

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3708553号
(P3708553)

(45) 発行日 平成17年10月19日(2005.10.19)

(24) 登録日 平成17年8月12日(2005.8.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 9/12

A 6 1 K 9/12

A 6 1 K 9/72

A 6 1 K 9/72

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/26

請求項の数 48 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願平8-531269	(73) 特許権者	597148884
(86) (22) 出願日	平成8年4月15日(1996.4.15)		ネクター セラピューティクス
(65) 公表番号	特表平11-501657		アメリカ合衆国94070カリフォルニア
(43) 公表日	平成11年2月9日(1999.2.9)		州サン・カルロス、インダストリアル・ロ
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/005265		ード150番
(87) 国際公開番号	W01996/032096	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成8年10月17日(1996.10.17)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成10年6月17日(1998.6.17)	(74) 代理人	100086276
審査番号	不服2001-21539(P2001-21539/J1)		弁理士 吉田 維夫
審査請求日	平成13年12月3日(2001.12.3)	(74) 代理人	100082898
(31) 優先権主張番号	08/423, 568		弁理士 西山 雅也
(32) 優先日	平成7年4月14日(1995.4.14)	(72) 発明者	エルジャマル, モハメッド
(33) 優先権主張国	米国(US)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 951
			29, サン ホセ, サラトガ アベニュー
			#206ビー 1255
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 向上した分散性を有する粉末型薬理組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト対象者による吸入に適するスプレードライ式分散性粉末型組成物であって、炭水化物、アミノ酸又はそれらの混合物を含んで成る薬理的に許容される賦形剤、吸入により前記対象者の症状を処置するのに適する活性剤、並びに分散性増強量の生理学的に許容されるポリアラニン、 α -ラクトアルブミン、トリプシノーゲン及びヒト血清アルブミンから成る群から選ばれる水溶性タンパク質を含んで成り、前記生理学的に許容される水溶性タンパク質が1重量%～15重量%の量で存在する、組成物。

【請求項2】

前記賦形剤が50～99.9重量%の量で存在する、請求項1記載の組成物。

10

【請求項3】

前記賦形剤が単糖、二糖、三糖及び多糖から成る群から選ばれる炭水化物である、請求項2記載の組成物。

【請求項4】

前記炭水化物がマンニトールである、請求項3記載の組成物。

【請求項5】

前記賦形剤がグリシン、ロイシンまたはその組合せである、請求項2記載の組成物。

【請求項6】

前記賦形剤が炭水化物とアミノ酸との組合せである、請求項2記載の組成物。

【請求項7】

20

前記賦形剤がグリシンとマンニトールとの組合せである、請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】

前記タンパク質が 1,000 ~ 100,000 の分子量を有する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 9】

前記タンパク質がヒト血清アルブミンである、請求項 8 記載の組成物。

【請求項 10】

前記ヒト血清アルブミンが 2 重量 % ~ 15 重量 % の量で存在する、請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

前記ヒト血清アルブミンが 3 重量 % ~ 5 重量 % の量で存在する、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

前記賦形剤が炭水化物、アミノ酸又はそれらの混合物を含んで成る、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 13】

前記賦形剤がデキストロース、ガラクトース、マンニトール、D - マンノース、ソルビトール及びソルボースから成る群から選ばれる、請求項 3 記載の組成物。

【請求項 14】

前記賦形剤がラクトース、マルトース、スクロース及びトレハロースから成る群から選ばれる二糖を含んで成る、請求項 3 記載の組成物。

【請求項 15】

前記スプレードライ式分散性粉末型組成物が 10 ミクロン未満のサイズを有する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 16】

ヒト対象者による吸入に適し、且つ炭水化物、アミノ酸又はそれらの混合物を含んで成る薬理学的に許容される賦形剤及び吸入治療により対象者の症状を処置するのに適する活性剤を含んで成るスプレードライ式分散性粉末組成物であって、この組成物の改良点が、このスプレードライ式分散性粉末型組成物が分散性増強量の生理学的に許容されるポリアラニン、α - ラクトアルブミン、トリプシノーゲン及びヒト血清アルブミンから成る群から選ばれる水溶性タンパク質を更に含んで成る点にあり、ここで前記生理学的に許容される水溶性タンパク質が 1 重量 % ~ 15 重量 % の量で存在する、組成物。

【請求項 17】

前記賦形剤が 50 ~ 99.9 重量 % の量で存在する、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 18】

前記賦形剤が単糖、二糖、三糖及び多糖から成る群から選ばれる炭水化物である、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 19】

前記炭水化物がマンニトールである、請求項 18 記載の組成物。

【請求項 20】

前記賦形剤がグリシン、ロイシンまたはその組合せである、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 21】

前記賦形剤が炭水化物とアミノ酸との組合せである、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 22】

前記賦形剤がグリシンとマンニトールとの組合せである、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 23】

前記タンパク質が 1,000 ~ 100,000 の分子量を有する、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 24】

前記タンパク質がヒト血清アルブミンである、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 25】

前記ヒト血清アルブミンが 2 重量 % ~ 15 重量 % の量で存在する、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 26】

前記ヒト血清アルブミンが 3 重量 % ~ 5 重量 % の量で存在する、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 27】

前記賦形剤が炭水化物、アミノ酸又はそれらの混合物を含んでなる、請求項16記載の組成物。

【請求項 28】

前記賦形剤がデキストロース、ガラクトース、マンニトール、D-マンノース、ソルビトール及びソルボースから成る群から選ばれる、請求項16記載の組成物。

【請求項 29】

前記賦形剤がラクトース、マルトース、スクロース及びトレハロースから成る群から選ばれる二糖を含んで成る、請求項16記載の組成物。

【請求項 30】

前記賦形剤が非極性アミノ酸である、請求項16又は27記載の組成物。

【請求項 31】

前記賦形剤が極性アミノ酸である、請求項16又は27記載の組成物。

【請求項 32】

前記アミノ酸がアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン及びバリンから成る群から選ばれる、請求項30記載の組成物。

【請求項 33】

前記アミノ酸がアルギニン、ヒスチジン、リジン、シスチン、グリシン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、アスパラギン酸及びグルタミン酸から成る群から選ばれる、請求項31記載の組成物。

【請求項 34】

前記スプレードライ式分散性粉末型組成物が10ミクロン未満のサイズを有する、請求項16記載の組成物。

【請求項 35】

前記改良点が、前記タンパク質が1,000~100,000の分子量を有し、そして2重量%~15重量%の量で存在していることにある、請求項16記載の分散性粉末組成物。

【請求項 36】

前記改良点が、前記タンパク質が3重量%~5重量%の量で存在することにあり、請求項35記載の分散性粉末型組成物。

【請求項 37】

前記改良点が、前記タンパク質がヒト血清アルブミンであることにあり、請求項16記載の分散性粉末型組成物。

【請求項 38】

スプレードライ式分散性粉末型薬理組成物の製造方法であって、炭水化物、アミノ酸又はそれらの混合物を含んで成る薬理的に許容される賦形剤、生理学的に許容されるポリアラニン、α-ラクトアルブミン、トリプシノーゲン及びヒト血清アルブミンから成る群から選ばれる水溶性タンパク質及び吸入により対象者の症状を処置するのに適する活性剤を含んで成る均質な水性混合物をスプレードライし、そして吸入治療によりヒト対象者に投与可能なエアロゾルを調製するのに適当な分散性粉末組成物を獲得することを含んで成り、前記生理学的に許容される水溶性タンパク質が1重量%~15重量%の量で存在する方法。

【請求項 39】

前記タンパク質が1,000~100,000の分子量を有する、請求項38記載の方法。

【請求項 40】

前記賦形剤が、分散性粉末型組成物中の50重量%~99.9重量%の賦形剤を供する量で存在する、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

前記タンパク質が、分散性粉末型組成物中の2重量%~15重量%のタンパク質を供する量で存在する、請求項40記載の方法。

【請求項 42】

10

20

30

40

50

前記タンパク質が、分散性粉末型組成物中の3重量%～5重量%のタンパク質を供する量で存在する、請求項40記載の方法。

【請求項43】

前記タンパク質がヒト血清アルブミンである、請求項39記載の方法。

【請求項44】

前記混合物中の前記タンパク質の存在が、前記スプレードライ式分散性粉末組成物の分散性を、当該タンパク質の非存在下にて調製した組成物の分散性よりも上昇させるのに有効である、請求項38記載の方法。

【請求項45】

前記粉末組成物の分散性を決定する工程を更に含んでなる、請求項38記載の方法。

10

【請求項46】

前記分散性が、(a)粉末組成物をエアロゾル化して、エアロゾル化した粉末を生じさせ、(b)前記エアロゾル化した粉末を集め、(c)工程(b)で集められた前記エアロゾル化した粉末の量を定量することにより決定される、請求項45記載の方法。

【請求項47】

前記活性剤がステロイド、気管支拡張剤、肥満細胞インヒビター、低分子量ポリペプチド、RNA配列及びDNA配列から成る群から選ばれる、請求項1または16記載の組成物。

【請求項48】

前記活性剤がステロイド、気管支拡張剤、肥満細胞インヒビター、低分子量ポリペプチド、RNA配列及びDNA配列から成る群から選ばれる、請求項38記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明の吸入治療のための向上した分散性を示す粉末型薬理組成物、かかる組成物を調製するための方法、並びにかかる組成物を利用して一定の病気状態を処置するための方法に関する。

発明の背景

この数年、一定の薬剤は、ヒトに様々な病状を処置するための経口吸入(肺搬送)用薬剤分散体を形成するのに適当な組成物において販売されている。かかる肺薬剤搬送組成物は患者による薬剤分散体の吸入により分散体内の活性薬剤が肺に達しうるように搬送されるようにデザインされている。肺に搬送すべき一定の薬剤は肺胞領域を介して直接血液循環系へと容易に吸収される。肺搬送は、その他の投与ルートによっては搬送するのが困難なタンパク質及びポリペプチドの搬送にとって特に有望である。かかる肺搬送は肺の病気を処置するための全身搬送及び局所搬送の双方にとって有効でありうる。

30

肺薬剤搬送自体は様々な手法、例えば液体ネブライザ、エアロゾルベース計量投与吸入器(MDI)及びドライ粉末分散器具により達成されうる。エアロゾルベースMDIは色あせており、その理由はそれらがオゾン層に対するその悪影響を理由に禁制品となっているクロロフルオロカーボン(CFC)の利用を頼りとするからである。CFCエアロゾル技術を頼りとしないドライ粉末分散装置はドライ粉末として容易に処方されうる薬剤、特にタンパク質及びポリペプチドを搬送するのに有望出視されている。多くの本来不安定なタンパク質及びポリペプチドは、そのまま、又は適当な粉末担体と組合さって凍結乾燥又はスプレードライ粉末として安定保持されうる。しかしながら、ドライ粉末としてタンパク質及びポリペプチドを搬送する能力は一定の観点において問題がある。数多くのタンパク質及びポリペプチド薬剤の用量は往々にして重要であり、それ故任意のドライ粉末搬送は意図する量の薬剤が正確、精密、且つ確実に搬送されることができなければならない。更に、多くのタンパク質及びポリペプチドはかなり高価であり、一般に一投与ベースで慣用の薬剤よりも数倍高価である。即ち、最少限の薬剤損失でドライ粉末を効率的に搬送する能力は重要である。粉末は適正な分布及び全身吸収を確実にするため、患者による吸入の前に容易に分散性であることも重要である。

40

ドライ粉末薬剤の肺搬送のために極めて有望視されている手法は、加圧ガス源を担うハンドポンプを有する手持式装置を利用する。加圧ガスは粉末分散装置、例えばベンチュリノ

50

ズルを通じて断続的に放出され、そして分散化粉末は患者吸入できるようになる。数多くの観点において有利ではあるが、かかる手持式装置はその他の数多くの観点において問題となる。搬送される粒子はサイズが $10\mu\text{m}$ 以下、通常は $1\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ の範囲であり、粉末の取扱い及び分散性を大型粒子よりも困難なものとする。この問題は、手動式ポンプを利用することで得られる比較的小容量の加圧ガスにより一層悪くなる。特に、ベンチュリ分散装置は、小容量の加圧ガスしか得られないとき、分散しにくい粉末にとって不適切である。手持式及びその他の粉末搬送装置のためのその他の要件が効率的である。ガスボラス中の薬剤の濃度は、総用量に達するのに必要とされる呼吸回数を減らすため、比較的高いことが重要である。適正な分散及び小さい分散容量の双方を達成する能力は有意義な技術的挑戦であり、それは少なくとも粉末組成物の各単位投与物が容易且つ確実に分散することを必要とする。

10

本発明の目的

本発明の目的は当業界公知の組成物よりも向上した分散性を示し、それ故一層確実な薬剤の肺搬送を示す肺搬送に適する薬剤を含む粉末型薬理組成物を提供することにある。

本発明の更なる目的は、正確、精密且つ確実に単位投与形態から一定量の薬剤を供与する肺搬送に適する薬剤を含む粉末型薬理組成物を提供することにある。

本発明の更なる目的は、単位投与形態当り最少限の損失を伴って薬剤の効率的な搬送を示す肺搬送に適する薬剤を含む粉末型薬理組成物の提供にある。

本発明の更なる目的は肺搬送に適する核酸プラスミド（特にカチオン脂質：DNA複合体、又は所望のDNAを有する組換えウィルスベクター）を含む高分散性粉末型薬理剤の提供にある。

20

本発明の更なる目的は肺搬送に適する薬剤を含む粉末型薬理組成物を調製するための方法の提供にあり、この組成物は当業界公知の組成物よりも向上した分散性を示す。

本発明の更なる目的は、吸入、特に経口吸入による処置に感受性である症状を有する対象者を処置するための方法であって、向上した分散性を示す本発明の組成物を投与することを含んで成る方法の提供にある。

本発明の他の目的は本特許出願の全明細書及び請求の範囲を通読することで当業者に明らかとなるであろう。

発明の概要

本発明の一の観点は吸入による対象者への投与に適し、且つ薬理学的に許容される賦形剤、経口吸入による処置に感受性である症状を処置するのに適する治療的有效量の活性剤、及び分散性増強量の薬理学的に許容されるポリペプチド、例えばHSAを含んで成る分散性ドライ粉末組成物である。他方、本発明の観点は、吸入治療に適する現存の粉末型薬理組成物に勝る改良として、その改良が粉末型薬理組成物の中の分散性増強量の薬理学的に許容されるポリペプチドの存在を含んで成る点で、見ることができる。

30

本発明の別の観点は、治療的有效量の本発明の粉末型組成物を、それを必要とするヒト対象者に投与する方法にあり、これは前記粉末型組成物を吸入治療に適する搬送出口、例えばマウスピースを有するチャンバーの中にエアロゾールとして分散せしめ、そして前記対象者にその肺の中に前記分散粉末を好ましくは経口的に吸入させることによる。

本発明の別の観点は呼吸可能な粉末型薬理組成物を調製するための方法の改良にある。（

40

a）水、薬理学的に許容される賦形剤及び吸入により疾患状態を処置するのに適する活性剤を含んで成る均質な水性組成物を形成し、（b）この水性組成物から水を除去して固体を形成し、そして（c）この固体を呼吸可能な粉末型薬理組成物に変換することにより呼吸可能な粉末型薬理組成物を調製するための方法において、本発明の改良は、水溶性の生理学的に許容されるタンパク質（例えばHSA）をこの水性組成物に、得られる呼吸可能な粉末型薬理組成物の分散性を高めるのに十分な量で添加することを含んで成る。

他に、本発明のより詳しい観点は、スプレードライ式の分散性粉末型薬理組成物を調製するための方法であって、水、薬理学的に許容される賦形剤、吸入により疾患状態を処置するのに適する活性剤及び分散性増強量の生理学的に許容される水溶性タンパク質を含んで成る均質な水性混合物を、約 $10\mu\text{m}$ 以下の粒子サイズを有する分散性粉末型薬理組成

50

物を提供するのに十分な条件下でスプレードライすることを含んで成る方法にある。他方、この観点は、水、薬理学的に許容される賦形剤及び吸入により疾患状態を処置するのに適する活性剤を含んで成る均質な水性混合物を分散性粉末が供されるのに十分な条件下でスプレードライすることによりスプレードライ式分散性粉末型薬理組成物を調製する方法における改良として、その向上が水性混合物の中に分散性増強量の生理学的に許容される水溶性タンパク質を含んで成るという点で、見ることができる。

【図面の簡単な説明】

図1は粉末型医薬品を分散するためのシステムの断面図である。

図2は粉末型医薬品を分散するためのシステムについての供給チューブアセンブリーの破断図である。

図3は破壊可能な蓋の上面図である。

図4A、4B及び4Cは粉末型医薬品を分散するための喉アセンブリーの詳細図である。

図5は供給チューブ腔のまわりの高流速ガス管の断面図である。

図6は高流速ガス管の断面図であり、ここでそれらは簡単な円錐形充満室として形成されている。

図7は細胞培養物中の脂質：DNA複合体のトランスフェクション活性を示す。

図8は細胞培養物中の脂質：DNA複合体のトランスフェクション活性を示す。

定義

本発明の様々な観点についての請求の範囲の解釈において、考慮すべきいくつかの重要な定義がある。

「粉末」又は「粉末型」なる語は、比較的易流動性であり、且つ吸入装置の中に分散させることができ、その結果その粒子が肺に到達して肺胞へと浸透することを可能にするように対象者により吸入される細かく分散した固体粒子より成る組成物を意味する。即ち、この粉末は吸入治療により投与可能であり、そして「呼吸可能」であり、且つ肺搬送のために適切である。一般に、その平均粒子サイズは直径約10ミクロン(μm)以下であり、そして粒子形状は不規則、均一又は複合型でありうる。好ましくは、その平均粒子サイズは約 $7.5\mu\text{m}$ 以下であり、そしてより好ましくは約 $5.0\mu\text{m}$ 以下である。通常、その粒子サイズ分布は直径約 $0.1\mu\text{m}$ ～約 $5\mu\text{m}$ 、特に約 $2\mu\text{m}$ ～約 $5\mu\text{m}$ である。

「ドライ」なる語は、粉末組成物が、その粒子が吸入器具の中で容易に分散してエアロゾルを形成するほどの水分含有量を有することを意味する。この水分含有量は一般に約10重量%($\%w$)以下、通常は約 $5\%w$ 以下、そして好ましくは約 $3\%w$ 以下である。

「分散性」なる語は、分散粒子が対象者の肺へと吸引又は吸入されうるほどに粉末組成物がエア一流に分散(即ち、懸濁)される度合いを意味する。例えば、わずか10%分散性である粉末組成物とは、組成物を構成する細かく分割した粒子の全体のわずか10%が肺への経口吸入のために懸濁されうることを意味する；50%分散性とは、全体の50%が懸濁しうることを意味する。分散性の標準的な尺度は以降に記す。

「治療的有効量」は、期待の生理学的応答が供されるように処置すべき対象者に所望レベルの活性剤を供与するのに必要な、粉末組成物の中に存在する活性剤の量をいう。この量はケース毎に各活性剤に関して決定される。ガイドラインを以下に示す。

「生理学的有効量」なる語は所望の軽減又は治療的効果が供されるように対象者に搬送される量をいう。この量は各活性剤及びその最終的に承認される用量レベルに関して特異的である。ガイドラインを以降に示す。

「薬理学的に許容される」とは、賦形剤に関しては、分散性を向上するのに用いられる担体又はタンパク質であろうと、肺に対する有意な有害毒素学的作用抜きで肺へと摂取されうるものを意味する。

詳細な説明及び好適な態様

本発明は、少なくともある程度、吸入により投与可能な呼吸可能な粉末の分散性が、組成物の中に薬理学的に許容される水溶性ポリペプチドを含ませることにより高まることの発見に基づく。吸入搬送のための粉末型薬理組成物の調製において、組成物の一貫して高いレベルの分散性を確保するのは困難である。単位投与体中の高い率の活性剤が対象者の肺

10

20

30

40

50

の中に入るよう高いレベルの分散性を得ることが好都合である。また、吸入当り失われる薬剤が少なくなるように分散性を最大にすることも重要である。例えば、粉末組成物を構成する粒子の50%しか分散しないなら、組成物（それ故活性成分）の50%は分散されず且つ使用されずにいる。このことは、有意な量の損失した活性剤を意味し、そして製造者は十分な活性剤が対象者への搬送のために含まれることを確保するようにこの損失を念頭に置かなければならない。活性剤の値段が高い場合、これは製造業者の有意義な追加費用を意味しうる。本発明は向上した分散性を通じて損失活性成分の問題を解決する。

本発明の組成物

本発明の一観点は吸入、特に経口吸入による対象者への投与に適する分散性ドライ粉末であって、薬理学的に許容される賦形剤、経口吸入による処置に感受性である症状を処置するのに適する治療的に有効な量の活性剤、及び分散増強量の薬理学的に許容されるポリペプチドを含んで成る組成物を提供する。他方、本発明の観点は、現存の吸入治療に適する粉末型薬理組成物に勝る改良として、その改良が粉末型薬理組成物中に分散性増強量の薬理学的に許容されるポリペプチドの存在を含んで成る点で、見ることができる。

薬理学的に許容される賦形剤であるこの向上した組成物の成分には、単独又は組合せにおいて、吸入治療のための有用な賦形剤であることが当業界において公知である任意の標準の炭水化物及びアミノ酸担体が含まれる。これらの賦形剤は一般に比較的易流動性であり、水との接触により増粘したり又は重合したりせず、分散化粉末として吸入されたときに毒索学的に無害であり、そして活性剤の所望の生理学的作用に有害な影響を及ぼすようにこの活性剤と有意に相互作用することがない。この観点において極めて有用な炭水化物賦形剤には単糖及び多糖類が含まれる。代表的な単糖類には炭水化物賦形剤、例えばデキストロース（無水及び一水和物；グルコース及びグルコース一水和物とも呼ばれる）、ガラクトース、マンニトール、D-マンノース、ソルビトール、ソルボース等が含まれる。単糖類は容易に公共的に入手できる；例えばデキストロースはMallinckrodt, Inc., Corn Products Co., CPC (UK) Ltd., 及び/又はその他の如き会社から入手できる。マンニトール及びソルビトールはICI Americas, Inc., McKesson Chemical Co., Merck & Co., Atlas Chemical Industries (UK) Ltd. 及び/又はその他の如き会社から入手できる。代表的な二糖類、例えばラクトース、マントース、スクロース、トレハロース等はMcKesson Chemical Co., Aldrich Chemical Co., Inc., Great Western Sugar Co., 及び/又はその他の如き会社から入手できる。代表的な三糖類には、ラフィノース等であって商業的ソースから容易に入手できるものが含まれる。その他の炭水化物賦形剤にはシクロデキストリン類、例えば2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンが含まれる。

適当なアミノ酸賦形剤には任意の天然アミノ酸であって、標準の薬理学的加工技術のもとで粉末を形成するものが含まれ、そして非極性（疎水性）アミノ酸及び極性（無電荷、正帯電及び負帯電）アミノ酸が含まれ、かかるアミノ酸は薬理学グレードであり、そして一般に米国食品及び薬品局により安全（GRAS）と認定されている。非極性アミノ酸の代表例にはアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン及びバリンが含まれる。極性無荷電アミノ酸の代表例にはシスチン、グリシン、グルタミン、セリン、スレオニン及びチロシンが含まれる。極性正帯電アミノ酸の例にはアルギニン、ヒスチジン及びリジンが含まれる。負帯電アミノ酸の代表例にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。これらのうち、グリシンが好ましい。これらのアミノ酸は一般に薬品級の製品を提供する商業ソース、例えばAldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wisconsin or Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouriより入手できる。

適当な賦形剤には1又は複数種の炭水化物と1又は複数種のアミノ酸との混合物が含まれる。一般に、この組合せは約100：1～約1：100の適当な炭水化物の重量部対適当なアミノ酸の重量部の比を示し得、好ましくはかかる比は約5：1～約1：5、より好ましくは1：1であろう。特に有用なこのタイプの組合せは、マンニトールとグリシンとの組合せである。

本発明の組成物において有用な賦形剤の量は、活性剤を組成物全体に均一に分散させ、そ

10

20

30

40

50

れを必要とする対象者にそれが搬送されたときにそれを均一に分散させるようにする量である。それは、活性剤が所望の有利な軽減又は治療結果を供し、同時に高すぎる濃度で生じうる任意の有害な副作用を最少限にする濃度へと活性剤を希釈することも担わなければならない。即ち、高い生理活性を有する活性成分にとっては、より多くの賦形剤が利用されるであろう。他方、低めの生理活性を示す薬剤にとっては、より少ない賦形剤が利用されるであろう。一般に、この組成物中の賦形剤の量は組成物全体の約50重量%～99.9重量%であろうが、本発明の組成物において利用する活性剤は高い生理活性を一般に有するため、賦形剤の量は95～99.9%であろう。極めて高い生理活性を有する活性剤に関しては、その量は約98.0～約99.9重量%であろう。

活性剤である本組成物の成分には吸入治療によりヒト対象者を処置するのに有用である任意の剤が含まれる。活性剤の投与は、対象者の症状に軽減又は治療効果がある点で、対象者に対して有利な効果を発揮する。即ち、この対象者は気管支ぜん息又は関連のコルチコステロイド応答気管支痙攣状態、花粉症、炎症症状、子宮内膜症、前立腺癌、細菌感染症、ウイルス感染症等に苦しむ。更に、対象者は、遺伝子治療処置のためのDNAもしくはRNA材料の核酸複合体の投与、又はB及びC型肝炎、ヘアリーセル白血病、非A、非B/C慢性肝炎、カポジ肉腫、多発性硬化症、慢性肉芽腫病等の如きインターフェロンによる処置に対して応答性である症状の処置を必要とするであろう症状に苦しむ。即ち、本組成物における使用に適する活性剤のタイプにはステロイド（例えばデキサメタリン、トリアムシノロン、ベクロメタソン、ベクロメタソンジブロピネート、フルオシノロン、フルオシノニド、フルニソリド、フルニソリド半水和物等）、気管支拡張剤（例えばアドレナリン、イソプロテレノール、メタプロテレノール、テルブタリン及びその塩、イソエタリン、アルブテロール及びその塩、ピルブテロール及びその塩、ピトルテレート、等）肥満細胞インヒビター（クロモリンナトリウム等）、抗生物質（例えばペンタミジン）、低分子量ポリペプチド、例えばLHRH及びその誘導体（LHRH、ナファレリン、ゴセレリン、ロイプロリド等）、高分子量、ポリペプチド、例えばインターフェロン又はrhu IL-1レセプター等が含まれる。また、遺伝子治療に有用であるRNA又はDNA配列である活性成分を本発明の組成物の一部として使用してよい。一般に本組成物の中に存在する活性成分の量は約0.1～約50重量%、好ましくは約0.1～約5重量%、そして最も好ましくは約0.1～約2重量%であろう。

遺伝子治療を供与するのに有用な本発明の組成物において、この活性成分は肺への投与により細胞レベルにおいて組込まれうる適当な核酸複合体（即ち、RNA又はDNA配列）である。一般に、この核酸複合体は細胞レベルにおいてトランスフェクションを促進する適当なカチオン脂質小胞と結合した又は細胞レベルにおいてトランスフェクションを促進する適当な複製欠損組換えウイルスの中にあるDNAである。代表的なDNAプラスミドにはpCMV β （Genzyme Corp., Framingham, MAより入手可能）、pCMV- β -gal（酵素 β -ガラクトシダーゼをコードする、E.コリ（E. coli）Lac-Z遺伝子に連結した（MVプロモーター）が含まれる。トランスフェクションを促進する代表的な脂質にはDMRIE（ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウム）、DOPE（ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）、DOTMA（N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド）等が含まれる。かかる脂質は単独で、又は組合せで、例えばDOTMAとDOPE又はDMRIEとDOPEとの組合せで使用できる。核酸/脂質組合せは以降に説明する方法により調製される。より詳細な説明を実施例3に示す。代表的な複製欠陥トランスフェクションウイルスにはアデノウイルスAd2-CMV-LacZ2（Genzyme Corp., Framingham, MA）が含まれる。

DOTMAはPhillip L. Felgnerらによる論文「Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure」Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417, 1987年11月、Biochemistryに記載されている。このリポソーム調製法はその論文の中で、本発明において有用なDNAに適するように調節できる脂質-DNA複合体を調製するための一般的な方法として記載されている。商業的にはLIPOFECTN（商標）と称されているDOTMAはBethesda Research Laboratories (BRL), Bethesda, Marylandより入手できる。DMRIE

10

20

30

40

50

及びDOPEはVical Corporation, San Diego, Californiaより入手できる。

本発明の組成物、方法及び工程において有用であり、且つ向上した分散性を供する分散剤は薬理的に許容される水溶性ポリペプチドである。この用途の目的のため、ポリペプチドは天然タンパク質及び人工構築型ポリペプチドであって個々のアミノ酸単位が標準のペプチドアミド結合（一方のカルボキシル基と他方のアミノ基）を介して連結し合っているものの双方を包括することを意味する。分散性はそれを必要とする患者の肺に摂取されるが、使用レベルでは有害な毒素学的効果を及ぼさないであろうものである。分散性は不活性剤であることが好ましいが、それ自体の所定の固有活性を有し得る分散剤も、その活性が組成物全体の有用性と対照的でない限り、含むことが本発明の一部である。この分散剤は約1,000～約200,000の分子量を有することを特徴とする。

10

本文脈における分子量は標準の辞書的定義であり、それは分子内の全原子の原子量の合計である。これは式量とも呼ばれる。タンパク質に関し、分子量は、それを測定するのに用いた方法により若干変動しうる。利用できる方法は当業界に周知であり、そして化学的組成、数平均又は重量平均法に基づきうる。これにはアミノ酸分析、浸透圧測定、沈降分析、光散乱、分子包含クロマトグラフィー又はSDSゲル電気泳動が含まれる（例えば、「Biochemistry」の第7章、Albert L. Lehninger、第2版1975、Worth Publishers Inc.発行を参照のこと）。その他も利用できうる。これらの方法の結果の間には変動がありうるが、それらは一般にささいである。

低分子量を有する剤の例は約1000の分子量を有するポリアラニンである。その分子量範囲にあり、生理学的に許容されるが不活性であるその他のポリペプチドも調製できうる。約3000～6000の範囲の分子量を有する分子も有用である。それ自体の固有の活性を有する材料を使用するなら、それはその固有活性が活性剤の活性に悪く妨害しないレベルで使用する。本発明において有用なその他の代表的なタンパク質には α -ラクトアルブミン、即ち約14,200の分子量を有する牛乳の構成成分が含まれる。その他の代表的な分散剤はトリプシノーゲンであり、それは約24,000の分子量を有する。特に好適な分散剤はヒト血清アルブミン（HSA）であり、これは約69,000の分子量を有する。（その値はMerck Index第11版では約69,000、Lehninger第2版では68,500と表示されている）。好ましくは、タンパク質分散剤の分子量は約1,000～約100,000、特に約1,000～約70,000、そしてより詳しくは約69,000、即ち、HSAである。

20

本発明の組成物の中に存在する分散剤の量は約1～約15重量%、好ましくは約3～約8重量%、そしてより好ましくは約3～約5重量%で変動しうる。

30

炭水化物、アミノ酸又はその混合物の賦形剤、活性剤及びタンパク質分散剤に加えて、本発明の組成物はその組成物を安定化するのに又はその搬送のもとなる単位投与体と一層混和性となるように使用できうるその他の薬理的に許容される賦形剤を含みうる。かかる賦形剤には例えばバッファー、例えばクエン酸塩、リン酸塩又は酢酸塩が含まれる。

本発明の組成物は、それを必要とする対象者による吸入により所望の生理的作用を供するのに十分であろう量を含む単位投与受け器から搬送されるであろう。その量は、単位投与受け器に由来する粉末分散体の実質的に全てを捕獲するのに十分な内部容量を有するチャンバー内に分散されるであろう。通常、チャンバーの容量は約50ml～約1,000ml、好ましくは約100ml～約750mlであろう。即ち、この単位投与量は、単位投与当り約2mgの粉末から約20mgの粉末、好ましくは約4mg～約10mgの粉末であろう。単位投与当り約5mgがかなり有効である。好適な単位投与受け器はプリスターパックであり、一般に一式のプリスターパックストリップとして提供される。かかるプリスターパック又はプリスターパックストリップを調製するための一般方法はRemington's Pharmaceutical Sciences（第18版）又はその他の類似の開公物により当業者に一般に公知となっている。本発明の粉末の必要量に合うかかる投与形態受け器の容量は約1ml～約30ml、好ましくは約2ml～約10mlであろう。

40

本発明の組成物の投与

本発明の別の観点では、治療的有効量の本発明の粉末型組成物をそれを必要とするヒト対象者に投与する方法であり、これは前記粉末型組成物を吸入治療に適する搬送出口、例えば

50

マウスピースを有するチャンバーの中にエアロゾールとして分散させ、次いで前記分散化粉末を対象者の肺に好ましくは経口的に吸入させることによる。一般にこれは1994年9月21日出願の米国特許出願第08/309,691号、発明の名称「Method and Apparatus For Dispersion of Dry Powdered Medicaments」Smith, Burr, Etter, Axford, Lyons and Platzに記載の方法及び装置により成し遂げられる。この出願の内容は引用することで本明細書に組入れる。本発明の方法の実施のために有用な装置の更なる説明は米国特許出願第07/910,048号及び第08/207/472号に見い出され、双方とも引用することで本明細書に組入れる。一般に、この方法はアクセス表面を有する単位投与受け器の中に収容された本発明の粉末型組成物のエアロゾール化を含んで成り、ここでエアロゾール化は、アクセス表面の貫通を通じて供給チューブの粉末入口端を挿入し、そしてこの受け器の中の粉末の実質的に全

10

てが流動化し、そしてガス流の中に分散してチャンバーの中でエアロゾールが形成されるように供給チューブの出口端を通る高流速ガス流をこの供給チューブにわたって軸状に流すことで成し遂げられる。更なる詳細は前記特許出願第309,691号を通読し、且つ以降に記載の装置を利用することにより得られうる。実際には、本発明の粉末型組成物の好適な単位用量約4mg～約10mgを以下に記載の条件にかけて粉末をエアロゾール化し、好ましくは約100ml～750mlの適当なチャンバーの中で定常雲（standing cloud）又はエアロゾール分散体ができるようにし、その後対象者はこの分散体をその対象者の肺へと経口吸入する。

本発明の組成物を調製するための方法

本発明の別の観点では呼吸可能な粉末型薬理組成物を調製するための方法における向上である。（a）水、薬理学的に許容される賦形剤及び吸入により疾患状態を処置するのに適当な活性剤を含んで成る均質な水性組成物を形成し、（b）この水性組成物から水を除去して固体を形成し、そして（c）この固体を呼吸可能な粉末型薬理組成物に変換することにより呼吸可能な粉末型薬理組成物を調製する方法において、本発明の改良は水性溶性の生理学的に許容されるタンパク質をこの水性組成物の中にこの呼吸可能な粉末型薬理組成物の分散性が高まるのに十分な量で添加することを含んで成る。

20

即ち、水を除去及び粉末型薬理組成物を形成する前に水溶性の生理学的に許容されるタンパク質を水性組成物に添加する改良は、本発明の分散性粉末型組成物を作るのに利用する任意の方法に適用できうる。例えば、この改良は、水性組成物を水が除去できるように標準の凍結乾燥条件下で凍結乾燥し、そして得られる固体組成物を、その固体を何らかの方法、例えばボールミリング又はジェットミリングにより碎いて吸入可能且つ経口吸入治療に適する粒子サイズを得ることで呼吸可能な粉末型薬理組成物へと変換する方法に適用される。一般に、この粒子サイズは10ミクロン以下、好ましくは5ミクロン以下であろう。他方、この改良は分散性粉末型薬理組成物を形成するように水性組成物をスプレードライする方法に同等に適用できる。

30

水性混合物の成分は前記に定義且つ記載され、そして得られる呼吸可能な薬理組成物において所望される相対量も前記してある。

当業界の方法における利用のための水性混合物の調製及び本発明の一部である改良において、溶液又は安定懸濁物を、適当な賦形剤、活性剤及び生理学的に許容される水溶性タンパク質を水の中に溶解又は懸濁することにより形成する。成分を添加する順序は重要な意義がなく、そして均質混合物が溶液又は懸濁物でありうるとき、溶液が好ましい。水性混合物中の成分の比は得られる粉末型組成物において所望される比と一致する。一般に、材料の濃度を以下の表に示す。

40

表 1

適切な水性組成物

	範 囲	好適範囲	
	mg/100ml	mg/100ml	
賦形剤	15～700	500～700	
活性剤	15～700	15～200	10
タンパク質	7.5～110	20～40	

通常、水の凍結点よりは高いが、活性剤の活性又は本発明の改良の一部である水溶性タンパク質の安定性に有害な影響を及ぼすであろう濃度で水性混合物を調製することが十分である。一般に、この温度は約20～30、好ましくは周囲温度であろう。溶液のpHは活性剤及びタンパク質の所望の安定性に適するであろう適当な緩衝剤を含ませることにより調整できうる。このpHは一般に約pH6～8の中性範囲、好ましくは約7であろう。適当な緩衝組成物にはクエン酸ベースバッファー、リン酸ベースバッファー又は酢酸ベースバッファーが含まれうる。溶液ではなく、混合物の安定性又は懸濁性を高めるであろうその他の賦形剤を水性組成物の中に含ませてよい。一般に、この水性溶液は適当な濃度の材料を水の中に、その材料が全て水の中に溶解又は分散し、且つ懸濁するまで攪拌しながら混合することにより簡単に形成できる。

前述の通り、本発明の改良は、溶液又は懸濁物を形成し、そして得られる固体を粉末型組成物に変換する方法に適用される。水の除去及び粉末に至る変換は、この二工程を同時に行えるようにするスプレードライ環境において実施するか、又は二段工程、例えば水溶性タンパク質又は活性成分に有害な影響を及ぼすことがないであろう条件下での水のエバポレーション、その後の活性成分又はタンパク質の効力に同様に有害な影響を及ぼすことがないであろう条件下での破碎により行ってよい。もし二段工程を採用するなら、一般に活性成分に対する任意の有害な作用を最少限にするため、この水性組成物を凍結乾燥するのが好ましい。凍結乾燥は凍結後に組成物から水を昇華させるフリーズドライ工程である。凍結乾燥工程の特定の利点は、水性溶液内で比較的不安定である生物因子及び薬剤が高温でなく乾燥でき（それ故、有害な熱的作用を排除する）、そして安定性の問題がほとんどない乾燥状態で保存できることにある。材料を破碎することを決断したら、それは、適切でしかも材料の活性を保持するであろう任意の状況で行ってよい。一般に破碎又は粒子サイズ縮小は、凍結乾燥により得られる固体を経口投与に適するサイズまで縮小するであろう多種多様な操作を包括する。一般に粒子サイズは肺で摂取されるため且つ有効となるため、10ミクロン以下である必要があるであろう。破碎は段階式に行ってよく、そして本工程について当業界に公知の任意の方法を利用して行える。例はRemington's Pharmaceutical Sciences第18版の第18章、pp1615-1632に示されている。

他に、より詳しくは、本発明の観点はスプレードライ式分散性粉末型薬理組成物を調製するための方法であり、この方法は、水、薬理学的に許容される賦形剤、吸入により疾患状態を処置するのに適する活性剤及び分散性増強量の生理学的に許容される水溶性タンパク質を含んで成る均質な水性混合物を、約10ミクロン以下の粒子サイズを有する分散性粉末型薬理組成物が供されるのに十分な条件下でスプレードライすることを含んで成る。他方、この観点は、水、薬理学的に許容される賦形剤及び吸入により疾患状態を処置するのに適する活性剤を含んで成る均質な水性混合物を分散性粉末が供されるのに十分な条件下でスプレードライすることによりスプレードライ式分散性粉末型薬理組成物を製造する方法における改良として見ることができ、ここでこの改良は分散増強量の生理学的に許容される水溶性タンパク質を水性混合物の中に含ませることを含んで成る。

一般に、本発明の組成物はスプレードライヤーの利用を通じて調製するのが好ましい。こ

10

20

30

40

50

の方法は一般に、上記に定義した水性組成物である高分散型液体と、十分な容量の温風とを一緒にしてエバポレーション及び液滴の乾燥が起こるようにすることより成る。供給液は供給物が噴霧化されることを条件に、溶液、スラリー、エマルジョン、ゲル又はペーストであってよい。好ましくは溶液を採用する。一般に、供給物を濾過温風流の中にスプレーし、その温風流は水を蒸発させ、そして乾燥製品をコレクターへと運ぶ。使用済みのエアから水分を追いつく。一方、一般に、得られるスプレードライ式粉末型粒子は均質であり、ほぼ球形であり、サイズがほぼ均一であり、そして往々にして中空であり、本発明の改良は形状が一層不規則的な粒子の混合物をもたらす。ある状況ではこの不規則性は本発明の組成物の高い分散性を担いうる。スプレードライの更なる論述はRemingtonの第89章、pp1646-47に見い出せう。本発明の方法によって190の系列番号を有するBuchi 10
スプレードライヤー装置が極めてよいことがわかった。一般に、このスプレードライ装置の入口温度及び出口温度は重要ではないが、所望の粒子サイズを供し、且つ所望の活性剤活性を有する製品を供するようなレベルであろう。入口温度は従って80 ~ 約150 の温度であり、そして出口温度は約50 ~ 約100 の温度であってよい。好ましくは、これらの温度は、入口については90 ~ 120 、そして出口については60 ~ 90 であろう。このスプレードライ装置において利用する流速は1分当たり約3 mlから1分当たり約5 mlであろう。アトマイザーの風速は700LPH (1時間当りのリットル数) ~ 約800LPHの値で変動するであろう。二次的なドライイングは必要ではないが、利用してよい。

上記の一般方法教示に従うことにより、組成物であって呼吸可能であり、且つそれを必要とする対象者への肺搬送に適する所望の粒子サイズ及び分散特性を有するものを得ることができう。一般に、この平均粒子サイズは直径的10ミクロン以下であり、粒子の形状は不規則、均一又は形状の複合である。好ましくは、平均粒子サイズは直径約7.5ミクロン以下、そしてより好ましくは約5ミクロン以下である。通常、粒子サイズ分布は約0.1ミクロン ~ 約5ミクロン、特に約2ミクロン ~ 約5ミクロンである。 20

本発明の粉末組成物の粒子サイズ分布 (PSD) はHoriba CAPA-700遠心沈降粒子サイズ分析器を利用して測定される。通常、測定はSedisperse A-11 (Micromeritics, Norcross, GA) 約5 mlに懸濁し、そして分析前に軽く音波処理した約5 mgの粉末に基づいて行う。この装置は直径0.40 ~ 10 μ mの粒子サイズ範囲を測定するように形状化され、そして遠心は2000rpmで行われる。粉末の粒子サイズ分布は質量中央直径 (MMD) により特性決定され、そして5.2 μ m以下のMMDを有する粒子の比率が決定される。得られる値は2回の反復測定値 30
の平均とする。一般に、本発明の粉末組成物は2 ~ 3ミクロンの平均粒子サイズ分布を示す。5 μ m以下のサイズの粒子が全身循環のために深肺へと搬送されう。

分散性の決定

その他の組成物との対比として本発明の組成物の分散性を決定するため、粉末組成物をエアロゾル化し、エアロゾル化組成物を集め、そして以降に記載の装置及び手順を利用して搬送された材料を測定することにより単位投与形態の搬送用量を定量する標準試験が利用できる。

高レベルの分散性は本発明の組成物の高い比率の搬送用量に結びつく。搬送用量は粉末型組成物の効果の重要なパラメーターである。これは (1) 試験粉末を投与受け器、例えばブリスターパッケージから抽出する; (2) この粉末をエアロゾルチャンバーの中で微粒子の「定常雲」へとエアロゾル化する; (3) この微粒子を試験吸入の際に装置のマウスピースを通じて搬送する; ドライ粉末肺吸入装置により搬送される組成物の効率性の尺度である。試験した各方式により搬送される用量は一般に下記の通り、約5 mgの粉末で充満させた単一のブリスターパックを載せた装置を利用して決定する。この装置を作動させ、粉末を装置のエアロゾルチャンバーの中に懸濁する。微粒子の「定常雲」をチャンバーから30 L/minの風速で2.5秒間吹き出させ (1.25 Lの吸引容量)、そしてサンプルを適当なフィルター上に集める。0.65 μ mの孔径を有するポリビニルフルオリド膜フィルターが極めて有用である。サンプリングエアフローパターンは自動タイマーによりコントロールし、そして患者の深呼吸をシュミレートするように作動させる。全効率性 (搬送用量) 及び作動後にブリスターパックの中に残っている粉末のパーセンテージは、フィルター 40
50

上の粉末及びブリスターパックの中に残った粉末の量を秤量することにより動的に測定する。この方法は以下の通りに図式化できうる。

ブリスター
パッケージ内
の 5 mg の粉末

→ 装置により
チャンバーの
中へと懸濁

→ フィルター
上に「吸入」

→ フィルター
を秤量

ブリスター内

装置内

フィルター上

残留 ____ %

残留 ____ %

集まった ____ %

分散性の計算は下記の通りである：

10

- 1．単位投与体の粉末型組成物の総重量（例えば 5 mg のブリスターパック）。
- 2．単位投与体中の中でエアロゾル化した及びフィルター上で集めた粉末型組成物の総質量。
- 3．分散性は、フィルター上で集めた粉末の質量をブリスター内の粉末の質量で除して % で表示したものと定義する（例えば、 $2.5 \div 5 = 50\%$ ）

分散性の決定において利用するのに適当な装置（ささいな変更を伴う）は 1993 年 1 月 21 日公開の国際特許出願 W093/00951「Method and Device For Aerosolized Medicaments」John S. Patton に記載されている。この出願の内容は引用することで本明細書に組入れる。

分散性は以下に記載のシステム又は上記 W093/00951 号公開に記載の装置の一部と以下に記載のシステムとの組合せを含みうるシステムを利用して決定する。各システムは本発明の組成物を必要とする対象者にそれを投与するのにも適用される。

20

図 1 を参照すると、多数の受け器 12 から粉末医薬品を分散するためのシステム 10 が記載してある。示している通り、受け器 12 は破壊可能な蓋又はアクセス表面、一般には金属ホイール又はその他の慣用のラミネートで覆われた個々のウェルを含んで成る連続ウェブとなっている。各受け器は搬送すべき正確な用量の粉末型医薬品を含むであろう。各別の受け器の中の粉末の量は通常約 2 mg ~ 20 mg、より通常は 4 mg ~ 10 mg の範囲、好ましくは約 5 mg であろう。かかる「ブリスターパックストリップ」の製造は薬品包装業界において周知であり、従って更なる説明を要しない。

カートリッジ 22 と一緒に示しているが、この粉末分散システムは一個の受け器のみを担持する単一投与パッケージを受容するように構築されていてもよい。かかる場合、使用者は受け器が供給チューブ 16 に対して適切な方向となるようにパッケージを挿入するであろう。受け器のアクセス表面の中の必須の穴は挿入前に手動式で設けるか、又は予め設けておき、カバーを剥すことにより露出させてもよい。多数の受け器パッケージを設けてもよく、この場合パッケージを様々な配置で装置の中に挿入し、個々の受け器をフィードチューブに選択的に曝露させる。使用者が各時の使用前に単一の受け器を挿入する際、様々なデザインのオプションが有効である。

30

システム 10 は入口端 16 と出口端 18 とを有する供給チューブ 14 を更に含んで成る。加圧ガス源 20 もベース容器 11 の中に設けられており、そして高流速ガス流を供するように供給チューブ 14 に接続されている。これは図 2 との関連でより詳細に説明する。

受け器 12 はベース容器 11 の中で、供給チューブ 14 の入口端 16 に対して往復運動するように備っている。好ましくは、受け器 12 のストリップはベース容器 11 の中に往復運動式に設けられたカートリッジ 22 の中に備っており、一方供給チューブ 14 はベース容器内に固定装着されている。これにより、受け器 12 はカートリッジ 22 内の流動化箇所（供給チューブ 14 の入口端 16 により規定）を順々に通過でき、分散又は流動化箇所にある受け器は供給チューブの入口端 6 に近づき、以降に詳細の通り、その粉末内容物は空となる。カートリッジの往復運動及びカートリッジ内の受け器 12 の進行は使用者により手動式に成し遂げられうる。他方、カートリッジ 22 の往復及び受け器 12 のストリップの進行を同時にするためのメカニズムをベース容器 11 の中に、手動式進行メカニズムの一部として又は電動もしくはバッテリー動力メカニズムとして設けてよい。

40

貫通穴はパンチメカニズム 24 により受け器 12 のストリップの蓋の中に形成されるであろう

50

。示している通り、パンチメカニズム24はベース容器11内に固定装着され、そして図1の破線17で示しているように、カートリッジ22が往復運動するとき、受け器12の破壊可能な蓋92(図3)と接触して突き刺すように配備された多数の鋭利な突き刺し要素26を含むであろう。パンチメカニズム24は、供給チューブ14のステーション前方に配置された受け器12と接触するように配置されているであろう。そこで、各受け器12は流動化箇所へと進む直前で穴あけされるであろう。

多種多様なメカニズムが、各受け器の蓋の中に穴をあけるため及び受け器を供給チューブ14に接近させるために備わりうるということが明らかであろう。例えば、カートリッジ22はベース容器11内に固定され、一方各供給チューブ14及びパンチメカニズム24は一緒に又は独立して往復運動しうる。他方、供給チューブ14の入口端16は自己穴あけ式となる形状をとってよい。後者の場合、所望の突き刺しパターンが、入口端が受け器の内部に挿入されるのと同時に受け器12の破壊可能な蓋の中に成形されているであろう。本発明は利用できる任意の特定の穴あけ及び進行メカニズムに制約されない。

ガス源20は、粉末を受け器12から引き出し、そしてその粉末を流動ガス流へと分散させるため、大量の高圧エア―又はその他のガスを供給チューブ14へと供与するであろう。このガス源は比較的高圧で、通常は高周波流(sonic flow)が出口端18から供給チューブ14へと通るのに十分な圧力、一般には15psig以上、そして好ましくは20psig~100psigの範囲でガスを供給するであろう。ガス源20により供給される高圧ガスの容量(これは貯蔵エネルギー量に直接比例する)は、供給チューブを通過し、その後流動化エア―を受け器に導入して期待の重量の粉末型医薬品流動化させて受け器から抽出するエア―を運ぶのに十分なものとし、一般には約2ml~100ml(標準温度及び圧力で測定)、通常は約3ml~25mlの範囲であろう。高圧ガスを供給チューブ14の出口端18へと流動させる特異的な手法は図2との関連で詳細に示す。

ガス源20は手動式ポンプ、電動式ポンプ、高圧ガスシリンダー等の形態であってよい。手持式粉末分散装置の中の手動式ポンプの構造は特許及び技術的文献に記載してある。例えばW090/07351号を参照のこと。電動式ガスポンプ、ガスシリンダー供給源及び二流動系の構造は当業者に周知である。例えばW093/00951号を参照のこと。

ガス分散システム10は更に、チューブから放出された粉末を捕獲するため、供給チューブ14の出口端18の上に配置されたブルーム(きのこ型)捕獲チャンパー30を含む。ブルームチャンパー30はその末梢端においてマウスピース32を含み、そして供給チューブ14から搬送される粉末分散体の実質的に全てを捕獲するのに十分な内容積を有するであろう。通常、この容量は50ml~1000ml、好ましくは100ml~750mlの範囲であろう。チャンパー30は外気入口(図示せず)、一般には同時係属出願第07/910,048号に記載の接線方向入口も含むであろう。その開示内容は引用することで本明細書に組入れる。マウスピース32には、フランジ36及び出口ライン38を示している。適当なる紙35をフランジの中に、マウスピース32と出口ライン36との間に挿入する。

もしこの装置をヒト対象者への投与のために使用するなら、対象者は単にマウスピース32をその者の口に入れ、そしてエアロゾルが形成されたらチャンパー30の内容物を吸引するだけでよい。

実際には、分散性を測定するため、粉末分散体を、矢印34に示すように、ブルーム捕獲チャンパー30の中に導入する。真空を出口ライン38に引き、マウスピース32及びフィルター35を通じてエア―及び分散粒子をブルームチャンパーに導入し、そして任意的に供給チューブ14の中の管状ルーメンを通じて戻す。これは矢印36で示し、図2でより詳細に記載してある。流動化ガスとしてのブルーム捕獲チャンパー30由来のエア―のかかる再循環はシステムに導入する新たなガスの総容積を大いに削減する。唯一の新たに導入するガスはガス源20に由来するであろう。受け器12の全内容物が分散し、そしてブルームチャンパー30内で分散して捕獲されたら(マウスピースは任意的に漏れを防ぐために逆流防止弁を有するであろう)、その真空はマウスピース32及びフィルター35を通じる全体的なエアロゾル化用量をもたらし、そして存在しうる任意の残留医薬品を掃き出すためにチャンパーに外気を導入するよう吸引し続けるであろう。この場合は利用される特に有用なフィルター

10

20

30

40

50

35は、Milapore Manufacturing Companyより入手でき、そしてDURAPORE（カタログ番号DV PP047000）の商品名をもつポリビニルフルオリド（PVDF）の0.65ミクロンの孔径を有する直径47mmの低タンパク質結合性フィルターである。このフィルター35をカスタムフィルターホルダーの中に保持し、そしてライン38を真空源につなげる。濾紙をMetler AT 261バランス又は同等品を用い、2 mlのポリプロピレンチューブの中で秤量する。微粒子の定常雲をフィルターを通じてブルームチャンバーから引き出し、流速パターンは自動タイマー（Eagle Model CX300）によりコントロールしておく。

図2に関し、供給チューブアセンブリ14は入口16をその末梢端に規定する内管部材40と、チャンバー30から受け器12へとエアーを戻す管状ルーメン44で規定する外部同心円部材42とを含む。これは以下により詳細に説明する。

内管部材40のルーメン46は入口端16から通路又はくびれが形成されている出口端18へと広がる。この通路又はくびれは供給チューブアセンブリ14の作動のためには必要でないが、以降により詳細に説明する通り、供給チューブの性能特性を決定するのはルーメン46の出口の直径及び面積である（この場合、くびれにより規定される）。ガス源20由来の分散ガスは管状充気室52に接続されたポート50を介して供給チューブアセンブリ14に入る。管状充気室52は、内管部材40のルーメン46により規定される流路へと収束ガス流を導き入れる一対のガス管54に接続されている。ガス管54が向いている角度は、ルーメン46を流れる粉末流において誘導される流速の程度と粉末が出口端18から膨張区画58へと通過する際にその粉末中の凝塊物を破壊する剪断力の程度との適正なバランスを供する。

供給チューブルルーメン46の通路18の直径D1（図4A）は一般に2 mm～7 mmの範囲、好ましくは3 mm～5 mmの範囲であろう。例示の態様において、ルーメン46の上流部の直径D2はD1より大きく、一般に2.5 mm～10 mmである。しかしながら、ルーメン46はその全長に沿って出口端直径D1と等しい均一な直径を有しうが、かかる構造はあまり好ましくない。

出口端18は膨張又は拡散区画58に通じており、それは0.5～10 cm、好ましくは1 cm～5 cmの範囲の長さLを有する。長さL2の均一な直径D3を有する分散領域60が出口端18に直接設けられている。直径D3は出口直径D1より若干大きい、そうである必要はない。典型的な直径D3は一般に2 mm～10 mmの範囲である。長さL2は1 mm～10 mmの範囲である。

例示の態様において、図4Bに示すように、一対のガス管54が示されている。3又は4個の別々の入口54を設けることも可能であろう：図4Cに示す。図6に関して説明するように、連続管状開口部を含むその他の形態も有用であろう。

図5に関し、高流速ガス管52が供給チューブルルーメンの通路のまわりに角度 α_1 α_2 で配備され、その角度は通常等しい必要はないであろう。角度 α は受け器からの粉末の適正な全移動及び粉末が導管72の出口オリフィスのすぐ下流の分散領域に入る際の適正な凝集物破壊を達成するために重要である。角度 α は40°～80°の範囲、好ましくは45°～70°であろう。

図5に示すように、高流速ガスルーメン72は、図6に示すような管状開口部82で終結する単一円錐充気室80として形成されていてよい。収束 α の角度は一般に表1における α_1 について記載した範囲内にあり、そして管状ルーメン82の総面積は、これも表1に示しているように、高流速ガスルーメンA₁についての総面積内であろう。一般に、円錐充気室80は約0.05 mm～0.1 mmの範囲内の幅Wを有するであろう。

図2にもどると、供給チューブアセンブリ14は内管部材40の入口端16を、受け器12の上のアクセス表面92の中に設けられた中央開口部90（図3）の中に挿入することにより作動する。中央開口部90は間隔を置いて配備された開口部94（通常は6個）で囲まれ、それらの開口部は粉末が内管部材40を通じて引き出される際の流動化及び排除エアーの侵入を可能にする。本発明の好適な観点において、流動化エアーの少なくとも一部をブルームチャンバー30の内部の底にあるポート96を介して管状ルーメン44を通じて戻されるであろう。ブルームチャンバー30由来のエアー又はガスのかかる逆流は管状充気室98を通してポート96から管状ルーメン44に行く。任意的に、ゴムフランジ又はスカート（図示せず）がルー

10

20

30

40

50

メン44から受け器12に至る逆流の損失を防ぐために設けられてよい。ブルームチャンバー30からの移動エアーの移動はブルームチャンバー内の分散化粉末のブルームを含み、なぜならそれはチャンバー中のマウスピース又はその他の開口部を通じて排出されるエアーの量を制約するからである。

受け器12への供給チューブアセンブリ14の内部部材40の入口端16の導入は極めて有利であり、なぜならこれは受け器の内部からの粉末の実質的に完全な除去を促進するからである。かかる完全な除去は間隔を置いて配備された開口部94を通じる移動エアーの侵入により更に高まり、ここでこの開口部は粉末を受け器の全ての角から分散ルーメン46へと掃き出すことのできるエアーフローを作り出す。

以上にて本発明を理解し易さの目的で具体例及び例示により若干詳細に説明したが、一定の変更及び改良が請求の範囲内で実施できることが明らかであろう。

分散性の決定のためのサンプルの調製において、その決定を行うのに一定の材料及び装置が必要である。標準品としての、測定すべき組成物の単位投与形態を有するサンプルプリスターパッケージを獲得し、そして対比すべき粉末型組成物を含む同種のプリスターパッケージを用意する。

この組成物の分散性を決定するため、適当なはかりの上でクリーンフィルターを秤量し、そしてフィルターをしっかりと固定するためにフィルターフランジ35（又はハウジング）に入れる。フローメーターによりエアーの流速を適当に調整した後、適当な間隔、一般には5秒間隔でタイマーを設定し、そしてフィルターハウジング内のフィルターをこの装置のエアロゾールチャンバー内のホルダーに取り付ける。プリスターパックに穴をあけ、そして露出したプリスターパックを装置に載せる。この装置を設定時間作動させ、真空を引き、そしてこの工程を1又は2回繰り返してフィルター上に数回吹き付けた分散化粉末を集める。その後、フィルターハウジングを分解し、フィルターを再生し、そして秤量してフィルター上に集まった材料の量を決定する。分散性の計算値は以降に示す。

以下の調製例及び実施例は本発明の代表的な観点の詳細を更に説明するために示し、本発明を何ら限定するものでもない。

調製例 1

この調製例には、炭水化物賦形剤であるマンニトール、及び細胞のトランスフェクションにおいて使用するのに適するカチオン脂質、即ちDOTMAとDOPEとの組合せの組成物を調製するための方法が記載してある。分散特性を分散性を向上させるための、適当な生理学的に許容されるタンパク質抜きで調製したリボソーム/マンニトール組成物。

DOTMA : DOPE (重量で 1 : 1 - Megabios Co.由来) を含んで成る 25 μ mole (33mg) のカチオン脂質及び675mgのマンニトールを100mlの脱イオン水に溶かした。得られる溶液を以下のスプレードライパラメーターを利用し、Buchi - 190スプレーを用いてスプレードライ式粉末へと加工した。

溶液供給率 5.8ml / min

入口 / 出口温度 137 / 73

アトマイザーエアー流速 800LPH

* LPH = 時間当りのリットル数

粉末収率は理論値の6%であり、そして得られる粉末は、その分散性を測定するには粘性でありすぎた。

調製例 2

本説明には、本組成物中の核酸複合体で細胞がトランスフェクション（サイトフェクション）されるかどうかを決定するのに有用な標準in vitroアッセイが記載してある。トランスフェクションは、細胞に導入した複合体が、細胞にコードタンパク質を発現させたとき、起きたものとする。

選定の細胞（CFT1細胞系：嚢胞性線維症患者の気道より獲得した細胞）を96穴プレートの中に、増殖培地中で20,000 / ウェルにて、細胞をサイトフェクションする前日に入れた。サイトフェクションの直前に細胞を観察し、そしてほぼ集密と評価された。調製したばかりの材料を、脂質を670 μ MそしてDNAを960 μ Mで配合し、次いで得られる脂質製剤

10

20

30

40

50

をDNAに添加することで用意する。複合体を15分かけて形成させ、次いで100 μ l の複合体を細胞に添加し、そしてサイトフェクションを行った。一般にサイトフェクションは50 μ l の30%のFCS - OPTIMEMを加えるまで6時間行った。翌日、100 μ l の10%のFCS - OPTIMEMをウェルに加える。アッセイはサイトフェクションを開始して48時間後に行った。サイトフェクションが起きたかどうかを調べるため、以下の工程を観察した：培地を除去し、そして細胞を100 μ l のPBSで2回洗う。25 μ l の溶解バッファー（250mMのトリス - HCl , pH8.0中の0.15%のトリトン $\times$ 100）を各ウェルに加える。プレートを室温で30分インキュベーションし、-70 で20分凍結し、そして室温で15分間融解させる。プレートを15秒間慎重にボルテックスにかけ、次いでそのプレートを-70 で20分凍結し、そして室温で更に15分融解させることにより細胞を破壊する。100 μ l のPBSをウェルに加え、次いで150 μ l のCPRG基質（1mgのクロロフェノールレッドガラクトピラノシドを1mlの60mMのリン酸水素二ナトリウム、pH8 , 1mMの硫酸マグネシウム、10mMの塩化カリウム及び50mMの β -メルカプトエタノールに溶かす）を加える。得られる組成物を37 で2時間、赤色が発色するまでインキュベートし、そしてプレートをマイクロタイタープレートリーダーで580nmで測定する。結果を適当にまとめる。

10

実施例 1

本例には、分散特性を向上するための、リボソーム/マンニトール組成物への適当な生理学的に許容されるタンパク質HSAの添加の効果を記載する。

（A）DOTMA：DOPE（重量で1：1 - Megabios Co.由来）を含んで成るカチオン脂質25 μ mole（33mg）を675mgのマンニトール及び100mlの脱イオン水中の0.16mlのHSA（12.5 g / 50 ml - Alpha Therapeutic由来）と混合した。得られる3%のHSA溶液30mlを以下の条件下で本例のパート（A）の工程に従い、スプレードライ式粉末へと加工した。

20

溶液供給率 3 ml / min

入口 / 出口温度 94 / 56

アトマイザー流速 800LPH

（B）本例のパート（A）の溶液70mlに、0.15mlのHSAを加えて12.4%のHSAの溶液にした。得られる溶液を以下の条件でスプレードライした：

溶液供給率 3 ml / min

入口 / 出口温度 103 / 56

アトマイザー流速 800LPH

30

上記工程（A）に関する粉末収率は理論値の55%であった。粉末の分散性は本明細書記載の方法を利用することにより 36 ± 4 %であることが見い出された。上記パート（B）についての粉末収率は54%であり、そして分散性は 59 ± 4 %であった。このことは、リボソーム/マンニトール組成物の分散性の向上におけるHSAの存在の重要性を示す。表 I 参照のこと。

表 I

組成物

HSA / 脂質 / マンニトール

40

処方 #	(mg / ml)	収率 %	分散性 %
調製例 1	0.00 / 0.35 / 6.75	6	—
実施例 1 A	0.40 / 0.35 / 6.40	55	36 ± 4
実施例 1 B	0.91 / 0.35 / 6.40	54	59 ± 4

実施例 2

本例には、良好な分散性を示しながら例示のDNAの保全性を保存する組成物が記載してある。トリス / マンニトール / HSA溶液（7.5mg / mlの固形分）中のpCMV β の組成物を以下の

50

条件下でBuchi - 190スプレードライヤーを用いてスプレードライした：

溶液供給率 4.3ml / min

入口 / 出口温度 120 / 70

アトマイザー流速 800LPH

得られる粉末は容易に流動し、そして脱イオン水で再構築し、そしてゲル電気泳動させた（0.5×のTPEと0.5μg / mlのエチジウムブロミド中1.3%のアガロース：100ボルトで4時間）。未処理のpCMVβも同じゲルに流した。処理及び未処理pCMVβの双方に関してゲル電気泳動で類似のバンドが観察され、DNAの保全性が保存されていることが示唆された。組成物の分散性が良好であり、そしてDNAが保存されていることがわかったが、この組成物は調製例2のサイトフェクションアッセイにおいてトランスフェクション活性を示さな 10

実施例 3

本例には、遺伝子治療のための肺搬送に有用な本発明の組成物を調製するための方法及びその組成物自体が記載してある。この組成物において、賦形剤はマンニトールであり、生理学的に許容されるタンパク質はHSAであり、そして活性剤はDMRIE：DOPE（50 / 50w / w）とDNA、即ちGenzyme Corp.由来のpCMV - β - galとの組合せである。

本発明の組成物の調製において、5mgのDMRIE：DOPE（50：50 3.75mmole）を2.4mlの濾過脱イオン水に溶かし、そしてフルスピードで1分間ボルテックスにかけて1.56mMのカチオン脂質溶液を作った。2mlの水を0.86mlのこの水性懸濁物と混合して670mMにした。

DNA / リボソーム組成物を調製するため、4.26mg / mlの分散体として供給された0.145mlの DNA、1mMのトリスバッファー、pH8及び1.9mlの1mMのトリスバッファーpH8を混合して 20 960μMの混合物を作った。上記で調製した水性製剤を利用し、以下の脂質：DNA（μM：μM）比の液状製剤を調製した：0：0，0：6.9，20.9：12.8，10.4：12.8，5.2：12.8，10.4：6.9，5.2：6.9，2.6：6.9，0.4：3.5，5.2：3.5及び2.6：3.5。これらはpH8のトリス / マンニトール / HSAバッファー25mlの中で調製した。1mlのアリコートを各水性組成物から抜き取り、そして冷蔵し、そして複合体のトランスフェクション活性に対する粉末加工の効果を調べるためのコントロールとして用いた。

この液状製剤をBuchi - 190スプレードライヤーでスプレードライした。以下の条件を処理中維持した。

入口温度 115 ~ 125 30

出口温度 70 ~ 85

アトマイザー流速 700LPHのコンプレスエアー

溶液供給率 3.8ml / min

二次乾燥 60 ~ 75 で10min

粉末のアリコートを調製例2に記載のサイトフェクションアッセイを利用してトランスフェクション活性についてアッセイし、そしてスプレードライする前の液状製剤から抜き取った液状製剤コントロール及びサイトフェクション試験の約15分前に調製しておいた調製したばかりのトランスフェクション用製剤と比較した。

その結果は、脂質DNAを本組成物の粉末へと形成することにより、この複合体のトランスフェクション活性は液状製剤と比べ、ほとんど同じくらいの高さであることを示した。 40

実施例 4

本例には、遺伝子治療のための肺搬送に有用な本発明の組成物の調製方法及び組成物自体が記載してある。この組成物において、賦形剤はグリシンであり、そして活性成分は実施例2に示すDMRIE：DOPEとDNAとの組合せである。リボソームはまず5mgバイアルのDMRIE：DOPE（50：50，3.75μmoleのカチオン脂質DMRIE）を2.0mlの濾過脱イオン水に溶かし、そしてフルスピードでボルテックスにかけて1.56mMのカチオン脂質を作ることにより調製した。これを水で4mlに希釈して940μMにし、そして5分間音波処理し、次いで保存のために氷の上に載せた。DNAは4.26mg / mlの分散体として供給された0.5mlのDNA及び1mMのトリスバッファーpH8.0を6.75mlの水の中に分散して960μMとすることにより調製し、これも保存のために氷の上に載せた。 50

次いで脂質：DNA複合体を（A）グリシン／HSA及び（B）グリシン／マンニトール／HSA溶液の中に、バッファー抜きで調製した。以下の脂質：DNA（ μM ： μM ）比の製剤を調製した。20：20，20：15，10：15，10：10及び10：5。これらは全て25mlの溶液の中に調製した。1 μl のアリコートを取り出して冷蔵し、そして複合体のトランスフェクション活性に対する粉末処理の効果を調べるための液状コントロールとして使用した。

このようにして調製した液状製剤を、加工中、下記の条件下でBuchi - 190スプレードライヤーでスプレードライした：

入口温度 115～125
 出口温度 70～85
 アトマイザー流速 700～800LPHのコンプレスエアー
 溶液流速 3.8ml/min

10

スプレードライ前の液状製剤及び本発明のスプレードライ式粉末型組成物のアリコートを調製例2の手順に従ってin vitroでトランスフェクション活性についてアッセイし、そして類似の濃度比の液状組成物を有する調製したばかりの脂質／DNAサンプルと比較した。in vitroでの β -gal発現（CFT細胞系）、本発明の粉末型組成物、及び二通りの液状製剤（スプレードライ前のコントロールアリコート及び調製したばかりの材料）の対比を図7及び8に示す。これらの粉末を二重蒸留脱イオン水で再構築した。トリスバッファーを含む液状及び粉末製剤のトランスフェクション活性を調製したばかりの液状製剤よりも低かった（図7）。バッファーを含まない粉末において、新たに調製したばかりの液状製剤と比べ、20：20のトランスフェクション活性においては75%の上昇、そして20：15では30%の上昇があった。

20

優れたトランスフェクションを示す選定の粉末の測定物理パラメーターを表2に示す。グリシン／HSA及びグリシン／マンニトール／HSA粉末製剤は似たようなトランスフェクション活性を有したが（図7）、グリシン／HSA粉末はグリシン／マンニトール／HSAよりもよく分散した（表2）。

表 2

脂質：DNA 粉末の物理特性

製 剤 増料剤	分散性（％RSD） （ n = 3 ）	HORIBA MIMD*	カスケード インパクター MMAD** ％ ≤ 5 μ m
比			
20：20 グリシン	61（20）	2.0	3.9 60
20：15 グリシン	64（ 1 ）	2.0	2.4 75
20：20 Gly/Man	47（12）	2.0	3.0 70
20：15 Gly/Man	51（12）	2.4	4.1 60

30

* MMD：質量中央直径

**MMAD：質量中央空気力学直径

実施例 5

本例には、遺伝子治療のために有用な本発明の一定の組成物が記載してある。

本例は二組の実験を含む。（A）第一組においては、我々はリン酸バッファー（PB）中の炭水化物及びアミノ酸賦形剤、（i）マンニトール／HSA、（ii）グリシン／HSA及び（iii）マンニトール／グリシン／HSAの、アデノウィルスドライ粉末の感染力に対する効果を調べた。（B）第二組においては、我々は感染力に対するバッファーの除去及び加工出口

50

温度の効果を調べた。全ての溶液を使用し、そして低温（ $\sim 5^{\circ}\text{C}$ ）で保存した。

（A）（i）4本の3mlのマンニトール／HSAに0.1mlのアデノウイルス溶液を加えて $3.2 \times 10^7 \text{ iu/ml}$ 及び $\sim 60 \text{ mg/ml}$ の固形分を得、そして第5本目はウイルス抜きのコントロールとして用いた。2種類のウイルス製剤を脱イオン水で $\sim 9 \text{ mg/ml}$ の固形分へと希釈した。（ii）PB中の6.3mlのグリシン／HSA（I）と0.4mlのアデノウイルス溶液の製剤を2つ作った（ 29 mg/ml の固形分、 $6.3 \times 10^7 \text{ iu/ml}$ ）。その一方を脱イオン水で 9 mg/ml の固形分に希釈した。（iii）PB中の4.1mlのマンニトール／グリシン／HSAと0.4mlのアデノウイルス溶液の製剤を2つ作った（ 45.1 mg/ml の固形分、 $8.89 \times 10^7 \text{ iu/ml}$ ）。その一方を脱イオン水で 9 mg/ml に希釈した。アデノウイルス溶液と同じ日に作り、そして氷の上で冷しておいた。

10

（B）4種の調製を調製し、ここで2つはPB中の25mlのグリシン／HSA（II）と0.4mlのアデノウイルス溶液を含み（ 10.5 mg/ml 、 $1.6 \times 10^7 \text{ iu/ml}$ ）、そして他の2つは水中の25mlのグリシン／HSA（II）と0.4mlのアデノウイルス溶液を含んだ（ 8.6 mg/ml 、 $1.6 \times 10^7 \text{ iu/ml}$ ）。アデノウイルス溶液を上記の調製において使用前に一回の凍結／融解サイクルにかけた。それは約10週間前に調製しておき、そして -70°C で凍結保存した。

これらの製剤を以下のパラメーターに従ってBuchi - 190スプレードライヤーで粉末へと加工した：

溶液供給率 : $3.5 \sim 6.0 \text{ ml/min}$
 入口／出口温度 : $100 \sim 140 / 70 \sim 90$
 アトマイズ流速 : $700 \sim 800 \text{ LPH}$

20

得られる粉末を冷蔵保存した。 β -gal発現又はウイルス力価について試験する前に、粉末をリン酸緩衝食塩水（PBS）で再構築した。

結果

どのマンニトール製剤も標準6ウェル試験で β -gal発現を全く示さず、従ってそれらはウイルス感染力について力価検定しなかった。第一組由来のPB中のグリシン／HSA（I）及びグリシン／マンニトール／HSAはその β -gal発現において同等であり、そしてウイルス感染力について力価検定した。その力価は発現値の7～15%に範囲した。粒子サイズ分布（HORIBA）、分散性及び空気力学サイズ分布（IMPAQ 6 - ステージ）をPB中の2種のグリシン／HSA粉末について表3に示す。

（B）粉末及び -70°C で凍結した0.1mlのアデノウイルス溶液（V）を力価測定のためにドライアイスに載せてDr. Larry A. Couture (Genzyme, MA)へと輸送した。リン酸バッファを伴って及び伴わないで作った粉末はそのウイルス感染力をそれぞれ76～54%及び2～14%保持していた（表4）。出口温度を5 $^{\circ}\text{C}$ 下げると、緩衝化製剤ウイルスの感染力は22%上昇したが、未緩衝のものは6%低下させた。

30

表 3

グリシン／HSA アデノウイルス製剤

製 剤 (mg/ml)	分散性 (% RSD)	HORIBA MMD	カスケード インパクター MMAD	% < 5 μm	% 保持感染力
29	40(25)	2.6	2.8	70	14
9	51(1)	2.3	1.8	80	7

40

表 4

バッファー中及びバッファー抜きのアデノウィルス粉末の力価結果

製 剤	出口温度 ℃	予測値 iu/ml	測定値 iu/ml
V	N / A	1.0×10^9	1.6×10^8
緩衝化	77	1.0×10^8	5.4×10^7
緩衝化	72	1.0×10^8	7.6×10^7
未緩衝	77	1.0×10^8	2.0×10^6
未緩衝	72	1.0×10^8	1.4×10^6

10

【図 1】

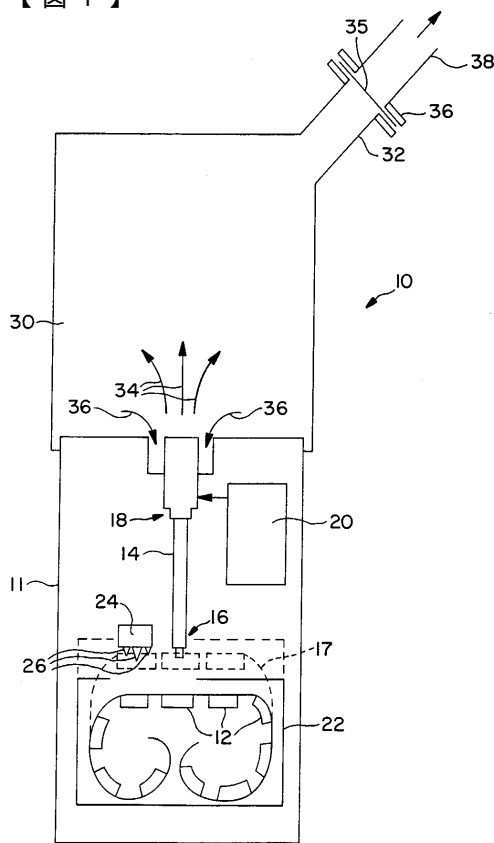


FIG. 1

【図 2】

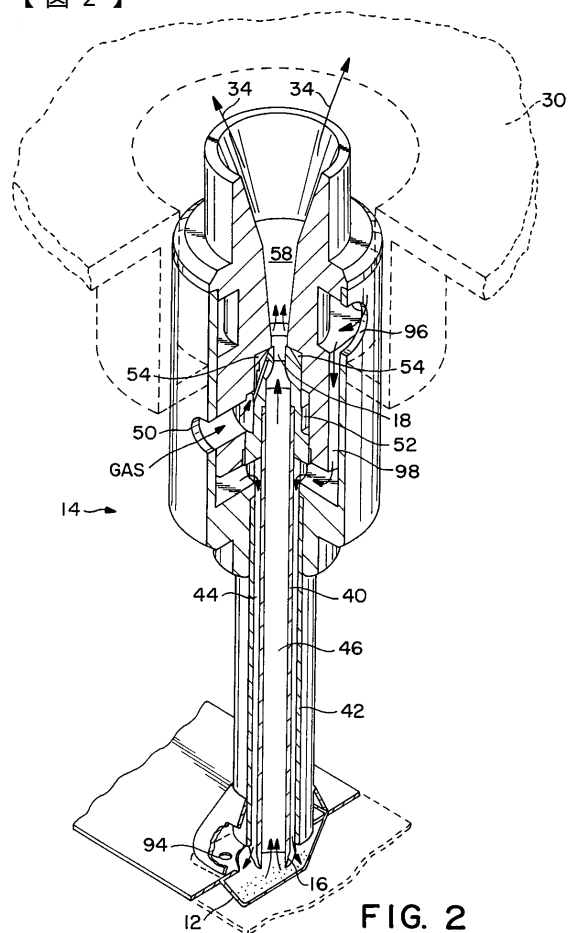


FIG. 2

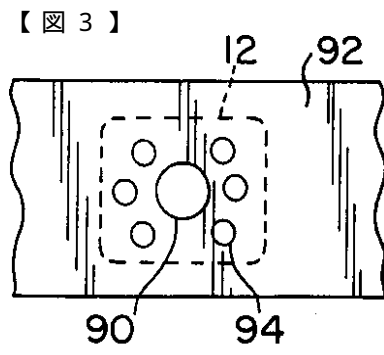


FIG. 3

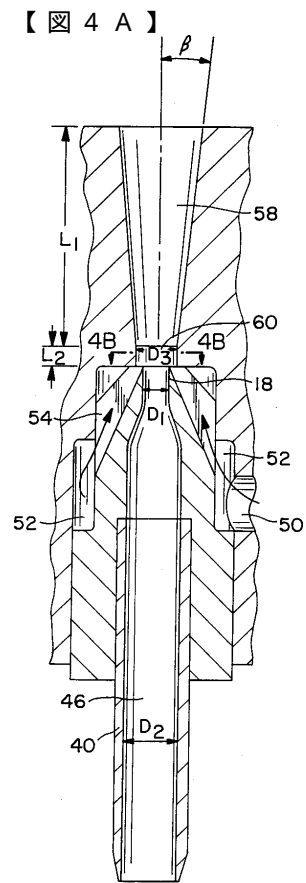


FIG. 4A

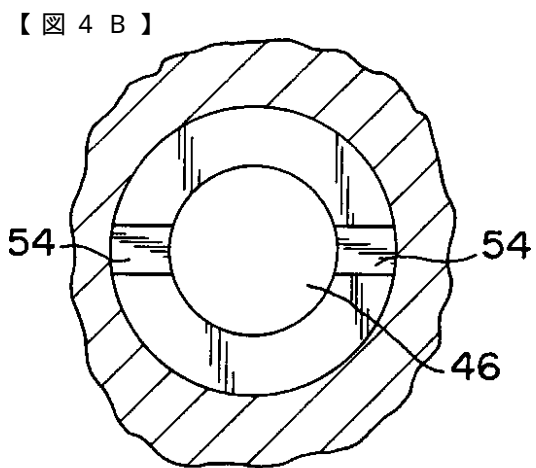


FIG. 4B

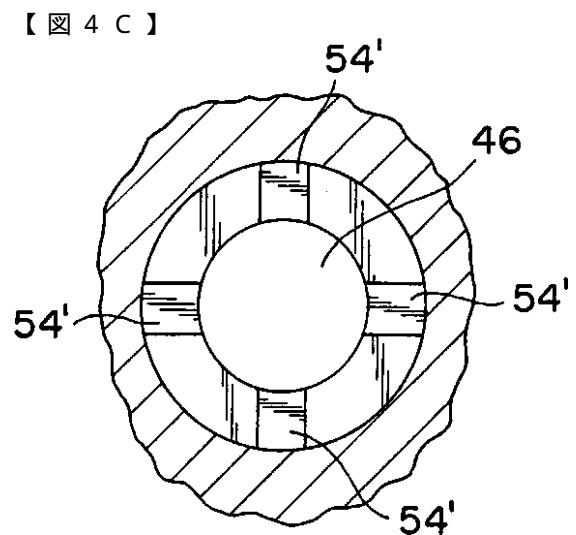


FIG. 4C

【図 5】

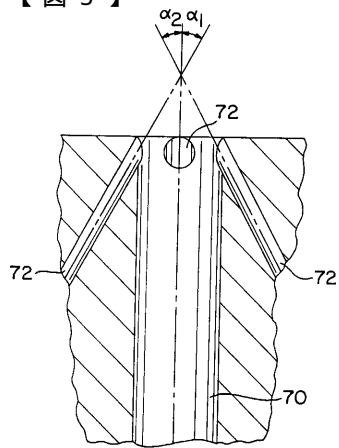


FIG. 5

【図 6】

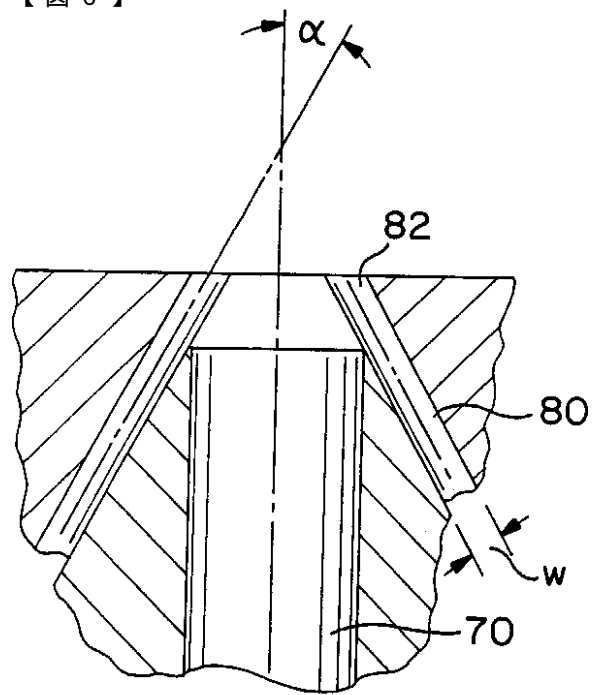


FIG. 6

【図 7】

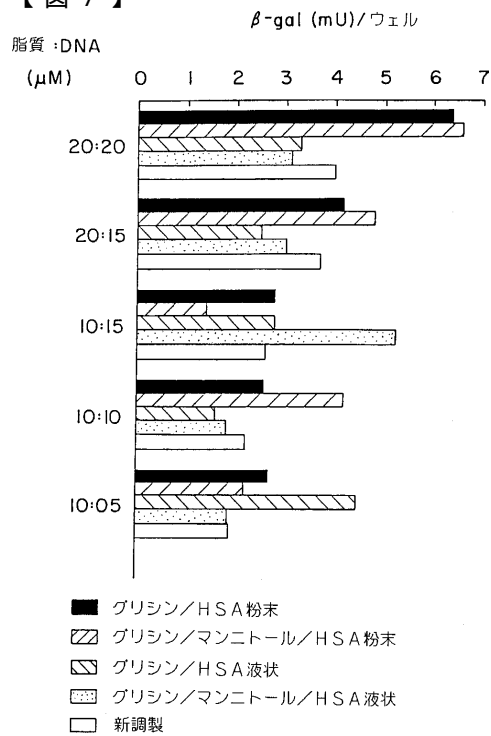


FIG. 7

【図 8】

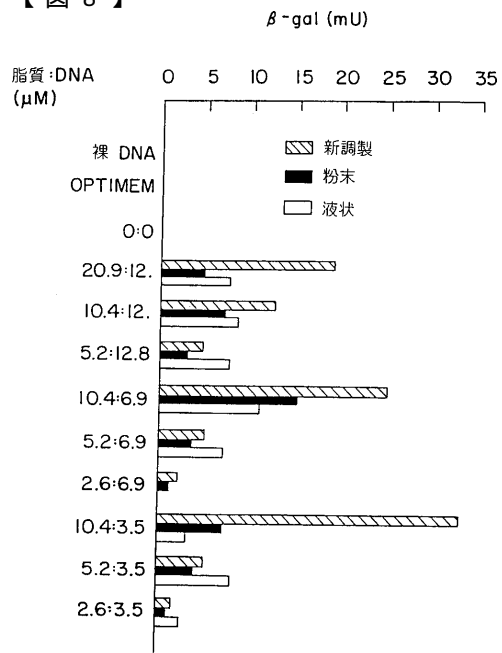


FIG. 8

フロントページの続き

- (72)発明者 パットン, ジョン エス.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94070, サン カルロス, エメラルド アベニュー 330
- (72)発明者 フォスター, リンダ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94086, サニーベール, カロライナ アベニュー 733
- (72)発明者 ブラッツ, ロバート エム.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94019, ハーフ ムーン ベイ, パルデス アベニュー 324

合議体

審判長 森田 ひとみ

審判官 弘實 謙二

審判官 横尾 俊一

- (56)参考文献 特表平5-500229(JP, A)
特表平5-508616(JP, A)
米国特許第5354562(US, A)
米国特許第5354934(US, A)
国際公開第94/07514(WO, A1)
特開昭57-108020(JP, A)
特表平2-502348(JP, A)
薬理学のまとめ, 佐藤公道, 橋田充共著, 株式会社金芳堂, 1988年3月1日, 第1版第1刷
発行, 第51~52、65~67頁

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61F9/14, 9/12, 9/72, 47/26