1998-01-27) column 1, line 5 - line 34 column 2, line 27 - line 49 column 3, line 41 - line 63 column 5, line 53 - line 64 column 7, line 22 - line 40 column 8 -column 11; examples 1,2,7 figures claims 1-10,22,24,28,29 --- ---	1-3, 8-14, 17-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 9 December 2002		Date of mailing of the international search report 17/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Palaisian 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-2016		Authorized officer Rankin, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US 01/50355

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 118 528 A (DEVISSAGUET JEAN-PHILIPPE ET AL) 2 June 1992 (1992-06-02) column 2, line 9 - line 13 column 3, line 26 - line 33 examples 1,5,9,10,14,15,17 claims ---	1,8-11, 16,17, 19-24
X	US 6 165 508 A (KHAN M AMIN ET AL) 26 December 2000 (2000-12-26) column 1, line 40 - line 63 column 3, line 61 -column 4, line 26 column 5, line 29 - line 50 example 1 claims 1,3,13 ---	1-3, 8-14, 17-24
X	US 5 725 804 A (YEN RICHARD C K) 10 March 1998 (1998-03-10) column 4, line 60 -column 5, line 42 examples 1,2,6,8,14,17 claims ---	1-14, 16-24
X	US 4 826 689 A (VIOLANTO MICHAEL R) 2 May 1989 (1989-05-02) column 1, line 25 - line 49 column 3, line 16 - line 62 examples claims ---	1-24
X	EP 0 251 476 A (SYNTEX INC) 7 January 1988 (1988-01-07) page 3, line 27 - line 33 page 8, line 41 -page 9, line 7 page 12 -page 17; examples 1-5,8,9 figure 1 claims ---	1-4, 10-14, 17-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/50355
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 25 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 50355

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 25 are directed to a method of doing business, the search has been carried out and based on the technical content of the claim.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 25

Rule 39.1(iii) PCT - Scheme, rules and method for doing business

INTERNATIONAL SEARCH REPORT information on patent family members			International Application No. PCT/US 01/50355	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5711968	A	27-01-1998	AU 691631 B2	21-05-1998
			AU 2822295 A	22-02-1996
			AU 706180 B2	10-06-1999
			AU 7190898 A	13-08-1998
			CA 2195994 A1	08-02-1996
			EP 0772435 A1	14-05-1997
			HU 77136 A2	02-03-1998
			JP 10503198 T	24-03-1998
			NZ 288863 A	26-08-1998
			WO 9603116 A1	08-02-1996
			US 6379701 B1	30-04-2002
			US 6165508 A	26-12-2000
US 5118528	A	02-06-1992	FR 2608988 A1	01-07-1988
			AT 74024 T	15-04-1992
			CA 1292168 A1	19-11-1991
			DE 3777796 D1	30-04-1992
			EP 0275796 A1	27-07-1988
			ES 2031151 T3	01-12-1992
			FR 2634397 A2	26-01-1990
			GR 3004152 T3	31-03-1993
			GR 3018122 T3	29-02-1996
			JP 2739896 B2	15-04-1998
			JP 63240936 A	06-10-1988
			US 5133908 A	28-07-1992
			US 6165508	A
AU 691631 B2	21-05-1998			
AU 2822295 A	22-02-1996			
AU 706180 B2	10-06-1999			
AU 7190898 A	13-08-1998			
CA 2195994 A1	08-02-1996			
EP 0772435 A1	14-05-1997			
HU 77136 A2	02-03-1998			
JP 10503198 T	24-03-1998			
NZ 288863 A	26-08-1998			
WO 9603116 A1	08-02-1996			
US 6379701 B1	30-04-2002			
US 5725804	A	10-03-1998	US 5616311 A	01-04-1997
			US 5308620 A	03-05-1994
			AU 6100296 A	24-12-1996
			CA 2220895 A1	12-12-1996
			EP 0831793 A1	01-04-1998
			JP 11507630 T	06-07-1999
			WO 9639128 A1	12-12-1996
			US 6391343 B1	21-05-2002
			US 2002142046 A1	03-10-2002
			US 5945033 A	31-08-1999
			AT 147976 T	15-02-1997
			DE 69124357 D1	06-03-1997
			DE 69124357 T2	10-07-1997
			DK 495187 T3	11-08-1997
			EP 0495187 A1	22-07-1992
			ES 2097783 T3	16-04-1997
			GR 3022703 T3	31-05-1997
US 4826689	A	02-05-1989	CA 2089075 A1	22-02-1992

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/50355

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4826689	A	US 4997454 A	05-03-1991
		AU 579166 B2	17-11-1988
		AU 4501285 A	22-01-1987
		CA 1282405 A1	02-04-1991
		EP 0169618 A2	29-01-1986
		EP 0544657 A1	09-06-1993
		JP 1973762 C	27-09-1995
		JP 7002209 B	18-01-1995
		JP 62027032 A	05-02-1987
		JP 6501872 T	03-03-1994
		PT 80494 A ,B	22-11-1985
		WO 9203380 A1	05-03-1992
		AT 55921 T	15-09-1990
		DE 3579385 D1	04-10-1990
		ES 8607007 A1	01-11-1986
		IL 75250 A	31-08-1988
		NZ 212151 A	30-08-1988
EP 0251476	A	07-01-1988	
		US 4962091 A	09-10-1990
		AT 85214 T	15-02-1993
		AU 608225 B2	28-03-1991
		AU 7333287 A	26-11-1987
		CA 1293443 A1	24-12-1991
		DE 3783958 D1	18-03-1993
		DE 3783958 T2	09-06-1993
		EP 0251476 A1	07-01-1988
		ES 2039437 T3	01-10-1993
		HK 38997 A	04-04-1997
		JP 2594560 B2	26-03-1997
		JP 63002930 A	07-01-1988
		NZ 220403 A	26-06-1990

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/24	A 6 1 K 37/64	
A 6 1 K 38/27	A 6 1 K 37/26	
A 6 1 K 38/28	A 6 1 K 37/38	
A 6 1 K 38/43	A 6 1 K 37/465	
A 6 1 K 38/46	A 6 1 K 37/66	H
A 6 1 K 38/55	A 6 1 K 37/04	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 37/22	
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4C076 AA29 BB13 CC29 CC30 CC41 FF31 FF36 FF63 GG06
 4C084 AA03 BA44 BA46 DA01 DA12 DA21 DA40 DB02 DB22 DB25
 DB31 DB32 DB34 DB35 DB52 DB53 DB56 DB58 DB59 DB60
 DC01 DC03 DC15 DC16 DC21 DC22 DC32 DC33 DC34 DC35
 MA44 NA03 NA12
 4C085 AA03 AA13 DD71 DD84