

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4748923号  
(P4748923)

(45) 発行日 平成23年8月17日(2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日(2011.5.27)

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 9/50	(2006.01)	A 6 1 K 9/50
A 6 1 K 38/22	(2006.01)	A 6 1 K 37/24
A 6 1 K 38/21	(2006.01)	A 6 1 K 37/66
A 6 1 K 47/14	(2006.01)	A 6 1 K 47/14
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K 47/32

請求項の数 15 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-552532 (P2002-552532)	(73) 特許権者	504104899
(86) (22) 出願日	平成13年12月17日(2001.12.17)		アレス トレーディング ソシエテ アノ ニム
(65) 公表番号	特表2004-529864 (P2004-529864A)		スイス連邦 CH-1170 オーボンヌ ゾーヌ アンデュストリエル ドゥル リエッタ
(43) 公表日	平成16年9月30日(2004.9.30)	(74) 代理人	100140109
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/014890		弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開番号	W02002/051386	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成14年7月4日(2002.7.4)		弁理士 社本 一夫
審査請求日	平成16年8月18日(2004.8.18)	(74) 代理人	100075270
審査番号	不服2008-14089 (P2008-14089/J1)		弁理士 小林 泰
審査請求日	平成20年6月5日(2008.6.5)	(74) 代理人	100080137
(31) 優先権主張番号	00128556.8		弁理士 千葉 昭男
(32) 優先日	平成12年12月27日(2000.12.27)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	01125741.7		
(32) 優先日	平成13年10月26日(2001.10.26)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低温微粉碎による脂質マイクロ粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬物および脂質マトリックスを含む脂質マイクロ粒子であって、該薬物がLHRHアンタゴニストとして作用するデカペプチド及びIFN- から成る群より選択され、該脂質マトリックスが該脂質マトリックスの重量に対して少なくとも70%w/wのモノグリセリド含量を有し、該マイクロ粒子が、該脂質及び該薬物を含有する混合物の-196~0の温度における低温微粉碎によって製造されることを特徴とする脂質マイクロ粒子。

【請求項2】

該モノグリセリド含量が脂質マトリックスの重量に対して75~99%w/wであることを特徴とする、請求項1に記載の脂質マイクロ粒子。

【請求項3】

該デカペプチドが、N-Ac-D-2-Nal, D-pClPhe, D-3-Pal, Ser, Niclys, D-Niclys, Leu, Ilys, Pro, D-Ala, NH<sub>2</sub>であることを特徴とする、請求項1または2に記載の脂質マイクロ粒子。

【請求項4】

該デカペプチドがセトロレリックスであることを特徴とする、請求項1または2に記載の脂質マイクロ粒子。

【請求項5】

該マイクロ粒子が他の医薬的に許容できる賦形剤をも含むことを特徴とする、請求項1~4のいずれか1項に記載の脂質マイクロ粒子。

【請求項 6】

該賦形剤が、アクリルポリマー、中鎖脂肪酸およびポリエチレングリコールよりなる群から選択される、生体接着性または吸収増強性を有するポリマーであることを特徴とする、請求項 5 に記載の脂質マイクロ粒子。

【請求項 7】

該マイクロ粒子が 3 ~ 500 μm の平均直径を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の脂質マイクロ粒子。

【請求項 8】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の脂質マイクロ粒子。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の脂質マイクロ粒子、および医薬的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤を含有する、医薬組成物。

10

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の脂質マイクロ粒子の製造方法であって、脂質及び薬物を含有する混合物を - 196 ~ 0 の温度で粉碎することによって低温微粉碎を実施する工程を含む方法。

【請求項 11】

低温微粉碎の温度が - 80 ~ - 20 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

低温微粉碎の温度が - 50 ~ - 30 である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

低温微粉碎後にふるい分け工程を含む、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

低温微粉碎の前に、摩砕によるサイズ予備縮小工程を含む、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

脂質及び薬物を含有する混合物の冷却を液体窒素注入により実施することを特徴とする、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

=====

30

本件に関するお問合せは、下記までお願いします。

ユアサハラ法律特許事務所 特許国内事務担当

TEL (03) 3270-6641 内線 405 / FAX (03) 3246-0233

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、ペプチドおよび/またはタンパク質の取込みを促進する、両親媒性成分に富む脂質から成る脂質マイクロ粒子、それらを得るための方法、ならびにそれらの使用に関する。低温微粉碎 (cryogenic micronization) による製造方法も開示する。

40

【0002】

発明の背景

マイクロスフェアは、幾つかの療法分野で高く評価されている薬物送達システムの一例である。それらは本質的に直径 1 ~ 500 μm の固体粒子であり、血管内に物理的にトラップすることによりそれらの積載薬物をターゲティングさせ (化学的塞栓形成)、かつ制御放出により治療薬の作用を持続させることができる。マイクロスフェアは、タンパク質、多糖、ポリエステルおよび脂質を含めた広範な材料から多様な方法 (乳化、熱安定化、コアセルベーションおよび転相などの技術) で製造できる。マイクロスフェアはモノリシック構造をもち、全体が固体であって、リポソームのようなより流体状で軟質の小胞系とは区別できる。マイクロスフェアは普通は直径 1 ~ 500 μm であり、顆粒 (> 100 μ

50

m)と微粒子 (< 1 μm)の間にある。それらは、その内部構造が小胞状ではなく均質なマトリックスであるため、マイクロカプセルと区別される。マイクロスフェアは多数の異なる生体適合性、生物分解性の材料から製造できる；たとえばタンパク質(アルブミンおよびゼラチン)(Biopharm. Drug Dispos. (1985) 6, pp.91-104およびIntern. J. Pharm. (1987) 35, pp.177-179)、ポリエステル(グリコシドおよびラクチド)(J. Microencap. (1986) 3, pp.181-193およびDrug Dev. Ind. Pharm. (1990) 16, pp.2353-2367)、多糖(デンプン、エチルセルロース、アルギナートおよびキトサン)(Drug Dev. Ind. Pharm. (1996) 22, pp.457-463およびJ. Contr. Rel. (1997) 43, pp.65-74)、イオン交換樹脂(J. Contr. Rel. (1989) 8, pp.251-257)および脂質(Adv. Drug Deliv. Rev. (1996) 20, pp.209-219)。

10

## 【0003】

マイクロスフェアを形成し、同時に薬物を封入するために、これまでに下記を含めた多数の方法が開発された：

- 化学的安定化 (Biopharm. Drug Dispos. (1985) 6, pp.91-104)；
- 熱安定化 (Experientia (1983) 39, pp.913-916)；
- 多重エマルジョン溶媒蒸発 (J. Contr. Rel. (1994) 28, pp.121-129)；
- 多重エマルジョン溶媒抽出 (J. Contr. Rel. (1997) 43, pp.261-272)；
- コアセルベーション (Cancer Res. (1993) 53, pp.5841-5844)；
- 転相ナノカプセル封入 (PIN) (Nature (1997) 386, pp.410-414)；
- 噴霧乾燥 (Pharm. Sci. (1997) 86, pp.603-607)。

20

## 【0004】

場合により、粒子形成後に薬物をマイクロスフェアに添加し、またはそれに複合体形成させる。マトリックス材料および製造方法の選択が全般的性能の決定に重要である。

この選択は幾つかの要因に依存する：

- 必要なマイクロスフェアのサイズ；
- 薬物固有の特性、たとえば水溶性および安定性；
- 粒子の表面特性、たとえば透過性および電荷；
- 生物分解度および生体適合度；
- 目的とする薬物放出プロフィール。

薬物がマイクロスフェアから放出される速度は、3つの主要な要因に依存する：

- 封入される薬物の溶解度および拡散プロセス；
- 粒子の浸食および生物分解の速度；
- 薬物と粒子マトリックスの、固定化を生じる相互作用。

30

ポリマーマイクロ粒子は、通常は単一/二重エマルジョン溶媒蒸発、コアセルベーションおよび噴霧乾燥などの方法で製造される。

## 【0005】

しかしこれらの方法は幾つかの欠点を示す：溶媒蒸発法では普通は大量の塩素化有機溶媒が用いられ、制御された操作条件を達成できるのは稀である；さらに、ペプチドおよびタンパク質の場合、用いる溶媒が構造を変性させて効力を失わせる可能性がある。O/W単一および二重エマルジョン法では、有機/水界面層における両親媒性分子(すなわちタンパク質)の蓄積が薬物の凝集および沈殿を引き起こすことも報告されている (Pharmaceuticals Dosage Forms: Disperse systems, 第2版, Marcel Dekker社 (1998) pp.163-193)。

40

## 【0006】

噴霧乾燥法は、媒質に溶解または懸濁したポリマーおよび薬物をチャンバーのノズルから噴霧し、その際、相対的に高い温度の作用により溶媒を蒸発させ、プロセスの最後にマイクロ粒子を粉末状で採集する方法である。このような蒸発法により得られるマトリックスは普通はかなり多孔質であるため、マトリックス中の薬物封入量は少なくなり、即時放出および大きな初期バースト効果を生じる。さらに、製造中に形成される空気/液体界面が表面における分子凝集(特にタンパク質について)を促進する (Mumenthaler M. et al

50

., Pharm. Res., 11 (1994) No.1)。

【 0 0 0 7 】

したがって低温微粉碎は、脂質材料のマイクロ粒子を得るための製造方法において、ペプチド/タンパク質の安定性および初期バースト効果の低下という両方の点で顕著な利点をもたらす別法とみることができる。さらに、特定の物理的状態の脂質、すなわち多様な結晶状態（たとえば多形状態）の脂質を得ることにより、薬物放出プロファイルを調節できる。調査した先行技術においては、数例の脂質マイクロ粒子が薬物放出の分野で産業用として既に記載されている。W. Steberら（American Cyanamid Corporation, EP 257368）は30～95%の脂肪またはろうおよび約2～70%の生物活性物質を含有するマイクロスフェア組成物を記載しており、この場合、脂質成分は含量55～79%のグリセリトリステアートを含有する。M. W. Fountainら（The Liposome Company, US 4,610,868）は、疎水性化合物、両親媒性化合物を含む脂質マトリックス担体と生物活性物質を500nm～100μmの直径をもつ球状構造の形で組み合わせたものを記載している。この担体は、成分を乳化し、このエマルジョンを有機溶媒中へ注入することにより得られる。H. Augart（Warner Lambert Company, US 4,483,847）は、高融点と低融点の両方の脂質を含む薬物送達用組成物を記載している；これは融解、混合および冷却後に、錠剤製造のために造粒される。P. Orsoliniら（Debiopharm, US 5,192,741）は、ポリラクチド、すなわち乳酸とグリコール酸のコポリマーおよびペプチドを含有する医薬組成物を調製するための、低温摩砕工程を含む方法を記載している。このポリマーおよび生物活性物質を有機溶媒に溶解/分散し、固体残留物を造形しつつ溶媒を除去することにより、マイクロ粒子が得られる。

10

20

【 0 0 0 8 】

したがって本発明の目的は、持続放出性、特に低い「バースト効果」をもつ脂質マイクロ粒子を提供することである。

発明の説明：

特に本発明の主な目的は、薬物および脂質マトリックスを含む新規タイプの脂質マイクロ粒子であって、薬物がペプチドまたはタンパク質であり、脂質マトリックスが脂質マトリックスの重量に対して少なくとも70%w/wのモノグリセリド含量を有することを特徴とする脂質マイクロ粒子を提供することである。

【 0 0 0 9 】

脂質マトリックスへのペプチドおよび/またはタンパク質の取込みを高めるために、異なる親水性/疎水性および化学組成をもつ数種類の脂質、たとえばトリ-、ジ-およびモノ-グリセリド、PEG-またはPPG-グリセリド、糖-グリセリド、脂肪酸、ならびにそれらの混合物をスクリーニングした。

30

【 0 0 1 0 】

驚くべきことに、モノグリセリドを高い含量で含有し、脂質マイクロ粒子に両親媒性を与える脂質マトリックスを用いることにより、ペプチドおよび/またはタンパク質の最大充填量を達成できることが認められた。脂質マトリックスのモノグリセリド含量を少なくとも70%w/w、好ましくは75～99%w/wとすべきであることが見出された。したがって本発明によれば、前記の脂質またはそれらのうち1種類以上の混合物を使用できる。ただしモノグリセリドの全含量は前記のように少なくとも70%w/wである。

40

【 0 0 1 1 】

本発明の脂質マイクロ粒子は、医薬的に許容できる賦形剤、たとえばアクリルポリマー（カルボポール（登録商標）、ポリカルボフィル、ノベオン（登録商標））、中鎖脂肪酸およびポリエチレングリコールを含むか、またはこれらよりなる群から選択される生体接着性または吸収増強性をもつポリマーを含有してもよい。好ましい賦形剤は上記のアクリルポリマーである。

【 0 0 1 2 】

本発明の好ましい態様によれば、マイクロ粒子の全脂質含量は少なくとも90%w/w、より好ましくは少なくとも95%w/wである。

50

一般に治療上有効であるいかなるペプチドまたはタンパク質も本発明の脂質マイクロ粒子に取り込ませることができる。治療に有用な大部分のタンパク質は3クラスに分類できる：

- 調節因子：ホルモン、サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、それらの受容体、ならびに細胞の増殖および代謝を調節する他の因子（酵素を含む）が含まれる；
- 血液産物：血清由来の血液因子および酵素性フィブリンノーゲン活性化因子が含まれる；
- モノクローナル抗体。

【0013】

本発明の1態様によれば、前記の好適なタンパク質またはペプチドには下記の例が含まれるが、これらに限定されない：AAT、UK、PUK、ストレプトキナーゼ、tPA、SOD、インスリン、GH、GRF、ANF、GnRH、LHRH類似体、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3/多能CSF、インターロイキン-4、インターロイキン-5（または好酸球-CSF）、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-8、インターロイキン-9、インターロイキン-10、インターロイキン-11、インターフェロン-、インターフェロン-、インターフェロン-、白血病阻害因子、M-CSF、TNF、幹細胞因子、およびそれらの受容体。

【0014】

本発明の好ましい態様によれば、タンパク質またはペプチドはインターロイキン-6、インターフェロン-、インターフェロン-、インターフェロン-、GnRH、LHRH類似体、GH、GRF、ゴナドトロピン（FSH、LHおよびhCGなど）、およびTNF受容体またはその可溶性フラグメントよりなる群から選択される。

【0015】

より好ましくは、ペプチドはLHRH類似体、より好ましくはLHRHアンタゴニストとして作用するデカペプチドよりなる群から選択される。

本発明の特に好ましい態様において、限定ではないがペプチドのリストには下記の化合物が含まれる：

- アバレリックス（Abarelix）（WO96/40757号に開示）：LHRHアンタゴニストとして作用し、次式により定められる：

D - アラニンアミド，N - アセチル - 3 - ( 2 - ナフタレニル ) - D - Ala - 4 - Cl - D - Phe - 3 - ( 3 - ピリジニル ) - D - Ala - L - Ser - N - メチル - L - Tyr - D - Asn - L - Leu - N6 - ( 1 - メチルエチル ) - L - Lys - L - Pro。

【0016】

- アンタレリックス（Antarelix）（WO92/19651号に開示）：LHRHアンタゴニストとして作用し、次式により定められる：

D - アラニンアミド，N - アセチル - 3 - ( 2 - ナフタレニル ) - D - Ala - 4 - Cl - D - Phe - 3 - ( 3 - ピリジニル ) - D - Ala - L - Ser - L - Tyr - N6 - ( アミノカルボニル ) - D - Lys - L - Leu - N6 - ( 1 - メチルエチル ) - L - Lys - L - Pro。

【0017】

- アザリンB（Azaline B）（US5296468号に開示）：GnRHアンタゴニストとして作用し、次式により定められる：

D - アラニンアミド，N - アセチル - 3 - ( 2 - ナフタレニル ) - D - Ala - 4 - Cl - D - Phe - 3 - ( 3 - ピリジニル ) - D - Ala - L - Ser - 4 - [ ( 5 - アミノ - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル ) アミノ ] - L - Phe - 4 - [ ( 5 - アミノ - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - イル ) アミノ ] - D - Phe - L - Leu - N6 - ( 1 - メチルエチル ) - L - Lys - L - Pro。

【0018】

10

20

30

40

50

- ガニレリックス (Ganirelix) (EP 2 778 299号に開示) : LHRHアンタゴニストとして作用し、次式により定められる :

D - アラニンアミド , N - アセチル - 3 - ( 2 - ナフタレニル ) - D - Ala - 4 - Cl - D - Phe - 3 - ( 3 - ピリジニル ) - D - Ala - L - Ser - L - Tyr - N6 - [ビス(エチルアミノ)メチレン] - D - Lys - L - Leu - N6 - [ビス(エチルアミノ)メチレン] - L - Lys - L - Pro .

【0019】

本発明のより好ましい態様において、LHRHアンタゴニストとして作用するペプチドはアンタイド (Antide) と呼ばれる特定のデカペプチドである。このデカペプチド (N - Ac - D - 2 - Na1 , D - pClPhe , D - 3 - Pal , NicLys , D - NicLys , Ilys , D - Ala , NH<sub>2</sub>) は、顕著な排卵抑制活性およびLHRHアンタゴニスト特性をもち、女性においてホルモン代謝に直接作用することが既に記載されている (EP 3 776 65号およびUS 5 470 947号)。

10

【0020】

LHRHアンタゴニストとして作用する他の特に好ましいペプチドは、セトロタイド (Cetrotide) (そのINNはEP 2 994 022号に開示されるセトロレリックス (Cetrorelix)) と呼ばれる他のデカペプチドであり、次式をもつ : D - アラニンアミド , N - アセチル - 3 - ( 2 - ナフタレニル ) - D - Ala - 4 - Cl - D - Phe - 3 - ( 3 - ピリジニル ) - D - Ala - L - Ser - L - Tyr - N5 - (アミノカルボニル) - D - オルニチル - L - Leu - L - Arg - L - Pro .

20

【0021】

したがって、ペプチドまたはタンパク質を充填した脂質マイクロ粒子が実際に医薬として医薬組成物の調製に使用するのに好適なことを本明細書に報告する。ペプチドがLHRHアンタゴニストとして作用するデカペプチドである好ましい態様において、本発明の医薬組成物は哺乳動物におけるホルモン代謝の調節または女性における異常なホルモン代謝活性に関連する障害の治療もしくは予防に有用である。より具体的には、LHRH経路の異常な活性に関連する障害の治療もしくは予防に有用である。この特定の態様においてペプチド充填した脂質マイクロ粒子は、LHRHの拮抗が主要な役割をもつホルモン性疾患、病的状態の処置、または避妊活動に有用である : たとえば哺乳動物において排卵を阻害するための避妊薬、または哺乳動物においてホルモン依存性腫瘍の増殖もしくはテストステロン産生を阻害する薬剤。ペプチド充填した脂質マイクロ粒子は単独でまたは他の医薬と組み合わせて使用できる。

30

【0022】

本発明のペプチドまたはタンパク質を充填した脂質マイクロ粒子を医薬として使用する場合、一般にそれらを医薬剤形で投与する。したがって、ペプチドまたはタンパク質を充填した脂質マイクロ粒子および医薬的に許容できる賦形剤、たとえば希釈剤、酸化防止剤、界面活性剤、補助界面活性剤、増粘剤、抗微生物薬、凍結保護剤を含む医薬組成物も、本発明の範囲に含まれる。そのような組成物は医薬技術分野で周知の方法により調製できる。一般に、本発明のペプチドまたはタンパク質を充填した脂質マイクロ粒子を治療上有効量で投与する。実際の投与量は一般に、処置すべき状態、選択した投与経路、各患者の年齢、体重および応答、患者の症状の重症度などを含めた関連状況を考慮して医師が決定する。

40

【0023】

本発明の医薬組成物は、経口、静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、腹腔内、皮膚、舌下、直腸、口腔、膣、鼻腔または肺などの経路を含めた多様な経路で投与できる。皮下経路は本発明による好ましい投与経路である。

【0024】

意図する送達経路に応じて、化合物を液体または固体剤形として配合できる。経口投与用組成物は、バルク液剤もしくは懸濁液剤、またはバルク散剤の形をとることができる。

経口投与に適した液体剤形は、好適な水性または非水性ビヒクル、ならびに緩衝剤、沈

50

殿防止剤および分散剤、着色剤、着香剤などを含有できる。

【0025】

固体剤形は、たとえば下記の成分または同様な性質をもつ化合物をいずれも含有できる：結合剤、たとえば微結晶性セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチン；賦形剤、たとえばデンプンもしくは乳糖；崩壊剤、たとえばアルギン酸、プリモジェルもしくはコーンスターチ；滑沢剤、たとえばステアリン酸マグネシウム；滑剤 (glidant)、たとえばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、たとえばショ糖もしくはサッカリン；または着香剤、たとえばペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジフレーバー。

【0026】

注射用組成物は一般に、注射用無菌塩類溶液もしくはリン酸塩緩衝化塩類溶液、または当技術分野で公知の他の注射用担体を基礎とする。

本発明の他の目的は、前記のペプチドまたはタンパク質を充填した脂質マイクロ粒子を製造する方法である。本発明のペプチドまたはタンパク質を充填した脂質マイクロ粒子は、好ましい製造方法によれば、生物活性物質、好ましくはペプチドを含む脂質マイクロ粒子を製造するための新規な低温微粉碎法により製造でき、医薬組成物として使用できる。

【0027】

この新規方法は、ペプチド、特にデカペプチドを含み、その持続放出を特徴とする好適な送達システムを得るための新規方法であるとみることができる (Eur. J. Pharm. Biopharm. 41 (1995) (1) pp.62-69およびEur. J. Pharm. Biopharm. 45 (1998) pp.149-155)。

【0028】

本発明の1態様によれば、脂質マイクロ粒子の製造方法は下記の工程を含む：

- 溶媒に溶解して薬物を脂質に充填し；
- 溶媒を除去し；
- 薬物充填した脂質マトリックスを冷却し；
- こうして得た材料のサイズを摩砕 (grinding) により予備縮小し；
- 冷却後に低温微粉碎を実施し、粉碎およびふるい分けする。

【0029】

本発明の他の態様によれば、脂質マイクロ粒子の製造方法は下記の工程を含む：

- ペプチドを融解脂質に充填し；
- 薬物充填した脂質マトリックスを冷却し；
- こうして得た材料のサイズを摩砕により予備縮小し；
- 冷却後に低温微粉碎を実施し、粉碎およびふるい分けする。

最終工程の前に述べた摩砕プロセスに関して、この摩砕は医薬固体剤形の製造に際して粉末の粒度を低下させるための基本的な方法である (Lachman L. and Lieberman H., Lea & Febiger (1986) pp.21-46)。しかし最近の装置改良により (高速ミル、マイクロナイザー、インライン分級機)、現在では制御された寸法および粒度分布をもつミクロンおよびミクロン以下の範囲の粒子を粉碎により得ることができる。

【0030】

きわめて意外なことに、摩砕が脂質マイクロ粒子の製造方法として報告されるのは稀である。マイクロ粒子製造にポリマーを用いる場合、摩砕中に生じる衝撃/摩擦力は粒度低下のための手段としては有効でない。これは、用いられる最も一般的なポリマーの構造のためである；ポリマーはゴム様の特性 (ガラス転移事象) を示し、このため摩砕法による粒度低下の効率が低下する (Geze et al., Int. J. Pharm. (1999) pp.257-268およびDomb et al., Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publishers (1997) pp.3-29)。

【0031】

これに対し、脂質を扱う場合、それらの物理的構造の相異 (特定の結晶化度により表わされる) のため、衝撃/摩擦力、したがって摩砕法を効果的に利用できる。

したがって微粉碎は、脂質材料のマイクロ粒子を得るための製造方法において、特にペ

10

20

30

40

50

プチド/タンパク質を取り込ませなければならない場合、顕著な利点をもたらす別法とみることができる。

【0032】

さらに微粉碎法の他の利点は、低温条件下で操作できることである（「低温微粉碎」）。これは、温度感受性薬物（すなわちペプチド、タンパク質）、ガラス転移温度または融点の低い材料、たとえば脂質ブレンド、またはポリマー構造に近似する物理化学的特性をもつ複合材料を扱う場合に有用である。

【0033】

本発明のより好ましい製造方法によれば、本発明のペプチド充填した脂質マイクロ粒子は溶媒ストリッピング法により製造される：

- 有機溶媒に共溶解して脂質にペプチドを充填し；
- 溶媒を除去し；
- 薬物充填した脂質マトリックスを冷却し；
- こうして得たマトリックスのサイズを摩砕により予備縮小し；
- 低温微粉碎を実施し；
- こうして得たマイクロ粒子を粉碎およびふるい分けする。

【0034】

本発明の他の好ましい態様によれば、用いる溶媒は水、エタノール、プロパノール、ベンジルアルコール、イソプロパノールまたはそれらの混合物よりなる群から選択され、好ましくはエタノールとベンジルアルコールの混合物、より好ましくはベンジルアルコールである。

【0035】

本発明の好ましい態様においては、溶媒の蒸発を30～90、好ましくは40～80、より好ましくは55～75の温度で実施する。

本発明の好ましい製造方法によれば、ペプチド充填した脂質マイクロ粒子は下記の工程を含む共融法により製造される：

- ペプチドを融解脂質に充填し；
- 薬物充填した脂質マトリックスを冷却し；
- こうして得たマトリックスのサイズを摩砕により予備縮小し；
- 低温微粉碎を実施し；
- こうして得たマイクロ粒子を粉碎およびふるい分けする。

【0036】

脂質マトリックスのサイズを予備縮小する工程は、ハンマー粉碎またはナイフ粉碎または振動粉碎により実施される。

低温微粉碎工程においては、薬物充填した脂質マトリックスを微粉碎する前に、液体窒素注入により-196～0、好ましくは-80～-20、より好ましくは-50～-30の温度に冷却する。こうして得たマイクロ粒子のサイズは1～500μm、好ましくは1～300μm、より好ましくは1～100μm、特に5～50μmである。

【0037】

ふるい分け工程に関して、この操作は粒度要件および用いるミルの種類に依存する。微粉碎により得られる生成物の粒度はある用途については既に好適であり、したがってふるい分けは必要ない。

【0038】

マイクロスフェアからの薬物放出に関する共通の問題は、全有効充填量の大部分（30～70%）が短時間で（1時間以内）粒子から放出される可能性のある「バースト効果」として知られている。これは、マイクロスフェアの表面付近にある薬物が急速に放出されること、またはマトリックスが高多孔質であること、またはポリマー材料が急速に浸食されることが原因であると考えられる。

【0039】

きわめて意外なことに、本発明方法により得られるアンタイド充填した脂質マイクロ粒

10

20

30

40

50

子はin vivoで少なくとも1カ月間の持続放出を示し、初期バースト効果を制御および調節できる(24時間以内に放出される薬物は10%に低下)ことが認められた;これは製造操作条件(すなわち取り込ませる方法)および材料の物理化学的特性(すなわちグリセリド組成)の両方によるものである(図5に示す)。驚くべきことに、これら両要因が脂質マトリックス自体および薬物充填したマトリックスの構造配列様式に影響を及ぼし、その結果、薬物放出を制御してバーストを目的の数値に調節することができる。さらに、脂質相のモノグリセリド含量が高いと初期「バースト効果」は低下することが認められた(図10参照)。

【0040】

この節には種々の生物学的用語および分析用語の略号および定義、ならびに本明細書全体で用いる略語を示す。別途明記しない限り、これらは本明細書および特許請求の範囲全体にわたって適用されるものとする。

【0041】

「両親媒性」は、2つの異なる環境に対して親和性をもつ化合物、たとえば親水性(極性)領域と親油性(非極性)領域をもつ分子を表わす。界面活性剤が古典的な例である。

「AAT」は、-1-アンチトリプシンを表わす。

【0042】

「ANF」は、心房性ナトリウム利尿因子を表わす。

「アンタイド」(提示されたINNはIturelix)は、下記のデカペプチドを表わす;  
N - A c - D - 2 - N a l , D - p C l P h e , D - 3 - P a l , S e r , N i c L y s , D - N i c L y s , L e u , I l y s , P r o , D - A l a , N H <sub>2</sub>。

【0043】

「バースト効果」は、マイクロスフェアからの薬物放出に関する共通の問題であって、全有効充填量の大部分(50~70%)が短時間で(1時間)粒子から放出される可能性がある。これは、マイクロスフェアに適正に埋め込まれていない材料が急速に放出されることが原因である。

【0044】

「共融法」は、薬物を特定の融解した脂質相材料に充填する方法を表わす。

「2-Nal」は、3-(2-ナフチル)アラニンを表わす。

「Ilys」は、N-イソプロピルリジンを表わす。

【0045】

「NicLys」は、N-ニコチノイルリジンを表わす。

「3-Pal」は、3-(3-ピリジル)アラニンを表わす。

「DMPC」は、ジミリストイルホスファチジルコリンを表わす。

【0046】

「DMPG」は、ジミリストイルホスファチジルグリセロールを表わす。

「第VII因子」は、2331個のアミノ酸を含有する糖タンパク質を表わす。

「FSH」は、卵胞刺激ホルモンを表わす。

【0047】

「GH」は、成長ホルモンを表わす。

「グリセリド」は、C<sub>4</sub>~C<sub>30</sub>の飽和または不飽和脂肪酸のグリセロールエステルを意味するものとする。

【0048】

「GRF」は、成長ホルモン放出因子を表わす。

「GnRH」は、ゴナドトロピン放出ホルモンを表わす。

「HPH」は、高圧均質化を表わす。

【0049】

「LD」は、レーザー回折分析を表わす。

「LHRH」は、黄体形成ホルモン放出ホルモンを表わす。

「脂質」は、本発明によれば、水には難溶性であるが有機溶媒には可溶性である物質を

10

20

30

40

50

表わす。本発明によれば、脂質には脂肪酸、モノ -、ジ - およびトリ - グリセリド、リン脂質、PEG - グリセリド、糖 - グリセリドまたはろう、並びにそのいずれかの混合物が含まれる。本発明によれば、脂質マトリックスは常に医薬的に許容できるものとする。

【0050】

「LM」は、脂質マイクロ粒子を表わす。

「マイクロ粒子」は、その平均直径が3 ~ 500 μmにある粒子を表わす。

「モノグリセリド」は、下記に示すようにグリセロールアルコール官能基の1つを脂肪酸でエステル化することにより：



(式中のR<sup>1</sup>はC<sub>4</sub> ~ C<sub>30</sub>の飽和または不飽和炭化水素鎖である)、またはトリグリセリドの加水分解により得られる化合物を表わす。

【0051】

「NMR」は、核磁気共鳴を表わす。

「PCS」は、光子相関分光分析を表わす。

「PEG」は、ポリエチレングリコールを表わす。

【0052】

「ペプチド」は、アミド基間に四面体炭素原子を含むポリアミド主鎖を意味する。ペプチド鎖はアミノ酸の縮合により得られる：1つのアミノ基が次のカルボキシル基に結合してペプチド結合を形成する。

【0053】

「医薬的に許容できる」は、有効成分の生物活性の有効性を妨害せず、かつそれを投与する宿主に対して無毒性である物質を意味するものとする。

「タンパク質」は、ポリペプチドアミノ酸配列を含む分子を表わす。ペプチドとタンパク質の主な相異はサイズの相異である。本発明によれば、ペプチドは100個以下のアミノ酸を含有し、一方タンパク質は100個を超えるアミノ酸を含有する。

【0054】

「PUK」は、プロ - ウロキナーゼを表わす。

「糖(糖質)」は、少なくとも2個のヒドロキシル基をもつアルデヒド基またはケトン基を表わす。糖は幾つかの形態をとる：モノマー形(単糖)、ダイマー形(二糖)、トリマー形(三糖)、オリゴマー(オリゴ糖)およびポリマー(多糖)。

【0055】

「SOD」は、スーパーオキシドジスムターゼを表わす。

「溶媒ストリッピング法」は、溶媒に溶解した薬物(すなわちペプチド)を、融解または溶媒中で溶解した担体材料(すなわち脂質)に充填する方法を表わす。

【0056】

「治療上有効量」とは、前記疾患の経過および重症度に影響を及ぼし、そのような病的状態の軽減または寛解に十分な量を表わす。この有効量は投与経路および患者の状態に依存するであろう。

【0057】

「TNF」は、腫瘍壊死因子を表わす。

「tPA」は、組織プラスミノゲン活性化因子を表わす。

「UK」は、ウロキナーゼを表わす。

【0058】

「w/w」は、重量/重量を表わす。

本発明を幾つかの実施例により説明する。これらは、種々の脂質に各種方法を採用して種々の薬物を充填し、異なる放出速度を得るのが可能であることを証明する。ただしこれらは本発明の範囲を限定するためのものではない。実施例では添付の図面を参照する。

【0059】

実施例

10

20

30

40

50

以下に報告する実施例で用いたペプチドはアンタイドである。このペプチドは、下記のデータが証明するように両親媒性をもつ。

【 0 0 6 0 】

表面張力分析： Kruss張力計（液滴形状分析システム）を用いて種々の薬物濃度、すなわち 0.01、0.1、1.0、10 mM のアンタイド水溶液について表面張力測定を実施した。結果を図 1 に示す。

【 0 0 6 1 】

分配係数： 有機相としてオクタノールを、親水相として水を用いて測定した。この 2 相をまず室温で 24 時間、互いに飽和させた。次いでアンタイドを飽和より十分低い濃度で水相に溶解した。次いで等量の有機相を水相に添加し、混合物を室温で 24 時間、攪拌し続けた。2 相のアンタイド濃度を RP-HPLC により測定し、有機相と水相の薬物濃度比から分配係数を求めた。

【 0 0 6 2 】

得られたオクタノール/水係数は  $8.56 \times 10^{-2}$  であった。

数種類の脂質中におけるアンタイド準定量的溶解度評価の結果を、脂質モノグリセリド含量と共に表 1 に示す。

【 0 0 6 3 】

材料および装置：

アンタイドバルク、Bachem。

Imwitor 900（グリセリルモノステアレート）、Condea Chemie - D E。

【 0 0 6 4 】

Compritol E ATO（グリセリルモノベヘネート）、Gattefosse - F R。

Compritol 888 ATO（グリセリルベヘネート）、Gattefosse - F R。

Imwitor 312（ラウリン酸モノグリセリド）、Condea Chemie - D E。

【 0 0 6 5 】

Imwitor 928（グリセリルモノ - ノジ - ココエート）、Condea Chemie - D E。

Geleol（グリセリルモノ - パルミテート / ステアレート）、Gattefosse - F R。

Compritol HD 5 ATO（グリセリル / ポリエチレングリコール ベヘネート）、Gattefosse - F R。

【 0 0 6 6 】

Superpolystate（ポリエチレングリコールステアレート）、Gattefosse - F R。

Precirol ATO 5（グリセリルモノ - ノジ - ノトリ - パルミテート / ステアレート）、Gattefosse - F R。

【 0 0 6 7 】

Witepsol E 85（ $C_{10} \sim C_{18}$  飽和脂肪酸トリグリセリド）、Massa Witepsol。

Softisan 142（水素化ヤシグリセリド）、Condea Chemie - D E。

Gelot 64（グリセリル / ポリエチレングリコールパルミテート / ステアレート）、Gattefosse - F R。

【 0 0 6 8 】

Monosteol（プロピレングリコールパルミテート / ステアレート）、Gattefosse - F R

。 Gelucire 44/14（特定ブレンド：グリセロールおよびポリエチレングリコールのラウリン酸モノ - ノジ - ノトリ - エステル）、Gattefosse - F R。

【 0 0 6 9 】

Gelucire 50/13（特定ブレンド：グリセロールおよびポリエチレングリコールのステアリン酸モノ - ノジ - ノトリ - エステル）、Gattefosse - F R。

セチルアルコール、Sigma。

【 0 0 7 0 】

エタノール、Merck - D。

ベンジルアルコール、Sigma - U S A。

10

20

30

40

50

I F N - 液体製剤 ( R E B I F ( 登録商標 ) - Serono ) 。

【 0 0 7 1 】

真空オープン O V A 0 3 1 . X X 1 . 5、Sanyo Gallenkamp；真空ポンプ L A . 1 2、D . V . P . Vacuum Technology。

自動ふるいシステム、Retsch AS 200。

【 0 0 7 2 】

レーザー回折計 Mastersizer Microplus MAF 5001、Malvern。

Waters H P L C システム：2 6 9 0 分離モジュール；R P カラム、Jupiter 5 μ m C 1 8 ( 2 5 0 × 4 . 6 mm、5 μ m )；2 4 8 7 二重 吸光度検出器

低温ミル - A p e x、M o d . M P X 3：下記のように特注：

これらの試験に用いた低温ミルは、冷却ガス（すなわち液体窒素）をチャンバーへ導入するのに適したノズルを備えた一般的なハンマーミルである。予備摩砕試験後、本発明者らの要求にさらに適切なものにするためにミルを特注した。下記の改変を行った：

- 粉砕チャンバーの温度測定のために検温プローブを導入した；
- 粉砕チャンバーからの粉末損失を避けるために底スクリーンを盲ブレードでシールした；

- 粉砕チャンバーへの粉末導入のためにピストンを取り付けた；

- 断熱パイプで液体窒素タンクに接続した。

【 0 0 7 3 】

実施例 1： 2 % 薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとして Compritol E ATO を用いて溶媒ストリッピング法により製造

重量比 2：98 のペプチド（アンタイド）および脂質（Compritol E ATO）を 85 で有機溶媒（ベンジルアルコールとエタノールの混合物、1：5）に攪拌下で溶解した。溶媒を真空下に 80 で蒸発させた。次いで脂質マトリックスを室温に冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉砕した。最後にマイクロスフェアを 125 μ m でふるい分けし、採集した。

【 0 0 7 4 】

実施例 2： 2 % 薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとして Imwitor 900 を用いて溶媒ストリッピング法により製造

重量比 2：98 のペプチド（アンタイド）および脂質（Imwitor 900）を 80 で有機溶媒（ベンジルアルコールとエタノールの混合物、1：2）に攪拌下で溶解した。溶媒を真空下に 60 で蒸発させた。次いで脂質マトリックスを室温に冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉砕した。最後にマイクロスフェアを 125 μ m でふるい分けし、採集した。

【 0 0 7 5 】

実施例 3： 2 % 薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとして Compritol E ATO を用いて共融法により製造

ペプチド（アンタイド）を融解脂質（Compritol E ATO）に攪拌下で取り込ませた（薬物 - 脂質重量比は 2：98）。次いで脂質マトリックスを氷浴中で冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉砕した。最後にマイクロスフェアを 125 μ m でふるい分けし、採集した。

【 0 0 7 6 】

実施例 4： 2 % 薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとして Imwitor 900 を用いて共融法により製造

脂質（Imwitor 900）をその融点より 15 高い温度で融解させた。次いでペプチド（アンタイド）を融解脂質に攪拌下で取り込ませた（薬物 - 脂質重量比は 2：98）。次いで脂質マトリックスを氷浴中で冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉砕した。最後にマイクロスフェアを 125 μ m でふるい分けし、採集した。

【 0 0 7 7 】

実施例 5： I F N - を充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとして Imwito

r 900およびImwitor 312 ( 2 5 : 7 5 ) を用いて共融法により製造

粉末状のImwitor 900とImwitor 312を固体状態で混合し、次いで $58 \pm 2$  に温度調節した水浴中で共融させた。IFN - 液体製剤 ( $245 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を、 $58 \pm 2$  に保持した融解脂質に添加し、穏やかに攪拌しながら20分以内に溶解させた。次いでこの素材を室温で放冷し、手動で粗い粒子に砕き、 $-80$  に保存した。粉碎前にIFN - 脂質製剤を少なくとも12時間、 $-80$  に保持した。操作条件としてローター速度18000rpmおよびスクリーンサイズ0.5mmを用いて摩砕を実施した。摩砕した材料を4 に保持した。レーザー回折計を用いて脂質マイクロ粒子特性をその粒度分布により解明した。粒度分析結果を表6に報告する。

【0078】

実施例6： 10%薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとしてCompritol E ATOを用いて溶媒ストリッピング法により製造

重量比1：9のペプチド（アンタイド）および脂質（Compritol E ATO）を $85$  で有機溶媒（ベンジルアルコール）に攪拌下で溶解した。溶媒を真空下に $85$  で蒸発させた。次いで脂質マトリックスを室温に冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉碎した。最後にマイクロスフェアを $125 \mu\text{m}$ でふるい分けし、採集した。

【0079】

実施例7： 20%薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとしてCompritol E ATOを用いて溶媒ストリッピング法により製造

重量比1：4のペプチド（アンタイド）および脂質（Compritol E ATO）を $85$  で有機溶媒（ベンジルアルコール）に攪拌下で溶解した。溶媒を真空下に $85$  で蒸発させた。次いで脂質マトリックスを室温に冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉碎した。最後にマイクロスフェアを $125 \mu\text{m}$ でふるい分けし、採集した。

【0080】

実施例8： 2%薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとしてCompritol 888 ATOを用いて共融法により製造

ペプチド（アンタイド）を融解脂質（Compritol 888 ATO）に攪拌下で取り込ませた（薬物 - 脂質重量比は2：98）。次いで脂質マトリックスを氷浴中で冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉碎した。最後にマイクロスフェアを $125 \mu\text{m}$ でふるい分けし、採集した。

【0081】

実施例9： 2%薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとしてCompritol 888 ATOを用いて溶媒ストリッピング法により製造

重量比2：98のペプチド（アンタイド）および脂質（Compritol 888 ATO）を $85$  で有機溶媒（ベンジルアルコール）に攪拌下で溶解した。溶媒を真空下に $85$  で蒸発させた。次いで脂質マトリックスを室温に冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉碎した。最後にマイクロスフェアを $125 \mu\text{m}$ でふるい分けし、採集した。

【0082】

実施例10： 10%薬物充填した脂質マイクロ粒子：脂質マトリックスとしてCompritol 888 ATOを用いて溶媒ストリッピング法により製造

重量比1：9のペプチド（アンタイド）および脂質（Compritol 888 ATO）を $85$  で有機溶媒（ベンジルアルコール）に攪拌下で溶解した。溶媒を真空下に $85$  で蒸発させた。次いで脂質マトリックスを室温に冷却し、予備摩砕し、そして低温条件下で微粉碎した。最後にマイクロスフェアを $125 \mu\text{m}$ でふるい分けし、採集した。実施例1～10の記載に従って製造した脂質マイクロ粒子の特性解明を以下に報告する。

【0083】

実施例11： 封入効率の測定

脂質マイクロ粒子のアンタイド含量をRP - HPLCにより測定した：アンタイド充填した脂質マイクロ粒子50mgをまず5mLのアセトンに溶解し、振とうし、2分間超音波処理した。5mLの蒸留水をアセトン溶液に添加した。得られた混合物を2分間超音波

10

20

30

40

50

処理し、次いで8000rpmで15分間遠心した。

【0084】

透明な溶液をHPLCカラムに注入した。数種類の脂質マイクロ粒子配合物の封入効率値を以下に示す。封入効率を下記に従って計算した：

【0085】

【数1】

$$\text{封入効率\%} = \frac{\text{薬物含量 (HPLC アッセイ)}}{\text{理論薬物含量}} \times 100$$

10

【0086】

表2に記載するように、両方の薬物取込み法および両方の被験脂質について満足すべき封入効率が達成されたことが分かる。

実施例12：脂質マトリックス内におけるペプチド安定性の測定

2種類のアンタイド充填Imwitor 900配合物について、前の節の記載に従ってt = 0およびt = 3カ月目に脂質マイクロ粒子の薬物含量をRP-HPLCにより測定した。結果を表3に示す。

【0087】

実施例13：マイクロ粒子の物理化学的特性解明

脂質マイクロ粒子の完全な物理化学的特性解明を、それらの粒度分布（レーザー回折計分析）、脂質マトリックスの表面分析、およびNMR検査を評価することにより行った。125μm未満の粒子は皮下投与に適するので、その画分の重量収率も測定した。

【0088】

アンタイド充填した脂質マイクロ粒子配合物の粒度および粒度分布を、Malvernレーザー回折計を用いるレーザー回折分析（LD）により評価した。少量の脂質マイクロ粒子（約40mg）を50μLのTween 20に分散させ、次いで5mLの脱イオン水中に希釈して、5～30%の混濁値を得た。分析中、試料を分散ユニット内で循環し続けた。各試料につき少なくとも3回の測定値を求め、フラウンホッフ回折モデルによりデータを処理した。

30

【0089】

LD頻度曲線、ならびに下記のように集団の粒度分布を定めるD(v, 0.1)、D(v, 0.5)およびD(v, 0.9)パラメーター：

- D(v, 0.1) = 10% (体積) の粒子がこの数値未満のサイズをもつ；
- D(v, 0.5) = 50% (体積) の粒子がこの数値未満のサイズをもつ；
- D(v, 0.9) = 90% (体積) の粒子がこの数値未満のサイズをもつ；

の例を、図3および表4に示す。これらから分かるように、両方の製造方法で同様なマイクロ粒子粒度分布が得られ、主に1～125μmからなっていた。

【0090】

Kruss張力計（液滴形状分析システム）を用いて、脂質マトリックスの接触角分析を行った。接触角は、液滴とそれが展着している表面の角度である。それは0°（完全ぬれを表わす）または180°（ぬれが有意でない）の可能性もある。接触角はこれらの限界値の間の数値をもつ可能性もある。

40

【0091】

水を用い、記載した製造方法に従って脂質マトリックスを製造して分析を行った。ストリップ処理したアンタイド充填脂質マトリックスと共融したものとの表面分析結果の比較を表5に示す。

【0092】

驚くべきことに、2つの製造方法は著しく異なる°値を示した。これは、ストリップ処理したマトリックスは共融マトリックス（より親水性）より水にかなりぬれにくい（よ

50

り親油性)ことを意味し、かつマトリックス中と粒子中の脂質成分の構造配列様式が著しく異なることを示すと思われる。薬物の存在は脂質マトリックスの表面特性を有意には変化させなかった。したがってマトリックスのぬれやすさは取り込まれた薬物により影響されないと思える。

#### 【0093】

脂質マトリックスの特性を固相NMR分析により解明した。バルク薬物中および前記の各方法で製造した脂質マトリックス中におけるアンタイド立体配座の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを図4および5に示す。驚くべきことに、バルクアンタイドにみられた幅広いピーク(ピリジン残基3、5、6について)は、この薬物を溶媒ストリッピング法で取り込ませた場合にはなお存在するが、共融法により薬物を充填した場合には同じピークが有意に先鋭になる。これは、2種類のマトリックス内における薬物構造および薬物-脂質系全体の構造配列様式が、用いる製造方法および組成に依存することを証明するものである。これは、共融法を用いた場合は薬物分子の「マイクロドメイン」が存在し、これに対し溶媒ストリッピングによれば真の「固溶体」が形成されることに起因すると思われる。

10

#### 【0094】

##### 実施例14: *in vitro*放出速度パターン評価:

脂質マイクロ粒子からのアンタイド放出を、放出媒体として水(保存剤として+NaNO<sub>3</sub> 0.05%)またはPBS(リン酸塩緩衝塩類溶液)を用いて評価した。約40mgの脂質マイクロ粒子を20mLの放出媒体に懸濁して実験を行った。これらの懸濁液を37°Cに温度調節した水浴中で攪拌し続けた。テフロン(登録商標)注射器および0.2μmAcrodiscフィルターを用いて、1mLの試料を種々の時点で取り出した。濾過した脂質マイクロ粒子を容器に戻し、等量の放出媒体を再導入した。

20

#### 【0095】

種々の脂質マイクロ粒子配合物の放出プロフィールを図6に示す。予想外に、これらの配合物すべてについて「バースト効果」が著しく低下した。ある配合物については1時間以内10%未満にまで低下したことは注目すべきである。さらに、試験した種々の脂質すべてについて、溶媒ストリッピングしたマトリックスの方が低い放出速度を示した。これは、接触角測定で証明されるようにその表面のぬれやすさがより低いこと、および $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルが示すように共融マイクロ粒子中に薬物クラスターが存在することにより説明される。

30

#### 【0096】

溶媒ストリッピング法で得たCompritol E AT0マトリックスの場合、ほぼ「ゼロオーダー」の放出速度が達成されたことは注目すべきである。これは、抗がん剤の長期投与の場合にきわめて望ましいプロフィールである。生物分解性マイクロスフェア系ではゼロオーダーの薬物放出速度は通常は達成できないので、これは確かに予想外の現象である。

#### 【0097】

驚くべきことに、少なくとも試験した2~20%w/wの範囲内ではこの「準ゼロオーダー」の放出はほとんど薬物充填と無関係と思われる。事実、図6から分かるように、10%充填Compritol E AT0脂質マイクロ粒子からの最初の24時間以内でのアンタイドの放出画分およびその放出速度は、対応する2%充填マトリックスについて得たものに匹敵する。マイクロ粒子システムからの薬物バーストは薬物充填量に伴って著しく増加することが一般に観察されているので、これは全く予想外である。

40

#### 【0098】

さらに驚くべきことに、Compritol E AT0マトリックスからの薬物放出はImwitor 900マトリックスからの放出速度より低かった。これは、脂質担体のグリセリド組成および物理化学的特性の相異に起因すると思われる。

#### 【0099】

##### 生物学的結果

##### 実施例15: *in vitro*アッセイ

図2に示す結果から、脂質マイクロ粒子製造方法が薬物活性を大きく変化させないこと

50

が確認される。これは、下記に従って実施したラット下垂体細胞アッセイにおいて証明された。

【0100】

雌ラットから摘出した下垂体をまず酵素消化し、ラット下垂体細胞の初代培養を樹立した。回収した細胞を24ウェルプレートに $2.5 \times 10^5$ 個/ウェルで接種し、37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>で72時間培養した。

【0101】

ウェルを3回洗浄し、次いで0.75、1.5、3、6および12 ng/mlの2種類の脂質マイクロ粒子-アンタイド配合物または社内標準試料アンタイドについて三重試験法で24時間処理した。基底レベルおよび最大レベルの分泌LHウェルには培地のみを入れた。

10

【0102】

次いで洗浄した後、試料および標準アンタイド希釈液を新たなものと交換し、等量の培地を入れた基底ウェル以外のすべてのウェルにLHRH ( $10^{-8}$  M)を添加した。4時間のインキュベーション(37°C、5%CO<sub>2</sub>)後、各ウェルから調製培地を採集し、LH含量をアッセイするまで-20°Cに保存した。

【0103】

分泌LHの評価のために、市販RIA (Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。結果をアンタイドによるLH分泌阻害率%として表わした。

ラット下垂体細胞において脂質マイクロ粒子によるin vitro LH分泌阻害を評価することにより、本発明のマイクロ粒子製造方法はペプチドの生物学的統合性を低下させないことが証明された。図1の結果は、試験した製剤においてアンタイドの生物活性が保持されていることを示す。

20

【0104】

実施例16: in vivoアッセイ

成体(63~70日齢および約300g) Sprague Dawley雄ラットをこの試験に用いた。飼料をすべての動物に「自由」摂取させた。飲料水も動物に「自由」摂取させた。

【0105】

アンタイドの脂質マイクロ粒子を含有する被験配合物を、アンタイド0.6 mg (約2 mg/kg)の1回皮下投与量として、各グループのラットに皮下経路で投与した。アンタイドの脂質マイクロ粒子は、0.05%のTween 20を含有する約5%のグルコース水溶液で投与された。

30

【0106】

ビヒクルのマイクロ粒子含量は約50 mg/mlであった。投与量はラット1匹につき1 mLであった。

下記の実験計画に従った。

【0107】

【表1】

群										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
被験粒子	Amide	Amide μ粒子 配合物1	Amide μ粒子 配合物2	Amide μ粒子 配合物3	Amide μ粒子 配合物4	Amide μ粒子 配合物1	Amide μ粒子 配合物2	Amide μ粒子 配合物3	Amide μ粒子 配合物4	Placebo μ粒子
Antide量 (mg)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0
各群 ラット数	3	3	3	3	3	36	36	36	36	12
採血	0.5, 1.2, 4, 8, 24 h	0.5, 1.2, 4, 8, 24 h	0.5, 1.2, 4, 8, 24 h	0.5, 1.2, 4, 8, 24 h	0.5, 1.2, 4, 8, 24 h	0.2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 日	0.2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 日	0.2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 日	0.2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 21, 30 日	1, 4, 8, 14 日

10

20

30

## 【0108】

配合物1：アンタイド（2% w/w） - Compritol E ATO（ストリップング）

配合物2：アンタイド（2% w/w） - Imwitor 900（ストリップング）

配合物3：アンタイド（2% w/w） - Compritol E ATO（共融）

配合物4：アンタイド（2% w/w） - Imwitor 900（共融）。

40

## 【0109】

これらの配合物を、投与前一晚絶食させた動物に投与した。

第1～5群の動物から約0.5～1 mlの血液を、8時間までの各サンプリング時間に舌下または尾静脈より採取した。24時間目（第1群については72時間）に動物をエーテルで麻酔し、腹部大動脈からの放血により殺した。

## 【0110】

50

第5～8群の動物を、指示したサンプリング時点で腹部大動脈からの放血によりサンプリングした。

ヘパリン添加試験管内に血液を採集し、4 での遠心(2500×g)により血漿を分離した。殺した時点で得た血漿を少なくとも1mlずつ3つのアリコートに分割した。

【0111】

アンタイドの血漿濃度を、質量分析検出を伴うHPLC法(HPLC/MS/MS)により測定した。

殺した時点で得たすべての血漿試料について、薬理マーカーであるテストステロンを測定した。

【0112】

テストステロンレベルをDiagnostic Product Corporation(DPC)製RIAキットにより測定した。

アンタイドおよびテストステロン血漿レベルを、投与後の異なる時点で測定した。それらの結果を図8および図9に示す。in vitro溶解速度試験でみられた「バースト低下」が、最初の24時間以内に血漿プロフィルから確認される。1カ月間の観察中、薬物のPKプロフィルおよびテストステロン抑制に及ぼすPD作用の両方とも、送達システムの持続放出性能と一致した。

【0113】

【表 2】

表1: 予備スクリーニングした脂質におけるアンタイド最大充填量、および脂質のモノグリセリド含量

製品	脂質		充填量
	化学組成	モノグリセリド含量(%)	Antide充填量(%)
Imwitor 312	ラウリン酸モノグリセリド	95.30	2.2
Imwitor 900*	グリセリル モノ-/ジ-ステアレート	40-50	2.0
Imwitor 928	グリセリル モノ-/ジ-ココエート	43.5	$8.5 \times 10^{-1}$
Gelcol	グリセリル モノ-/パルミテート/ステアレート	35	1.8
Compritol E ATO	グリセリル モノ-/ジ-トリベヘネート	80.40	1.7
Compritol 888 ATO	グリセリルベヘネート	12-18	$4.3 \times 10^{-1}$
Compritol HD 5 ATO	グリセリル/ポリエチレングリコール ベヘネート	1	$1.7 \times 10^{-2}$
Superpolystate	ポリエチレングリコールステアレート	<1	$1.7 \times 10^{-1}$
Precirol ATO 5	グリセリル モノ-/ジ-トリ-パルミテート/ステアレート	8-17	$5.9 \times 10^{-2}$
Witepsol E 85	C <sub>10</sub> ~C <sub>18</sub> 飽和脂肪酸トリグリセリド	<1	$1.4 \times 10^{-2}$ - 不溶性
Softisan 142	水素化ヤシグリセリド	<1%	$1.7 \times 10^{-2}$ - 不溶性
Gelot 64	グリセリル/ポリエチレングリコールパルミテート/ステアレート	<1%	$5.8 \times 10^{-2}$ - 不溶性
Monoctecol	ポリエチレングリコールパルミテート/ステアレート	<1%	$3.2 \times 10^{-2}$ - 不溶性
Gelucire 44/14	特定ブレンド:グリセロールおよびポリエチレングリコールのラウリン酸モノ-/ジ-トリ-エステル	<1%	$4.0 \times 10^{-2}$ - 不溶性
Gelucire 50/13	特定ブレンド:グリセロールおよびポリエチレングリコールのステアリン酸モノ-/ジ-トリ-エステル	<1%	$3.0 \times 10^{-2}$ - 不溶性
セチルアルコール	セチルアルコール	<1%	$3.7 \times 10^{-4}$ - 不溶性
Tagat S		<1%	$2.7 \times 10^{-4}$ - 不溶性

【 0 1 1 4 】

10

20

30

## 【表 3】

表 2： 2種類の方法（溶媒ストリッピングおよび共融）を用いて脂質マトリックスへアンタイドを取り込むことにより得た数種類の脂質マイクロ粒子配合物の封入効率

	封入効率 (%)
2%アンタイド-Compritol E ATO 脂質マイクロ粒子 (ストリップ)	88.5
2%アンタイド-Imwitor 900 脂質マイクロ粒子 (ストリップ)	89.8
2%アンタイド-Compritol E ATO 脂質マイクロ粒子 (共融)	92.0
2%アンタイド-Imwitor 900 脂質マイクロ粒子 (共融)	92.9

10

## 【0115】

## 【表 4】

20

表 3： 共融およびストリッピング処理 Imwitor マトリックスのアンタイド含量 (% w/w)、t = 0 および 3ヶ月後、RP-HPLCにより測定

	アンタイド含量 (% w/w)	
	t = 0	t = 3ヶ月
アンタイド-Imwitor 900 脂質マイクロ粒子、共融	1.7	1.8
アンタイド-Imwitor 900 脂質マイクロ粒子、ストリッピング	1.7	1.7

30

## 【0116】

## 【表 5】

表 4： 2 種類の脂質マイクロ粒子配合物の D (v, 0. 1)、D (v, 0. 5) および D (v, 0. 9) パラメータ

	D (v, 0.1) ( $\mu\text{m}$ )	D (v, 0.5) ( $\mu\text{m}$ )	D (v, 0.9) ( $\mu\text{m}$ )
2%アンタイド充填 Imwitor 900 共融マトリックス	3.72	29.27	72.90
2%アンタイド充填 Compritol E ATO ス トリッピング処理マトリックス	6.38	40.65	94.09

10

## 【 0 1 1 7 】

## 【表 6】

表 5： 2 種類の方法：共融とストリッピング処理により得た Imwitor 900 マ  
トリックス（プラセボとアンタイド充填）の接触角の比較

20

	接触角 ( $\theta^\circ$ )	
	共融マトリックス	ストリッピング処理 マトリックス
プラセボ-Imwitor 900 マトリックス	36.42 $^\circ$	106.37 $^\circ$
2%アンタイド充填- Imwitor 900 マトリックス	34.49 $^\circ$	100.53 $^\circ$

30

## 【 0 1 1 8 】

## 【表 7】

表 6 : 共融法を用いた I F N 充填脂質マイクロ粒子の粒度分布

	% < 125 $\mu\text{m}$	D (v, 0.5) ( $\mu\text{m}$ )	D (v, 0.9) ( $\mu\text{m}$ )
	100	10.12	29.03
	100	8.78	22.23
	99.96	5.75	11.71
平均	99.99	8.22	20.99
標準偏差	0.02	2.24	8.73

10

## 【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 9 】

【図 1】種々の薬物濃度のアンタイド水溶液の表面張力に関するものである。

20

【図 2】種々の脂質マトリックスに取り込ませたアンタイドの *in vitro* 生物活性の評価を示す。配合物 A = 2 % アンタイド - 充填 Compritol E AT0 共融マトリックス。配合物 B = 2 % アンタイド - 充填 Compritol E AT0 ストリッピング処理マトリックス。

【図 3】2 % アンタイド - 充填 Imwitor 900 共融脂質マイクロ粒子 ( a )、および 2 % アンタイド - 充填 ストリッピング処理 Compritol E AT0 脂質マイクロ粒子 ( b ) の LD 頻度 (釣鐘形) およびふるい下体積 ( S 字形 ) 曲線を示す。

【図 4】バルク薬物 ( B ) および 20 % のアンタイドを含有する ストリッピング処理 Imwitor 900 マトリックス ( A ) について得た固相  $^{13}\text{C}$  - NMR スペクトルを示す。

【図 5】バルク薬物 ( B ) および 10 % のアンタイドを含有する共融 Imwitor 900 マトリックス ( A ) について得た固相  $^{13}\text{C}$  - NMR スペクトルを示す。

30

【図 6】種々の 2 % ( w / w ) アンタイド - 充填脂質マトリックスからのアンタイド累積放出プロファイルを示す。

【図 7】種々の薬物充填量の Compritol E AT0 ストリッピング処理マトリックスからのアンタイド放出を示す。

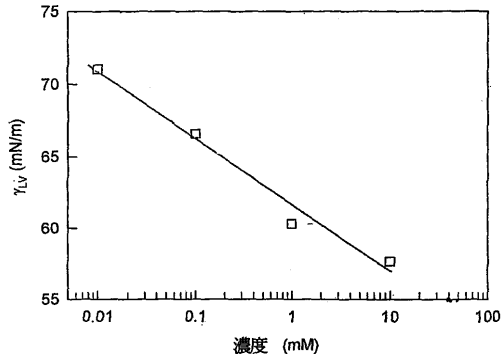
【図 8】2 % アンタイド - 充填脂質マトリックスをラットに *in vivo* 皮下投与した後のアンタイド血漿濃度 / 時間プロファイルを示す。

【図 9】図 8 の説明に述べた 4 種類の脂質マイクロ粒子配合物をラットに皮下投与した後のテストステロン血漿濃度に関するものである。配合物 1 : アンタイド ( 2 % w / w ) - Compritol E AT0 ( ストリッピング ) 配合物 2 : アンタイド ( 2 % w / w ) - Imwitor 900 ( ストリッピング ) 配合物 3 : アンタイド ( 2 % w / w ) - Compritol E AT0 ( 共融 ) 配合物 4 : アンタイド ( 2 % w / w ) - Imwitor 900 ( 共融 ) 。

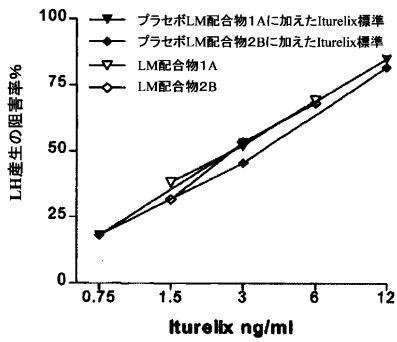
40

【図 10】脂質マイクロ粒子 - アンタイド 2 % - Compritol C888 ( バッチ 9 3 ) および脂質マイクロ粒子 - アンタイド 2 % - Compritol E AT0 ( バッチ 1 0 6 ) の水中放出プロファイルを示す図である。Compritol 888 は 12 ~ 18 % のモノグリセリド含量をもち、一方 Compritol E AT0 は約 80 % のモノグリセリド含量をもち。

【図1】

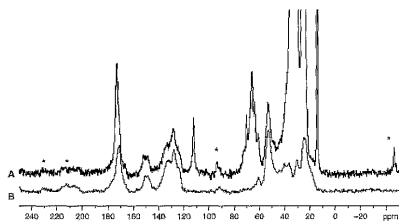


【図2】



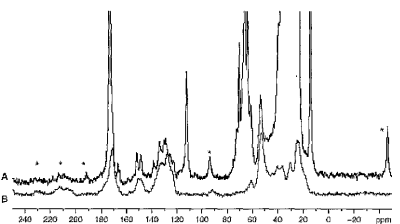
【図4】

Figure 4



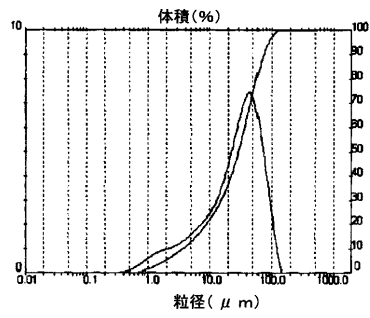
【図5】

Figure 5

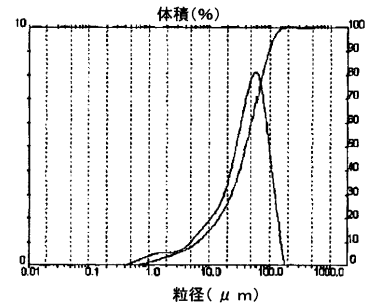


【図3】

(a)

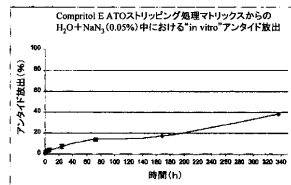


(b)

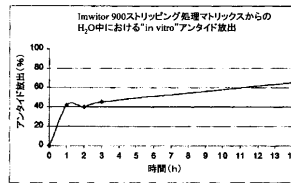


【図6】

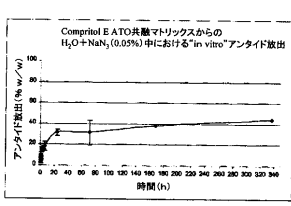
(a)



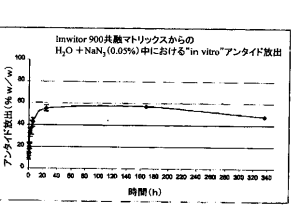
(b)



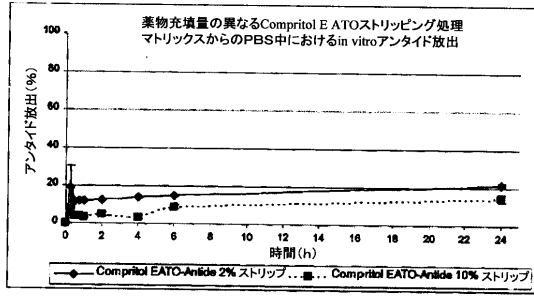
(c)



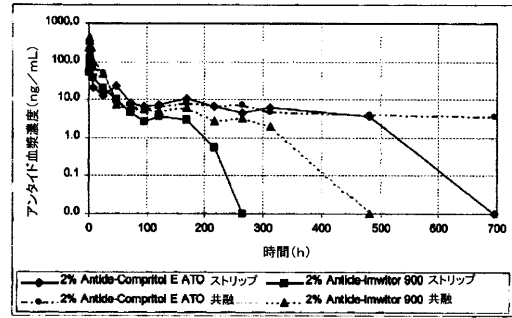
(d)



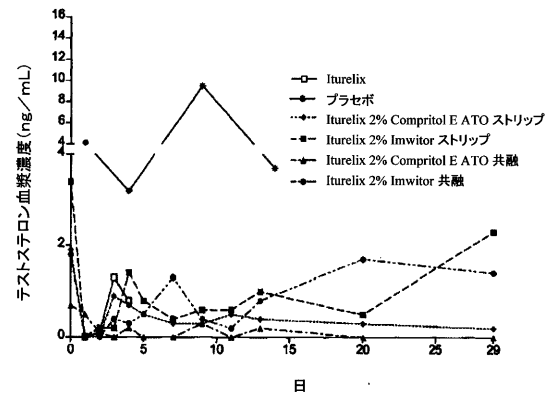
【 図 7 】



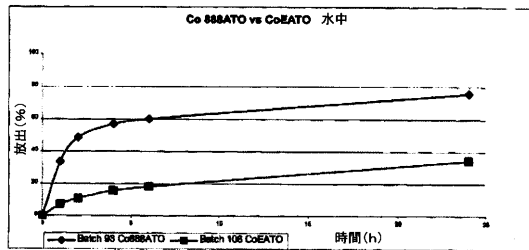
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- |                         |               |
|-------------------------|---------------|
| A 6 1 K 47/34 (2006.01) | A 6 1 K 47/34 |
| A 6 1 P 5/30 (2006.01)  | A 6 1 P 5/30  |
| A 6 1 P 15/18 (2006.01) | A 6 1 P 15/18 |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |
- (74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行
- (74)代理人 100091638  
弁理士 江尻 ひろ子
- (72)発明者 ドーリー, デル・カート・マリア  
イタリア国アイ - 2 7 0 5 0 コーヴィノ・サン・キリコ, ヴィア・オラトリオ 4
- (72)発明者 チッコ, ダニエラ  
イタリア国アイ - 1 0 0 1 0 カラヴィノ, ヴィア・サン・ソルトレ 1
- (72)発明者 エスポシト, ピエランドレア  
イタリア国アイ - 1 0 0 1 5 イヴレア, ヴィア・ラゴ・エス・マイケル 1 2 / ビー

## 合議体

審判長 星野 紹英  
審判官 内藤 伸一  
審判官 上條 のぶよ

- (56)参考文献 特開昭 6 3 - 4 8 2 2 3 ( J P , A )  
特表平 9 - 5 1 0 7 0 8 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K38/00  
A61K9/50  
CAPLUS(STN)  
MEDLINE(STN)  
EMBASE(STN)  
BIOSIS(STN)