

(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2005-506990

(P2005-506990A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 K 9/10  
 A 6 1 K 9/107  
 A 6 1 K 9/48  
 A 6 1 K 47/10

F I

A 6 1 K 37/02  
 A 6 1 K 9/10  
 A 6 1 K 9/107  
 A 6 1 K 9/48  
 A 6 1 K 47/10

テーマコード (参考)

4 C O 7 6  
 4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-535753 (P2003-535753)  
 (86) (22) 出願日 平成14年10月17日 (2002.10.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年4月16日 (2004.4.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2002/001561  
 (87) 国際公開番号 W02003/032949  
 (87) 国際公開日 平成15年4月24日 (2003.4.24)  
 (31) 優先権主張番号 60/346, 201  
 (32) 優先日 平成13年10月19日 (2001.10.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/370, 597  
 (32) 優先日 平成14年4月5日 (2002.4.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

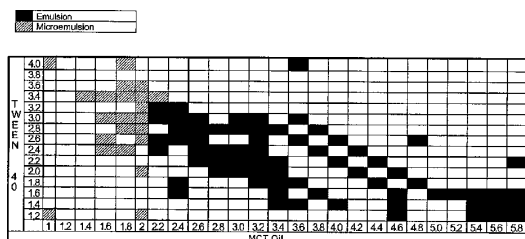
(71) 出願人 504151756  
 アイソテクニカ インコーポレーテッド  
 カナダ、アルバータ T 6 G 2 C 8、エ  
 ドムントン、8 2 1 5 1 1 2 ストリ  
 ト、カレッジ プラザ 2 1 0 0  
 (74) 代理人 110000187  
 特許業務法人ウィンテック  
 (72) 発明者 セルヴァレイ ネイッカー  
 カナダ、アルバータ T 6 J 3 J 4、エ  
 ドムントン、3 3 0 4 1 1 7 ストリ  
 ト  
 (72) 発明者 ランダル ダブリュー ヤトコフ  
 カナダ、アルバータ T 6 R 2 Z 5、エ  
 ドムントン、ヘクター ロード 1 5 9 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規のシクロスポリン類似体のマイクロエマルジョンプレコンセントレート

## (57) 【要約】

本発明は、シクロスポリン A に構造的に類似しているシクロスポリン類似体、特にシクロスポリン A に構造的に類似しているシクロスポリン類似体の異性体混合物を含む製剤に関するものである。これらの製剤は、安定なマイクロエマルジョンプレコンセントレートを形成し、すぐれた薬剤バイオアベイラビリティを提供し、及び/又はシクロスポリン A の投与に関連する 1 種類以上の副作用を軽減することができる。これらの製剤の使用方法及び調製方法も開示される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ;
- b) ビタミン E T P G S ;
- c) M C T 油 ;
- d) ツイーン 4 0 及びツイーン 8 0 からなる群から選択される乳化剤 ; 及び
- e) エタノール

を含んでなるマイクロエマルジョンプレコンセントレート。

## 【請求項 2】

医薬製剤が、約 5 ないし約 1 0 重量 % の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7、0 % より多く約 5 0 重量 % までのビタミン E T P G S、0 % より多く約 5 0 重量 % までの M C T 油、0 % より多く約 5 0 重量 % までの乳化剤、及び約 5 ないし約 1 5 重量 % のエタノールとを含み、前記製剤は、室温では液体マイクロエマルジョンプレコンセントレートである、請求項 1 に記載のマイクロエマルジョンプレコンセントレート。 10

## 【請求項 3】

a : b : c : d : e の重量比が約 0 . 5 - 1 : 4 : 2 : 2 : 1 である、請求項 2 に記載のマイクロエマルジョンプレコンセントレート。

## 【請求項 4】

M C T 油、乳化剤、エタノール、ビタミン E T P G S、及び適量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 が完全に溶解するまで混合することを含み、前記製剤は室温で液体である、請求項 1 に記載のマイクロエマルジョンプレコンセントレートを調製する方法。 20

## 【請求項 5】

- a) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ;
- b) ビタミン E T P G S ;
- c) M C T 油 ;
- d) ツイーン 4 0 ; 及び
- e) エタノール

を含んでなる医薬製剤。

## 【請求項 6】

約 5 % ないし約 1 0 重量 % の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7、約 2 0 % ないし約 5 0 重量 % のビタミン E T P G S、約 5 % ないし約 2 0 重量 % の M C T 油、約 5 % ないし約 5 0 重量 % のツイーン 4 0、及び約 5 % ないし約 1 5 重量 % のエタノールを含んでなる、請求項 5 に記載の医薬製剤。 30

## 【請求項 7】

a : b : c : d : e の重量比が約 0 . 5 - 1 : 4 : 2 : 2 : 1 である、請求項 6 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 8】

M C T 油、ツイーン 4 0、エタノール、ビタミン E T P G S、及び適量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 が完全に溶解するまで混合することを含む、請求項 5 に記載の医薬製剤を調製する方法。 40

## 【請求項 9】

- a) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ;
- b) ビタミン E T P G S ;
- c) M C T 油 ;
- d) ツイーン 8 0 ; 及び
- e) エタノール

を含んでなる医薬製剤。

## 【請求項 1 0】

約 5 % ないし約 1 0 重量 % の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7、約 2 0 % ないし約 5 0 重量 % のビタミン E T P G S、約 5 % ないし約 2 0 重量 % の M C T 油、約 5 % ないし約 5 0 重量 % のツイ 50

ーン 80、約 5 % ないし約 15 重量 % のエタノールを含んでなる、請求項 9 に記載の医薬製剤。

【請求項 11】

a : b : c : d : e の重量比が約 0.5 - 1 : 2 : 4 : 2 : 1 である、請求項 10 に記載の医薬製剤。

【請求項 12】

MCT 油、ツイーン 80、エタノール、ビタミン E TPGS、及び適量の ISATX 247 を、ISATX 247 が完全に溶解するまで混合することを含む、請求項 9 に記載の医薬製剤を調製する方法。

【請求項 13】

10

a) 薬物学的有効量の ISATX 247 ;

b) MCT 油 ;

c) ツイーン 80 ;

d) トリアセチン ; 及び

e) エタノール

を含んでなる医薬製剤。

【請求項 14】

約 5 % ないし約 10 重量 % の ISATX 247、約 20 % ないし約 50 重量 % のトリアセチン、約 5 % ないし約 50 重量 % の MCT 油、約 5 % ないし約 50 重量 % のツイーン 80、及び約 5 % ないし約 15 重量 % のエタノールとを含んでなる、請求項 13 に記載の医薬製剤。

20

【請求項 15】

a : b : c : d : e の重量比が約 0.5 - 1 : 5 : 3 : 1 : 1 である、請求項 14 に記載の医薬製剤。

【請求項 16】

MCT 油、ツイーン 80、エタノール、トリアセチン、及び適量の ISATX 247 を、ISATX 247 が完全に溶解するまで混合することを含む、請求項 13 に記載の医薬製剤を調製する方法。

【請求項 17】

30

a) 薬物学的有効量の ISATX 247 ;

b) ツイーン 80 ;

c) ビタミン E TPGS ;

d) エタノール ; 及び

e) ミリスチン酸イソプロピル

を含んでなる医薬製剤。

【請求項 18】

約 5 % ないし約 10 重量 % の ISATX 247、約 20 % ないし約 50 重量 % のビタミン E TPGS、約 5 % ないし約 55 重量 % のミリスチン酸イソプロピル、約 5 % ないし約 50 重量 % のツイーン 80、及び約 5 % ないし約 15 重量 % のエタノールを含んでなる、請求項 17 に記載の医薬製剤。

40

【請求項 19】

a : b : c : d : e の重量比が約 0.5 - 1 : 2 : 1 : 1 : 6 である、請求項 18 に記載の医薬製剤。

【請求項 20】

ミリスチン酸イソプロピル、ツイーン 80、エタノール、ビタミン E TPGS、及び適量の ISATX 247 を、ISATX 247 が完全に溶解するまで混合することを含む、請求項 17 に記載の医薬製剤を調整する方法。

【請求項 21】

a) 薬物学的有効量の ISATX 247 ;

b) ビタミン E TPGS ;

50

- c) M C T 油 ;
- d) ツイーン 4 0 ; 及び
- e) エタノール

を含んでなる医薬製剤プレコンセントレートであって、水性メジウムと混合すると透明な安定マイクロエマルジョン溶液を形成する、前記医薬製剤プレコンセントレート。

【請求項 2 2】

約 5 % ないし約 1 0 重量 % の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7、約 2 0 % ないし約 5 0 重量 % のビタミン E T P G S、約 5 % ないし約 2 0 重量 % の M C T 油、約 5 % ないし約 5 0 重量 % のツイーン 4 0、約 5 % ないし約 1 5 重量 % のエタノールを含んでなる、請求項 2 1 に記載の医薬製剤プレコンセントレート。 10

【請求項 2 3】

a : b : c : d : e の重量比が約 0 . 5 - 1 : 4 : 2 : 2 : 1 である、請求項 2 2 に記載の医薬製剤プレコンセントレート。

【請求項 2 4】

- a) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ;
- b) ビタミン E T P G S ;
- c) M C T 油 ;
- d) ツイーン 4 0 ; 及び
- e) エタノール

20

を含んでなるマイクロエマルジョンプレコンセントレートであって、プレコンセントレート約 1 部対水性メジウム約 1 0 ないし約 1 0 0 部の割合で水性メジウムと混合すると、透明な安定マイクロエマルジョン溶液を形成する、前記マイクロエマルジョンプレコンセントレート。

【請求項 2 5】

前記水性メジウムが、水、果汁（グレープフルーツジュースを除く）、茶、ミルク及びココアからなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 6】

前記果汁がリンゴジュースである、請求項 2 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 7】

30

M C T 油、ツイーン 4 0、エタノール、ビタミン E T P G S n、及び適量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 が完全に溶解するまで混合し、その後この製剤を水性メジウムに加えて、マイクロエマルジョンプレコンセントレートを形成するまで混合することを含む、請求項 2 1 に記載の医薬製剤を調製する方法。

【請求項 2 8】

- a) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ;
- b) ビタミン E T P G S ;
- c) M C T 油 ;
- d) ツイーン 4 0 ; 及び
- e) エタノール

40

を含んでなる医薬製剤であって、皮下又は筋肉内投与に適する、前記医薬製剤。

【請求項 2 9】

エマルジョン又はマイクロエマルジョンである、請求項 1、5、9、13、又は 17 のいずれかの項に記載の医薬製剤。

【請求項 3 0】

エマルジョン又はマイクロエマルジョンプレコンセントレートである、請求項 5、9、13、又は 17 のいずれかの項に記載の医薬製剤。

【請求項 3 1】

I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 のバイオアベイラビリティが約 3 0 % より大きい、請求項 1、5、9、 50

13、17、21、又は28のいずれかの項に記載の医薬製剤。

【請求項32】

経口投与のためのものである、請求項1、5、9、13、17又は21のいずれかの項に記載の医薬製剤。

【請求項33】

さらに、保護コロイドとしての生体適合性ポリマー類、懸濁液安定剤又は増量剤、賦形剤、結合剤及び担体を含む、請求項1、5、9、13、17、21、又は28のいずれかの項に記載の医薬製剤。

【請求項34】

生体適合性ポリマーが、ポリオキシエチレングリコール化天然又は水素化植物油、クレモ  
10  
フォル（商標）、ニッコル（商標）、ツイーン類、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロ  
ピレン ブロックコポリマー類、レシチン類、プロピレングリコールモノ - 及びジ - 脂肪  
酸エステル類及びプロピレングリコール カプリル - カプリン酸ジエステルからなる群か  
ら選択される、請求項33に記載の医薬製剤。

【請求項35】

ツイーンが、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレ  
ン（20）ソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオ  
レエート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレ  
ン（20）ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリステ  
アレート、ポリオキシエチレン（4）ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン（  
20  
4）ソルビタンモノステアレート、及びポリオキシエチレン（5）ソルビタンモノオレエ  
ートからなる群から選択される、請求項34に記載の医薬製剤。

【請求項36】

免疫抑制を必要とする対象に、請求項1、5、9、13、17、21又は28のいずれか  
の項に記載の医薬製剤の有効量を投与することを含む、免疫抑制を生成する方法。

【請求項37】

投与する医薬製剤の量が、前記対象の体重1kgあたり約0.5ないし3mg/日である  
、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記医薬製剤が1日1回投与される、請求項36に記載の方法。  
30

【請求項39】

前記医薬製剤が1日2回投与される、請求項36に記載の方法。

【請求項40】

前記医薬製剤を使用して、前記対象の炎症性又は自己免疫疾患又は障害を治療する、請求  
項36に記載の方法。

【請求項41】

請求項1、5、9、13、17、21又は28のいずれかの項に記載の医薬製剤をつくる  
ことによって、ISATX 247の免疫抑制効果を増強する方法。

【請求項42】

前記プレコンセントレートを、プレコンセントレート約1部対水性メジウム約10ないし  
40  
約100部の割合で水性メジウムと混合する、請求項1、5、9、13、17、又は28  
のいずれかの項に記載の医薬製剤。

【請求項43】

前記水性メジウムが、水、果汁（グレープフルーツジュースを除く）、茶、ミルク及びコ  
コアからなる群から選択される、請求項42に記載の医薬製剤。

【請求項44】

前記果汁がリンゴジュースである、請求項43に記載の医薬製剤。

【請求項45】

経口製剤がソフトゼラチンカプセルに封入されている、請求項32に記載の医薬製剤。

【請求項46】

対象に投与した際に免疫抑制を生成するための薬剤の製造における、請求項 1、5、9、13、17、21、又は 28 のいずれかの項に記載の医薬剤の使用。

【請求項 47】

前記薬剤が、前記対象の体重 1 kg あたり前記医薬剤約 0.5 ないし 3 mg / 日の投与に適する、請求項 36 に記載の使用。

【請求項 48】

前記薬剤が 1 日 1 回投与される、請求項 36 に記載の使用。

【請求項 49】

前記薬剤が 1 日 2 回投与される、請求項 36 に記載の使用。

【請求項 50】

前記薬剤を使用して、前記対象の炎症性又は自己免疫疾患又は障害を治療する、請求項 36 に記載の使用。

【請求項 51】

ISATX 247 の免疫抑制効果を増強するための薬剤の製造における、請求項 1、5、9、13、17、21、又は 28 のいずれかの項に記載の医薬剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) 項のもとで、2002 年 4 月 5 日に提出された米国仮出願第 60 / 370,597 号 (代理人事件番号 031993 - 041) 及び 2001 年 10 月 19 日に提出された米国仮出願第 60 / 346,201 号 (代理人事件番号 031993 - 125) に対する優先権を請求する。前記 2 件の出願の開示は、本明細書にそのまま組み込まれる。

【0002】

本発明は、構造的にシクロスポリン A に類似しているシクロスポリン類似体を含有する製剤に関する。特に、これらの製剤は、シクロスポリン類似体 ISATX 247 の異性体混合物を含有する。これらの製剤は、高い薬剤溶解性、すぐれた薬剤バイオアベイラビリティをもたらし、シクロスポリン投与に関係する 1 種類以上の副作用を軽減する安定なマイクロエマルジョンを形成する。これらの製剤の使用方法及び調製方法も開示される。

【背景技術】

【0003】

下記の参考文献は、本明細書の該当部分において括弧書きの数字によって参照される。

【非特許文献 1】

1. グプタ (Gupta) 及びロビンソン (Robinson) 著、経口コントロールド - ドラッグデリバリーに関する論文、テキスト版、1992、イーグリス・カデンス (Aegis Cadence) 編、マンデル・デッカー社

【非特許文献 2】

2. トレイバー (Traber) ら著: Helv. Chim. Acta、60 巻、p. 1247 - 1255 (1977)

【非特許文献 3】

3. コベル (Kobel) ら著: Europ. J. Applied Microbiology and Biotechnology、14 巻、p. 237 - 240 (1982)

【非特許文献 4】

4. フォン ワルトバーク (von Wartburg) ら著: Progress in Allergy、38 巻、p. 28 - 45 (1986)

【非特許文献 5】

5. リッチ (Rich) ら著: J. Med. Chem.、29 巻、p. 978 (1986)

【0004】

【特許文献 1】

10

20

30

40

50

- 6 . 米国特許第 4 , 3 8 4 , 9 9 6 号、1 9 8 3 年 5 月 2 4 日発行  
 【特許文献 2】  
 7 . 米国特許第 4 , 7 7 1 , 1 2 2 号、1 9 8 8 年 9 月 1 3 日発行  
 【特許文献 3】  
 8 . 米国特許第 5 , 2 8 4 , 8 2 6 号、1 9 9 4 年 2 月 8 日発行  
 【特許文献 4】  
 9 . 米国特許第 5 , 5 2 5 , 5 9 0 号、1 9 9 6 年 6 月 1 1 日発行  
 【0 0 0 5】  
 【非特許文献 6】  
 1 0 . スケトリス ( Sketris ) ら著、Clin. Biochem.、2 8 巻 : p . 1 9 5 - 2 1 1 ( 1 9 9 5 )  
 【非特許文献 7】  
 1 1 . ベネット ( Bennett ) 著、Renal Failure、2 0 巻 : p . 6 8 7 - 9 0 ( 1 9 9 8 )  
 【非特許文献 8】  
 1 2 . ワング ( Wang ) ら著、Transplantation、5 8 巻 : p . 9 4 0 - 9 4 6 ( 1 9 9 4 )  
 【非特許文献 9】  
 1 3 . 「イーストマンのビタミン E T P G S ( Eastman Vitamin E T P G S ) 」 Eastman Brochure、Eastman Chemical Co.、Kingsport、Tenn ( 1 9 9 6 年 1 0 月 )  
 【非特許文献 1 0】  
 1 4 . ホーレイズ・コンデンスド・ケミカル・ディクショナリー ( Hawley's Condensed Chemical Dictionary ) ( 1 9 8 7 )  
 【非特許文献 1 1】  
 1 5 . エリス ( Ellis ) 著、Progress in Medical Chemistry 25 ( 1 9 8 8 ) エルセヴィール、アムステルダム  
 【非特許文献 1 2】  
 1 6 . ソコル ( Sokol, R.J. )、Lancet、3 3 8 ( 8 7 6 1 ) : 2 1 2 ( 1 9 9 1 )  
 【非特許文献 1 3】  
 1 7 . ソコル、Lancet、3 3 8 ( 8 7 6 8 ) : 6 9 7 ( 1 9 9 1 )  
 【0 0 0 6】  
 上記の各出版物又は特許の開示は、個々の各出版物及び特許の専門用語が特異的にかつ個々に参考として組み込まれるのと同様に、そのまま参考として本明細書に組み込まれる。  
 【0 0 0 7】

#### シクロスポリンの治療薬としての使用

大部分の移植処置において、ホスト - ドナー組織型適合によるグラフト拒絶を回避する努力が行われているにもかかわらず、免疫抑制治療は、ホスト中のドナー臓器の生存能力のために重要である。種々の免疫抑制剤、例えばアザチオプリン、メトトレキセート、シクロホスファミド、FK - 5 0 6、ラパマイシン及びコルチコステロイド類などが移植手術に使用されている。シクロスポリン類は、T - 細胞介在性反応に対するそれらの好ましい効果のために、免疫抑制治療にますます多く使用されるようになってきている ( 1 )。

#### 【0 0 0 8】

シクロスポリンは、体液性免疫及び細胞介在性免疫反応、例えば同種移植片拒絶、遅延型過敏症、実験的アレルギー性脳脊髄炎、フロイント アジュバント関節炎及びグラフト対ホスト病 ( G V H D ) などを抑制することが証明された。それは、臓器移植に続く臓器拒絶の予防に、リウマチ性関節炎の治療に、乾癬の治療に、そしてその他の I 型糖尿病、クローン病及び狼瘡などの免疫病の治療に使用される。多くの天然シクロスポリン類が、当該技術では公知である。非天然シクロスポリン類は、全 - 又は半合成手段によって、又は改良培養法の適用によってつくられる。このように、入手できるシクロスポリン群は重要であり、例えば、天然シクロスポリン A ( Cs A ) からシクロスポリン Z ( Cs Z ) まで、並びにその他の非天然シクロスポリン誘導体、ジヒドロ - 及びイソ - シクロスポリンな

10

20

30

40

50

どがある(2、3、4)。修飾された1-位置のアミノ酸を含むCsA類似体が、リッチらによって報告された(9)。免疫抑制性、抗炎症性及び抗寄生虫性CsA類似体が、サンド社に譲渡された米国特許第4,384,996号(6)、第4,771,122号(7)、第5,284,826号(8)及び第5,525,590号(特許文献4)に記載されている。

#### 【0009】

シクロスポリンは、分子量1202ダルトンを有する親油性分子である。シクロスポリンAは、水に難溶で、高い親油性を有するため、従来の固体又は液体の薬剤用担体を有するシクロスポリンA医薬組成物は不都合であることが多い。例えば、シクロスポリン類はこのような組成物からは満足に吸収されず、又はこのような組成物は耐容性がよくなく、又はそれらの保存時における安定性は十分ではない。その溶解濃度は、1日投与量に対して低いことが多い。

10

#### 【0010】

##### シクロスポリン治療の副作用

シクロスポリン治療に関しては、多数の副作用がある。これらには腎毒性、肝毒性、白内障発生、多毛症、パラセシス(parathesis)及び歯肉過形成などがある(10)。最も深刻な副作用は、腎毒性である。

#### 【0011】

急性シクロスポリン腎毒性は形態学的に、封入体、アイソメトリック空胞形成、及び微小カルシウム沈着を特徴とする細管損傷を伴う。それは、糸球体濾過率の低下に導く。これは、シクロスポリンで治療した患者の血清クレアチニンの速やかな増加によって確認できる(11)。

20

シクロスポリンが腎臓障害を起こす正確なメカニズムは知られていない。ラット研究において、慢性的CsA-誘起性腎臓機能及び腎臓構造の悪化は、腎脂質の過酸化を伴った。抗酸化剤をCsAと同時に投与すると、これらのラットにおける腎臓障害は軽減することをワングらが証明した(12)。

シクロスポリン治療と関連する腎毒性リスクを軽減する、これまでの当該技術での取り組みは、この薬剤をシクロスポリンの代謝を遅らせる作用物質と同時に投与し、治療的血中濃度を維持するために必要な用量を効果的に減らすことである。しかし、この方法は、シクロスポリンのバイオアベイラビリティが著しく変動するという問題を解決しないことが多い(12)。このように、すぐれたバイオアベイラビリティを有しながらも、副作用を起こさないシクロスポリン製剤を調製するという問題は、当該技術では公知である。

30

#### 【0012】

##### 投与型

薬剤がその治療効果を実現するためには、その薬剤の治療量はバイオアベイラブルでなければならない、すなわち、それは患者の作用部位に到達できなければならない。経口ドラッグデリバリーは当該技術では知られており、投与が容易であるため一般的に利用されている。しかし経口投与型は、その薬剤が、まず腸内である与えられた時間内にその投与型から遊離しなければならない、また、消化管内で溶解し、吸収されなければならないため、複雑である。例えば、その投与型からの正しい薬剤放出、及び消化(GI)管内における薬剤の可溶化が重要である。

40

#### 【0013】

GI管の領域内でよくはたらく公知の経口投与型は、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、シロップ、懸濁液、エマルジョン、マイクロエマルジョン類及びプレエマルジョンコンセントレート類などである。経口投与製剤の開発において、溶解度が重要な役割を果たす。なぜならば、活性薬剤を運搬するために使用される製剤は、ある与えられた時間の間、活性部位に到着する薬剤の量及び/又は濃度に影響を与えるからである。その製剤の組成も、消化管内における薬剤化合物の可溶化に直接影響を与え、その結果、活性薬剤化合物の血流への吸収程度及び吸収速度に影響を与える。その上、薬剤の治療効果は、その薬剤がデリバリーシステムそのものから放出される速度によって影響を受ける。デリバリーシステ

50



ムそれ自体は、吸収前の消化管における活性化合物の溶解速度及び溶解程度に影響を与える(1)。

【0014】

当該技術で知られている従来システムにおいて、薬剤の内容物は、短時間内に消化管に放出され、ある与えられた時間、通常は投与後数時間内に、血中薬剤濃度はピークに達する。シクロスポリン製剤を含む公知の経口ドラッグデリバリーシステムの設計は、不都合な用量関連性副作用をもたらすリスクを冒して、可能な限り速かな薬剤溶解を得ることに基準をおいている。

【0015】

したがって、毒性が低く、高度のバイオアベイラビリティを保持し、他の薬剤と共に投与する必要のないシクロスポリン製剤が是が非でも必要である。 10

【発明の開示】

【0016】

本発明は、ある種の製剤、好ましくはマイクロエマルションプレコンセントレート及びマイクロエマルション製剤が、シクロスポリン類似体、 $ISA_{TX}247$ のデリバリーを行うことができるという発見に基づくものである。シクロスポリン類似体 $ISA_{TX}247$ は、シクロスポリンに関連する副作用の一つ以上を軽減する一方、その薬剤の高いバイオアベイラビリティは保持するものである。さらに、本発明の製剤は、十分なバイオアベイラビリティを提供することによって、 $ISA_{TX}247$ の免疫抑制効果も高める。

【0017】

本発明の製剤は全て、活性成分としての $ISA_{TX}247$ 、及びポリオキシ化部分を有する非イオン性界面活性剤などの合成補助乳化剤で乳化された、合成又は植物性油を含有する。したがって、本発明の製剤は、 $ISA_{TX}247$ 、界面活性剤、エタノール、親油性及び/又は両親媒性溶媒を含む。本発明の製剤は、必要に応じてpH及び等張性を調節でき、保護コロイドなどの生体適合性ポリマー類、懸濁液安定剤及び形成剤、賦形剤、結合剤及び担体なども必要に応じて含むことができる。 20

【0018】

好ましい一態様において、本発明は、a)薬物学的有効量の $ISA_{TX}247$ 、b)ビタミンE TPGS、c)MCT油、d)ツイーン40及びツイーン80からなる群から選択される乳化剤、及びe)エタノールを含んでなるマイクロエマルションプレコンセントレートに関するものである。より好ましくは、このマイクロエマルションプレコンセントレートは、約5ないし約10重量%の $ISA_{TX}247$ 、0%より多く約50重量%までのビタミンE TPGS、0%より多く約50重量%までのMCT油、0%より多く約50重量%までの乳化剤、及び約5%ないし約15重量%のエタノールを含み、前記製剤は、室温では液体マイクロエマルションプレコンセントレートである。より好ましくは、a : b : c : d : eの重量比は、約0.5 - 1 : 4 : 2 : 2 : 1である。 30

【0019】

本発明は、MCT油、乳化剤、エタノール、ビタミンE TPGS及び正しい量の $ISA_{TX}247$ を、 $ISA_{TX}247$ が完全に溶解するまで混合することを含む、マイクロエマルションプレコンセントレートの調製方法も意図しており、製剤は、室温では液体である。 40

【0020】

また別の態様において、本発明は、a)薬物学的有効量の $ISA_{TX}247$ 、b)ビタミンE - トコフェリルポリエチレングリコール1000琥珀酸(ビタミンE TPGS)、c)中鎖トリグリセリド(MCT)油、d)ツイーン40、及びe)エタノールを含んでなる医薬製剤に関するものである。好ましくは、この医薬製剤はマイクロエマルションである；より好ましくは、この製剤はマイクロエマルションプレコンセントレートである。この製剤は、好ましくは約5ないし約10重量%の $ISA_{TX}247$ 、約20ないし約50重量%のビタミンE TPGS、約5ないし約20重量%のMCT油、約5%ないし約50%のツイーン40及び約5ないし約15重量%のエタノールを含む。より好ましく 50

は、 $a : b : c : d : e$ の重量比が $0.5 - 1 : 4 : 2 : 2 : 1$ である。

【0021】

さらにまた別の態様において、本発明は免疫抑制を必要とする対象に、a)薬物学的有効量の $ISAT_x 247$ 、b)ビタミンE TPGS、c)MCT油、d)ツイーン40、及びe)エタノールを含んでなる医薬製剤の有効量を投与することを含む、免疫抑制を生成する方法に関するものである。

【0022】

本発明は、MCT油、ツイーン40、エタノール、ビタミンE TPGS、及び適量の $ISAT_x 247$ を、 $ISAT_x 247$ が完全に溶解するまで混合することを含む、本発明のこの態様の医薬製剤を調製する方法も意図している。

10

【0023】

その他の態様において、本発明は、a)薬物学的有効量の $ISAT_x 247$ 、b)ビタミンE TPGS、c)MCT油、d)ツイーン80、及びe)エタノールを含んでなる医薬製剤に関するものである。好ましくは、この医薬製剤はマイクロエマルションであり；より好ましくは、この製剤はマイクロエマルションプレコンセントレートである。この医薬製剤は、好ましくは約5%ないし10重量%の $ISAT_x 247$ 、約20%ないし約50重量%のビタミンE TPGS、約5%ないし約20重量%のMCT油、約5%ないし約50重量%のツイーン80、及び約5%ないし約15重量%のエタノールを含む。より好ましくは、 $a : b : c : d : e$ の重量比が約 $0.5 - 1 : 2 : 4 : 2 : 1$ である。

【0024】

20

その他の態様において、本発明は、免疫抑制を必要とする対象に、a)薬物学的有効量の $ISAT_x 247$ 、b)ビタミンE TPGS、c)MCT油、d)ツイーン80、及びe)エタノールを含んでなる医薬製剤の有効量を投与することを含む、免疫抑制を生成する方法に関するものである。

【0025】

本発明は、MCT油、ツイーン80、エタノール、ビタミンE TPGS、及び適量の $ISAT_x 247$ を、 $ISAT_x 247$ が完全に溶解するまで混合することを含む、本発明のこの態様の医薬製剤を調製する方法も意図している。

【0026】

また別の態様において、本発明は、a)薬物学的有効量の $ISAT_x 247$ 、b)MCT油、c)ツイーン80、d)トリアセチン、及びe)エタノールを含んでなる、医薬製剤に関するものである。好ましくは、この医薬製剤はマイクロエマルションであり；より好ましくは、この製剤はマイクロエマルションプレコンセントレートである。この医薬製剤は、好ましくは約5%ないし10重量%の $ISAT_x 247$ 、約20%ないし約50重量%のトリアセチン、約5%ないし約50重量%のMCT油、約5%ないし約50重量%のツイーン80及び約5%ないし約15重量%のエタノールを含む。より好ましくは、 $a : b : c : d : e$ の重量比が約 $0.5 - 1 : 5 : 3 : 1 : 1$ である。

30

【0027】

さらにまた別の態様において、本発明は、免疫抑制を必要とする対象に、a)薬物学的有効量の $ISAT_x 247$ 、b)MCT油、c)ツイーン80、d)トリアセチン、及びe)エタノールを含んでなる医薬組成物の有効量を投与することを含む、免疫抑制を生成する方法に関するものである。

40

【0028】

本発明は、MCT油、ツイーン80、エタノール、トリアセチン、及び適量の $ISAT_x 247$ を、 $ISAT_x 247$ が完全に溶解するまで混合することを含む、本発明のこの態様の医薬製剤を調製する方法も意図している。

【0029】

さらにまた別の態様において、本発明は、a)薬物学的有効量のa) $ISAT_x 247$ 、b)ツイーン80、c)ビタミンE TPGS、d)エタノール、及びe)ミリスチン酸イソプロピルを含んでなる医薬製剤に関するものである。好ましくは、この医薬製剤はマ

50

イクロエマルションであり；より好ましくは、この製剤はマイクロエマルションプレコンセントレートである。この医薬製剤は、好ましくは約5%ないし約10重量%のISA<sub>T</sub>x247、約20%ないし約50重量%のビタミンE TP GS、約5%ないし約55重量%のミリスチン酸イソプロピル、約5%ないし約50重量%のツイーン80及び約5%ないし約15重量%のエタノールを含む。より好ましくは、a : b : c : d : eの重量比が約0.5 - 1 : 2 : 1 : 1 : 6である。

【0030】

また別の態様において、本発明は、免疫抑制を必要とする対象に、a) ISA<sub>T</sub>x247、b) ツイーン80、c) ビタミンE TP GS、d) エタノール、及びe) ミリスチン酸イソプロピルを含んでなる医薬製剤の有効量を投与することを含む、免疫抑制を生成する方法に関するものである。

【0031】

本発明は、ミリスチン酸イソプロピル、ツイーン80、エタノール、ビタミンE TP GS n、及び適量のISA<sub>T</sub>x247を、ISA<sub>T</sub>x247が完全に溶解するまで混合することを含む、本発明のこの態様の医薬製剤を調製する方法も意図している。

【0032】

さらにまた別の態様において、本発明は、a) 薬物学的有効量のISA<sub>T</sub>x247、b) ビタミンE TP GS、c) MCT油、d) ツイーン40、及びe) エタノールを含んでなる医薬製剤プレコンセントレートに関するものである。この医薬製剤プレコンセントレートは、好ましくは約5%ないし約10重量%のISA<sub>T</sub>x247、約20%ないし約50重量%のビタミンE TP GS、約5%ないし約20重量%のMCT油、約5%ないし約50重量%のツイーン40、及び約5%ないし約15重量%のエタノールを含む。より好ましくは、a : b : c : d : eの重量比が約0.5 : 4 : 2 : 2 : 1である。さらにより好ましいのは、製剤がマイクロエマルションプレコンセントレートであって、このプレコンセントレートは、水性メジウムと混合すると透明な安定マイクロエマルション溶液を形成することである。好ましくは、この水性メジウムは、水又は果汁（グレープフルーツジュースを除く）である。加えて、このプレコンセントレートは、プレコンセントレート約1部対水性メジウム約10ないし約100部という比で、水性メジウムと混合するのがより好ましい。

【0033】

また別の態様において、本発明は、水性メジウムに混入したa) 薬物学的有効量のISA<sub>T</sub>x247、b) ビタミンE TP GS、c) MCT油、d) ツイーン40、及びe) エタノールを含んでなる医薬製剤の有効量を、免疫抑制を必要とする対象に投与することを含む、免疫抑制を生成する方法に関するものである。

【0034】

本発明は、MCT油、ツイーン40、エタノール、ビタミンE TP GS n、及び適量のISA<sub>T</sub>x247を、ISA<sub>T</sub>x247が完全に溶解するまで混合することを含む、本発明のこの態様の医薬製剤を調製する方法も意図している。生成したプレコンセントレートは、その後水性メジウムと、1部のプレコンセントレート対約10ないし約100部のメジウムという比で混合するのが好ましい。

【0035】

さらにまた別の態様において、本発明は、a) 薬物学的有効量のISA<sub>T</sub>x247、b) ビタミンE TP GS、c) MCT油、d) ツイーン40、及びe) エタノールを含んでなる医薬製剤に関するものである。この医薬製剤は、皮下（SC）又は筋肉内（IM）投与など、非経口的に投与することができ、任意に滅菌される。

【0036】

本発明のもう一つの態様において、前記マイクロエマルションプレコンセントレート製剤のいずれかが、水性メジウムと混合して透明で熱力学的安定なマイクロエマルション溶液を形成することができる。水性メジウムは、水、又はグレープフルーツジュースを除く果汁である。グレープフルーツジュースは、ISA<sub>T</sub>x247と不都合な反応をおこすこと

10

20

30

40

50

がある。加えて、プレコンセントレートは、プレコンセントレート約 1 部対水性メジウム約 10 ないし約 100 部の比で水性メジウムと混合する。

【0037】

本発明のさらにもう一つの態様において、前記マイクロエマルジョンプレコンセントレート製剤のいずれかは、好ましくはソフトゼラチンカプセルに封入された、経口製剤である。

【0038】

発明を実施するための形態

概して、本出願における用語は、当該技術において理解される意味で一貫して使用される。

10

【0039】

用語「cyclosporin」及び「cyclosporine」は単にスペルの違いであり、ここでは交換可能に用いられ、同じ化合物をあらわす。例えば、シクロスポリン A (cyclosporin A 及び cyclosporine A) は、場合によって同じ化合物又は同じ化合物群をあらわす。

【0040】

本明細書に使用する用語「マイクロエマルジョンプレコンセントレート」は、マイクロエマルジョンをつくる水性メジウムと接触可能である系を意味する。用語マイクロエマルジョンは、本明細書では、水及び有機化合物（疎水性（親油性）有機化合物を含める）を含む、不透明でない（透明な）又は実質的に不透明でない熱力学的に安定なコロイド分散系として一般的に受け入れられている意味で使用される。

20

【0041】

用語「エマルジョン」は、小滴の形で他の液に細かく分散している少なくとも 1 種類の不混和性液からなる不均質系であり、上記小滴の直径は通常 0.1 mm を超える。このような系は、最小の安定性を有し、それは界面活性剤、微粉固体などの添加物によってさらに不安定になる。従来の「エマルジョン」は、本発明のマイクロエマルジョンとは異なり、熱力学的に不安定な分散系と考えられる。

【0042】

A. 製剤の製法

本発明の製剤は全て、活性成分としての ISATx 247 と、補助乳化剤、好ましくはポリオキシ化部分を有する非イオン性界面活性剤などの補助乳化剤で乳化した合成又は植物油を含む。本発明の製剤は、pH 及び等張性を必要に応じて調節できる。本発明の製剤は、保護コロイドなどの生体適合性ポリマー類、懸濁液安定剤及び形成剤、賦形剤、結合剤及び担体も、必要に応じて含むことができる。幾つかの好ましい実施形態は、比較的高い薬剤溶解度及び水性メジウムへの比較的速やかな溶解（攪拌して約 5 分未満）を有し、透明マイクロエマルジョンを形成する、透明な安定製剤を形成する。

30

【0043】

このように、本発明の製剤は、ISATx 247、界面活性剤、油、エタノール及び、親油性及び / 又は両親媒性溶媒である乳化剤を含む、マイクロエマルジョン又はマイクロエマルジョンプレコンセントレートである。ある実施形態において、この製剤は、約 5 % ないし約 10 重量 % の ISATx 247、約 20 % ないし約 50 重量 % の界面活性剤、例えばトコフェリルポリエチレングリコールカルボン酸エステルなど（又は任意にトリアセチンなどのエマルジョン安定剤）、約 5 % ないし約 20 重量 % の油成分、例えば MCT 油又はミリスチン酸イソプロピルなど、約 5 % ないし約 15 重量 % のエタノール、及び約 20 % ないし約 40 重量 % の親油性溶媒及び / 又は約 10 % ないし約 55 重量 % の両親媒性溶媒を含む。その他に、この製剤は、任意にその他の界面活性剤を約 10 % ないし約 20 重量 % 含むことができる。

40

【0044】

本発明の実施形態は、十分な薬剤バイオアベイラビリティ（表 3 及び 5、及び図 2 を参照）及び / 又は軽減された毒性（表 5 及び 7 を参照）を有する。この高められるバイオアベイラビリティ及び / 又は軽減される毒性のメカニズムは不明である。しかし、理論によっ

50

て制限されるものではないが、ビタミン E T P G S が製剤のこれらの特徴に寄与している可能性がある。例えば、ビタミン E T P G S の同時投与は、小児における肝臓移植後のシクロスポリンのバイオアベイラビリティを高めることが証明された（ソコルら）。ビタミン E T P G S は、腸内におけるチトクローム P 4 5 0 の薬剤代謝を阻害することによって、バイオアベイラビリティを高める。ビタミン E T P G S は、シクロスポリン誘起性腎臓チトクローム P - 4 5 0 の生成を抑制し、二次的に酸素化代謝産物の形成を減らす。又は、ビタミン E T P G S は、P - g p - コントロールド逆輸送を阻害し、腸の腸細胞層を通過する薬剤類の正味の輸送を高め、同時投与される薬剤のバイオアベイラビリティの増加を引き起こしうる。加えて、ビタミン E T P G S はよく知られた抗酸化剤である。また、ビタミン E T P G S は、アラキドン酸放出及びリポキシゲナーゼ酵素活性を阻害することによって、プロスタグランジン形成に影響を与えるというやり方で、アラキドン酸代謝にある役割を果たす。このプロセスにより、ビタミン E T P G S は血小板凝集を阻止し、それによって I S A <sub>T</sub> x 2 4 7 の腎毒性作用を減らす（15）。又は、I S A <sub>T</sub> x 2 4 7 そのものが、シクロスポリン A やその他の関連化合物に比べてよりバイオアベイラブルであり、より低毒性である可能性もある。これらのメカニズムのいずれか、これらのメカニズムの組合わせのいずれか、又は未知のメカニズムが、ここに開示される組成物の高いバイオアベイラビリティ及び低い毒性に貢献しているのであろう。

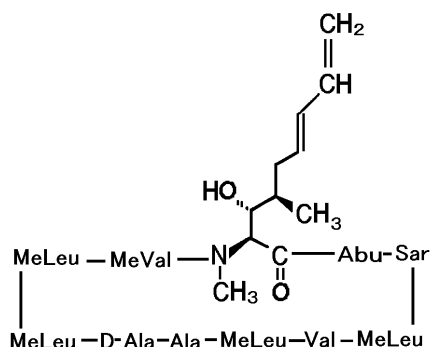
10

#### 【0045】

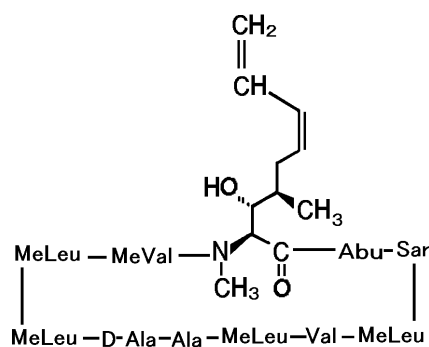
本発明の製剤の好ましい活性成分は、シクロスポリンの類似体、I S A <sub>T</sub> x 2 4 7 である。I S A <sub>T</sub> x 2 4 7 は、E - 及び Z - 異性体の混合物として、又は単独の E - 又は Z - 異性体として製剤中に存在する。I S A <sub>T</sub> x 2 4 7 異性体の構造式は次のとおりである：

20

#### 【化1】



E - 異性体



Z - 異性体

30

#### 【0046】

本発明の製剤は、薬剤 I S A <sub>T</sub> x 2 4 7、合成又は植物油、好ましくはポリオキシエチル化部分を有する非イオン性界面活性剤、好ましくはポリオキシエチル化ビタミン E などの合成補助乳化剤で乳化された M C T（中鎖トリグリセリド）油を含む。処方された内容物は、p H 及び等張性を必要に応じて調節することができる。これらの製剤は、ポリ（ビニルピロリドン）（P V P）、ポリビニルアルコール（P V A）又はポリエチレングリコール（P E G）などの生体適合性ポリマー類及びその他のポリマー類を保護コロイドとして、及び懸濁剤又は増量剤、賦形剤、結合剤及び / 又は担体も場合により含むことができる。

40

#### 【0047】

ウィッティヒ反応による I S A <sub>T</sub> x 2 4 7 の（E）及び（Z）-異性体混合物の合成

ここに例示されるウィッティヒ反応経路は、図3の参照番号31によって確認される。方法1は、臭素中間体アセチル - - プロモシクロスポリン41を経て進むが、方法2は、出発点としてアセチルシクロスポリンAアルデヒド51を使用する。以下に記載する典型的な方法はウィッティヒ反応を用い、混合立体化学的配置を有するアルケン官能基を導入す

50

る。

#### 【0048】

本明細書に開示される典型的実施形態において、 $ISA_{TX}247$ の(E)及び(Z)-異性体混合物を合成するために用いられるウィッティヒ反応は、任意にリチウムハリドの存在下で行ってもよい。ウィッティヒ反応におけるリチウムハリドの存在は、生成する幾何異性体類の比に影響をもつことはよく知られており、したがってこのような化合物の添加は、 $ISA_{TX}247$ の(E)及び(Z)-異性体の所望混合物の生成に役立つ。

#### 【0049】

##### 方法 1

本発明の一実施形態において、 $ISA_{TX}247$ の(E)及び(Z)-異性体混合物は、  
図4に示すようにつくられる。図4における波線(特に、化合物43と44を参照)の表示の使用は、例示的反応系列が(E)及び(Z)-異性体の混合物を生成することを示すものとする。一実施形態において、生成した(E)対(Z)-異性体のパーセント比は、(E)-異性体の約10ないし90パーセントから(Z)-異性体の約90ないし10パーセントまでの範囲であるが、これらの範囲は単なる例示であり、多くの他の範囲が可能である。例えば、混合物は約15ないし85重量パーセントの(E)-異性体及び約85ないし15パーセントの(Z)-異性体を含むことができる。その他の実施形態において、混合物は約25ないし75重量パーセントの(E)-異性体及び約75ないし25重量パーセントの(Z)-異性体；約35ないし65重量パーセントの(E)-異性体及び約65ないし35重量パーセントの(Z)-異性体；及び、約45ないし55重量パーセントの(E)-異性体及び約55ないし45パーセントの(Z)-異性体を含む。また別の実施形態において、異性体混合物は、約45ないし50重量パーセントの(E)-異性体及び約50ないし55重量パーセントの(Z)-異性体を含む $ISA_{TX}247$ 混合物である。これらの重量パーセントは組成物の総重量を基準としており、(E)異性体及び(Z)異性体の重量の合計が100重量パーセントであることは当然である。言い換えれば、混合物は65重量パーセントの(E)-異性体及び35重量パーセントの(Z)-異性体を含むことができ、又はその逆でもよい。

10

20

#### 【0050】

図4を参照すると、アセチルシクロスポリンAの1-アミノ酸残基の側鎖の末端炭素を次の反応工程において臭素化する；すなわち、四塩化炭素などの溶媒中でアセチルシクロスポリンA35をN-ブロモスクシンイミド及びアゾ-ビス-イソブチロニトリルと共に還流し、中間体アセチル- -プロモシクロスポリンA41を生成する。N-ブロモスクシンイミドは、アリル水素を臭素で置換するためによく用いられる試薬であり、これは遊離基メカニズムによって行われると考えられている。この中間体41の製法は、エバール及びナニンガーによって「シクロスポリンAの主代謝産物(OL-17)の合成」(J. Org. Chem., 57巻、p. 2686-2691(1992))で詳細に記載されている。

30

#### 【0051】

新規の中間体、アセチルシクロスポリンAトリフェニルホスホニウムブロミド42は、アセチル- -プロモシクロスポリンA41から、この化合物をトルエンなどの溶媒中でトリフェニルホスフィンと共に加熱することによってつくることができる。

40

#### 【0052】

新規の中間体42及びこれに類似するその他のものは、1-アミノ酸残基中に共役ジエン系を含む複数のシクロスポリンA類似体の合成における重要な中間体であると考えられる。例えば、トリフェニルホスフィンに加えて、トリアリールホスフィン類、トリアルキルホスフィン類、アリールアルキルホスフィン類、及びトリアリールアルシン類などの化合物をアセチル- -プロモシクロスポリンA41と反応させて42に類似するその他の活性化合物をつくることができる。

#### 【0053】

再び図4を参照すると、アセチルシクロスポリンAのトリフェニルホスホニウムブロミド42と過剰のホルムアルデヒドをトルエン中で室温で撹拌することによって、アセチル-

50

1, 3 - ジエン 43 の (E) 及び (Z) - 異性体混合物をつくることができる。ホルムアルデヒドの添加後、水酸化ナトリウムなどの塩基を滴下し、ジエン類の異性体混合物を酢酸エチルで抽出する。

#### 【0054】

多数の有機化学の教科書が、ウィッティヒ反応を説明している。説明の一つは、特にマクマリーが「有機化学 (Organic Chemistry)」、5 版 (ブルックスノール、パシフィック グローブ、2000)、p. 780 - 783 で記載しているものである。ウィッティヒ反応は、ケトン又はアルデヒドをアルケンに変換するために利用される。このようなプロセスにおいて、リンイリド (ホスホランとも呼ばれる) をアルデヒド又はケトンと反応させると、ベタインと呼ばれる二極性中間体を得られる。一般的には、ベタイン中間体は分離されない；むしろ、それは四員環を経て自然に分解して、アルケンとトリフェニルホスフィンオキシドを与える。正味の結果は、元々はリンに結合していた  $R_2C=$  基によってカルボニル酸素原子が置換されることである。

10

#### 【0055】

非常に種々様々の試薬が上述の典型的ウィッティヒ反応試薬の代わりになり得ることは、当業者には明らかである。例えば、多数のアルキル、アリール、アルデヒド及びケトン化合物をホルムアルデヒドの代わりに使用すると、膨大な数のシクロスポリン誘導体がつくられる。出願人は、上記の合成をホルムアルデヒドで行い、また、ホルムアルデヒドの代わりにアセトアルデヒド、ジューテロ化ホルムアルデヒド、ジューテロ化アセトアルデヒド、2 - クロロベンズアルデヒド、ベンズアルデヒド、及びブチルアルデヒドなどの化合物で行った。このようなウィッティヒ反応を、トリフェニルホスホニウム誘導体以外の化合物、例えばトリアリールホスフィン類、トリアルキルホスフィン類、アリールアルキルホスフィン類及びトリアリールアルシン類などで行ってもよい。水酸化ナトリウムを使用する代わりに、種々のその他の塩類、例えば炭酸ナトリウム、ブチルリチウム、ヘキシルリチウム、ナトリウムアミド、リチウム ジイソプロピルアミドのようなりチウム障害性塩基、及びアルカリ金属アルコキシド類などを使用してもよい。これら種々の試薬が使用できる上に、反応は種々の有機溶媒中又は有機溶媒と水との混液中で、種々の塩、特にリチウムハリドの存在下で、種々の温度で行うことができる。上に列挙した因子の全ては、当業者によって合理的に選択され、形成される二重結合の立体化学、すなわちシス対トランス異性体の比に所望の効果を与える。

20

30

#### 【0056】

この合成の最終工程において、炭素上の保護基を下記の手順によって除去する。アセチル - (E) - 1, 3 - ジエン及びアセチル - (Z) - 1, 3 - ジエンの混合物 43 をメタノールに溶解し、それから水を加える。炭酸カリウムのような塩基を加え、反応混合物を室温で攪拌する。使用できる炭酸カリウム以外の塩基として水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、ナトリウムアルコキシド及びカリウムアルコキシドなどがある。その後、酢酸エチルを使用して最終生成物である ISATX 247 の (E) 及び (Z) - 異性体混合物 44 を抽出する。

#### 【0057】

##### 方法 2

ISATX 247 の (E) 及び (Z) - 異性体混合物を、ウィッティヒ反応戦略によって合成するまた別の反応経路においては、以下のように 4 工程の合成経路を使用する：1) 方法 1 のような - アルコールの保護、2) 第一工程から生成したアセチル - シクロスポリン A を酸化してアルデヒドをつくる；3) ウィッティヒ反応；4) ウィッティヒ反応生成物を脱アシル化し、又は同等に、酢酸エステルを加水分解して、アルコールを回復させる。この反応系列は、図 5 で明らかにされる。

40

#### 【0058】

この合成経路は、第一工程が酢酸エステル基で - アルコールを保護するという点で、図 4 のウィッティヒ反応経路と同様に開始される。しかし、これら 2 経路は次の点で互いに異なる；方法 2 の次の工程は、アセチル - シクロスポリン A 35 をアルデヒド、す

50

なわちアセチルシクロスポリン A アルデヒド 5 1 に変換する。この反応は、十分強い酸化剤を使用し、 $C = C$  結合を切断して 2 つの断片を生成する。アルケン切断は、当該技術では公知である。オゾンはおそらく最も一般的に使用される二重結合切断試薬であるが、その他の酸化剤、例えば過マンガン酸カリ ( $KMnO_4$ ) 又は四酸化オスミウムも、二重結合切断を起こすことができる。

#### 【0059】

ルテニウム - ベースの酸化剤の使用が、カールセンらの「四酸化ルテニウム触媒による有機化合物の酸化法の顕著な改良」J. Org. Chem., 46 巻、19 号、p. 3736 - 3738 (1981) で述べられている。カールセンらは、歴史的に、ルテニウム金属の費用が触媒法の発達の動機となったことを教示しており、最も人気のある触媒法は、化学量論的酸化剤として過ヨウ素酸塩か次亜塩素酸塩を使用している。これらの研究者はルテニウムの一般的使用では反応経過中に触媒活性が喪失することを見だし、それはカルボン酸の存在によると仮定した。反応混合物にニトリル、特にアセトニトリルを加えると、 $CCl_4 / H_2O / IO_4^-$  系においてアルケン類の酸化分解の速度及び程度が顕著に高まることが判明した。

10

#### 【0060】

本発明の一実施形態によると、アセチルシクロスポリン A アルデヒド 5 1 は、次の手順でアセチルシクロスポリン A 3 5 から生成する；すなわち、アセチルシクロスポリン A 3 5 をアセトニトリルと水との混液に溶解し、それから最初に過ヨウ素酸ナトリウムを加え、次に塩化ルテニウム水加物を加える。アルデヒド 5 1 は酢酸エチルで抽出される。この酸化分解戦略によるアルデヒド 5 1 の合成は、多くの立体選択的経路にとって重要であることに留意すべきである。

20

#### 【0061】

方法 2 の第三工程は、方法 1 のそれと同様に、アルデヒド 5 1 をウィッティヒ反応によって (E) 及び (Z) ジエンの混合物に変換することを含む。方法 1 と同様に、リンイリドをアルデヒドに加えるとベタインを生じ (これは分離しない)、その結果、アルデヒドのカルボニル酸素原子が、元々はリンに結合していた  $R_2C =$  基によって置換される。ここでも、このようなウィッティヒ反応は、トリフェニルホスホニウム誘導体以外のリン含有化合物、例えばトリアリールホスフィン、トリアルキルホスフィン、アリールアルキルホスフィン及びトリアリールアルシンなどで、種々の温度で行うことができる。また種々の塩基性溶液及び溶媒の使用又は種々の無機塩の添加によって、新たに形成される二重結合の立体化学に影響を与えることもできる。

30

#### 【0062】

一実施形態において、アセチルシクロスポリン A アルデヒド 5 3 をトルエンに溶解し、それに水酸化ナトリウム水溶液のような塩基を加える。それからアリルトリフェニルホスホニウムブロミド 5 2 を加え、反応物をしばらく攪拌する。生成したアセチル (E) 及び (Z) - 1, 3 - ジエン混合物 5 3 の処理は、ヘキサン及び / 又は酢酸エチルによる抽出を含む；ここで、用語「処理 (workup)」は、反応体、生成物、溶媒などの混合物から反応生成物を抽出及び / 又は分離するプロセスを意味する。

40

#### 【0063】

方法 2 の最終工程において、方法 1 の最終工程と同様に、 $\alpha$  - 炭素位置のアルコールを保護する酢酸エステル基を炭酸カリウムで除去すると、ISA<sub>TX</sub> 247 の (E) 及び (Z) - 異性体混合物 5 4 が得られる。保護基の除去に使用できる炭酸カリウム以外の塩基としては、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、ナトリウムアルコキシド、及びカリウムアルコキシドなどがある。

#### 【0064】

#### ビタミン E T P G S

トコフェリル類が、製剤中で抗酸化剤として使用される。D - トコフェリルポリエチレングリコール 1000 琥珀酸 (ビタミン E T P G S) (イーストマンコダック、ロチェスター、NY) は、ビタミン E の水溶性誘導体であり、親水性と親油性の二重の性質を有し

50



、当該技術で公知の製剤で、抗酸化剤又は保存料として使用されている。抗酸化剤として使用する際には、トコフェリル又はビタミン E T P G S は、約 0.5% ないし約 1%、かつ 5 重量% 以下の範囲で存在する。

#### 【0065】

ビタミン E T P G S は水と混和可能で、約 20 重量% までの濃度で水溶液を形成する。この濃度を超えると、液体結晶相が形成されることがある。ビタミン E T P G S は、高い分解温度及び良い耐熱性を有する。0.02 重量パーセントでミセルを形成する。ビタミン E T P G S 濃度が 20 重量パーセントを超えると、粘度のより高い液体結晶相が形成される。水中ビタミン E T P G S 濃度が増すにつれ、より複雑な液体結晶相が生成し、それは等方性球状ミセルから等方性シリンダ状ミセル及び、六方晶形、六方晶形、混合六方晶形及び逆六方晶形、逆球状ミセルに、そしてラメラ相に至る(13)。これらの製剤において、ビタミン E T P G S は、界面活性剤又は乳化剤として役立つ。それは、溶媒、結合剤及びフィラーとしてはたらくその他の多数の賦形剤を含む複雑な製剤にも使用される。

10

さらに、本発明のビタミン E T P G S は、乳化剤及びアジュバントとして存在するだけでなく、油の変性を阻止し、それらが悪臭を発生するのを防ぐ。

#### 【0066】

##### 油成分

本発明の製剤の油成分は、植物油、合成油、トリアセチンなどの油代替品、鉱油又は中鎖トリグリセリド(MCT)油、すなわち、炭水化物鎖が 8 - 10 個の炭素原子を有するトリグリセリド油でよい。好ましくは、油成分は MCT 油である。

20

#### 【0067】

MCT 油は、植物油に比べて多くの利点を有する：すなわち、1) 酸化しにくい；2) 約 0.94 - 0.95 の特異的密度；これは植物油の密度より高く、水の密度に近く、それによって安定なマイクロエマルジョンが容易に得られる；3) 植物油より疎水性が小さく、溶解する薬剤の濃度をより高くすることができる；4) 比較的低い粘度を有し、組成物の粘度を実質的に高めることなしに、組成物中の油相の濃度をより高くすることができる(15)。

#### 【0068】

MCT 油は市販されている。本発明によって意図される MCT 油の例には、TCR (商標) (脂肪酸鎖の約 95% が 8 又は 10 個の炭素を有するトリグリセリド混合物につけられた Societe Industrielle des Oleagineux 社 (フランス) の商品名) 及び M I G L Y O L 8 1 2 (商標) (グリセリン及びカプリル及びカプリン酸の混合トリエステルにつけられたダイナミット・ノーベル (Dynamit Nobel) 社 (スウェーデン) の商品名) などがあるが、これに限定するものではない。ミリスチン酸イソプロピルは、本発明の製剤に使用されるもう一つの市販油である。

30

#### 【0069】

本発明によって意図される植物油の例は、大豆油、綿実油、オリーブ油、ゴマ油及びヒマシ油などであるが、これに限定するものではない。鉱油は、限定するものではないが、天然炭化水素又はそれらの合成類似体を含む。オレイン酸及びリノレン酸などの油性脂肪酸類、オレイルアルコールなどの脂肪アルコール類、ソルビタンモノオレートなどの脂肪エステル類及び疎水性スクロースエステル類は、油成分として使用できるが、本明細書に記載されるその他の油のようには好ましくない。本発明の製剤に使用できるその他の脂質には、合成及び半合成モノ - 、ジ - 及びノ又はトリグリセリド、天然、合成又は半合成トリグリセリドの溶媒分別又は熱分別によりつくられたトリグリセリド類、及びエステル交換及びノ又は指向性又はランダム再配列によってつくられたトリグリセリド類があるが、これに限定するものではない。

40

#### 【0070】

##### 乳化剤

本発明の製剤は、少なくとも 1 種類の乳化剤を含む。好ましくは、乳化剤又は界面活性剤

50

は、非イオン性親油性溶媒又は非イオン性両親媒性溶媒である；乳化剤は、ツイーン４０、ツイーン８０などのツイーンでよい。しかし、マイクロエマルジョンプレコンセントレートを形成できるいかなる界面活性剤でも使用できる。幾つかの例を以下に記載する。

【００７１】

界面活性剤成分は、両親媒性、親水性又は親油性界面活性剤又はこれらの混合物を含む。特に好ましいのは、非イオン性親水性界面活性剤及び非イオン性親油性界面活性剤である。界面活性剤成分として使用するために適した親水性界面活性剤の例は、天然又は水素化植物油とエチレングリコールとの反応生成物である。このような生成物は、公知の方法によって、例えば、天然又は水素化ヒマシ油又はそれらの断片とエチレンオキシドとを反応させ、任意にその生成物から遊離ポリエチレングリコール成分を除去することによって得られる。商品名クレモフォル（Cremophor）（商標）として市販されている種々のテンシド類、又は界面活性剤類も適する。特に適しているのは、クレモフォル（商標）RH４０及びクレモフォル（商標）ELである。ニッコル（Nikkol）（商標）の商品名で市販される種々のテンシド類も、この範疇で使用するのに適する。

10

【００７２】

その他の例には、ポリオキシエチレン - ソルピタン - 脂肪酸エステル、例えばモノ - 及びトリ라우リル、パルミチル、ステアリル及びオレイルエステル、例えば、ポリオキシエチレン（２０）ソルピタンモノラウレート [ツイーン（商標）２０]、ポリオキシエチレン（２０）ソルピタンモノパルミテート [ツイーン（商標）４０]、ポリオキシエチレン（２０）ソルピタンモノステアレート [ツイーン（商標）６０]、ポリオキシエチレン（２０）ソルピタンモノオレエート [ツイーン（商標）８０]、ポリオキシエチレン（２０）ソルピタントリステアレート [ツイーン（商標）６５]、ポリオキシエチレン（２０）ソルピタントリオレエート [ツイーン（商標）８５]、ポリオキシエチレン（４）ソルピタンモノラウレート [ツイーン（商標）２１]、ポリオキシエチレン（４）ソルピタンモノステアレート [ツイーン（商標）６１]、及びポリオキシエチレン（５）ソルピタンモノオレエート [ツイーン（商標）８１]などのツイーン類がある。本発明の組成物に使用するためにこの群のなかで特に好ましい製品は、ツイーン４０及びツイーン８０、ポリオキシエチレンステアリン酸エステルなどのポリオキシエチレン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレン コポリマー類、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレン ブロックコポリマー類、例えば商品名ポロキサマー（Poloxamer）（商標）として市販される公知の種類のもの、琥珀酸ジオクチル、スルホ琥珀酸ジオクチルナトリウム、琥珀酸ジ - ２ - エチルヘキシル又はラウリル硫酸ナトリウム及びリン脂質、特にレシチン類である。本発明の組成物での使用に適したレシチンには、大豆レシチン類が含まれるが、これに限定するものではない。その他の適切な製品には、クレモフォルTM、ニッコルTM、グリコール化天然又は水素化植物油、及びカプリル - カプリン酸ジエステルがある。プロピレングリコールモノ - 及びジ脂肪酸エステル、例えばプロピレングリコールジカプリレート、プロピレングリコールジラウレート、プロピレングリコールヒドロキシステアレート、プロピレングリコールイソステアレート、プロピレングリコールラウレート、プロピレングリコールリシノレート、プロピレングリコールステアレートなども適する。

20

30

【００７３】

本発明の製剤はさらに、薬物学的に容認される界面活性剤、コロイド、懸濁液、増量剤、賦形剤、担体、テンシド又はコテンシドを含むことができる。

40

【００７４】

B．本発明の好ましい製剤

本発明の実施形態は、好ましくは、十分な薬剤のバイオアベイラビリティ及び／又は低い毒性をもたらす安定なマイクロエマルジョンプレコンセントレートである。これらの製剤は、薬剤のバイオアベイラビリティを高め、シクロスポリン及びその類似体の投与に関連する副作用を軽減するすぐれた能力を有する。マイクロエマルジョン製剤は、より小さい粒子の薬剤のデリバリーを可能にする。より小さい粒子の薬剤の単位投与量のデリバリーは、表面積の増加を可能にし、おそらくより高い吸収率、及びより良いバイオアベイラビ

50

リティを可能にする。マイクロエマルションは、当該技術では公知である。しかし、本発明の製剤の成分類を用いたマイクロエマルションは、エタノール、ビタミン E T P G S、油成分、及び乳化剤の比を適切に選択することによって形成される。これは、これまでに知られている製剤の、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 に類似する活性薬剤に対する比の範囲外である。5 %未満のエタノール、又は 5 0 %より多いビタミン E T P G S を含む組成物は、室温では固体のマイクロエマルションプレコンセントレートを形成する。これは、本発明の製剤の比較的好ましくない実施形態である。

#### 【 0 0 7 5 】

本発明の組成物中の諸成分の相対的比率は、関係する組成物の特殊なタイプによって、例えば、それが「マイクロエマルションプレコンセントレート」、マイクロエマルション、通常のエマルション、又は溶液などであるかどうかによって、かなり変動することはもちろんである。相対的比率は、組成物中の成分類の特定の機能によっても変化する；例えば「マイクロエマルションプレコンセントレート」の界面活性成分の場合に、それが単に界面活性剤として使われるか又は界面活性剤及び補助溶剤の両方として使われるかによっても変化する。相対的比率は、使用する特定の成分類及び製品組成物の所望の物理的特性によっても変化する。いかなる特殊な場合でも、適用可能な比率の決定は、当業者の能力の範囲内であるのが普通である。よって、全ての指示された比率及び以下に記載する相対的重量範囲は、好ましい或いは個々の発明的教示を示唆するものに過ぎず、本発明をその一般的観点で制限するものではないことを理解すべきである。本発明のマイクロエマルションは、マイクロエマルションプレコンセントレートである。本発明の好ましい製剤は、下記のとおりでである：

#### 【 0 0 7 6 】

##### 製剤 1

- a ) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ；
- b ) ビタミン E T P G S ；
- c ) M C T 油 ；
- d ) ツイーン 4 0 ； 及び
- e ) エタノール

成分類の比 0 . 5 - 1 : 4 : 2 : 2 : 1

#### 【 0 0 7 7 】

##### 製剤 2

- a ) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ；
- b ) ビタミン E T P G S ；
- c ) M C T 油 ；
- d ) ツイーン 8 0 ； 及び
- e ) エタノール

成分類の比 0 . 5 - 1 : 2 : 4 : 2 : 1

#### 【 0 0 7 8 】

##### 製剤 3

- a ) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ；
- b ) M C T 油 ；
- c ) ツイーン 8 0 ；
- d ) トリアセチン ； 及び
- e ) エタノール

成分類の比 0 . 5 - 1 : 5 : 3 : 1 : 1

#### 【 0 0 7 9 】

##### 製剤 4

- a ) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7
- b ) ツイーン 8 0 ；
- c ) ビタミン E T P G S

d) エタノール ; 及び

e) ミリスチン酸イソプロピル

成分類の比 0.5 - 1 : 2 : 1 : 1 : 6

【0080】

#### 製剤 5

a) 薬物学的有効量の I S A<sub>T</sub> x 247 ;

b) ビタミン E T P G S ;

c) M C T 油 ;

d) ツイーン 40 ; 及び

e) エタノール

【0081】

成分類の比 0.5 - 1 : 4 : 2 : 2 : 1 ; 組成物はさらに水性メジウムと混合され、透明な安定マイクロエマルジョン溶液を形成する。水性メジウムは、限定するものではないが、水、リンゴジュースなどの果汁、茶、ミルク及びココアなどである。有用な果汁としては、グレープフルーツジュースを除き、リンゴジュースなどが好ましい。製剤は、水性メジウム中に、製剤約 1 部対水性メジウム約 10 ないし約 100 部の割合で溶解するのが好ましい。

【0082】

本発明の医薬製剤は、十分なバイオアベイラビリティを有することが好ましい。好ましくは、I S A<sub>T</sub> x 247 のバイオアベイラビリティは 30 % 以上であり、バイオアベイラビリティが約 40 % より大きいことがより好ましい。医薬製剤は、マイクロエマルジョン又はマイクロエマルジョンプレコンセントレートなどの、経口投与型であるのが好ましい。水性メジウムは、経口製剤として容易に摂取できるように、患者の口に合うものであるのが好ましい。

【0083】

本発明の製剤は、必要とする患者に有効量を投与すると、免疫抑制をもたらす。好ましくは、投与する医薬製剤の量は、約 0.1 ないし 10 mg / kg 患者体重 / 日であり、より好ましくは約 0.5 ないし 3 mg / kg 患者体重 / 日である。製剤は、1 日 1 回又は 2 回投与するのが好ましい。

【0084】

正しく投与すると、本発明の製剤は、例えば臓器拒絶又はグラフト対ホスト病の予防、及び、病気及び障害、特に自己免疫疾患及び障害及び炎症性疾患及び障害の治療を含む免疫抑制のために使用できる。ここで意図される自己免疫病及び炎症性疾患の例は、非制限的に、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アジソン病、乾癬、糖尿病、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、ライター症候群、関節炎（リウマチ性関節炎、慢性進行性関節炎及び変性関節炎）、及びリウマチ疾患、自己免疫性血液病（溶血性貧血、再生不良性貧血、赤芽球ろう及び特発性血小板減少症）、全身性エリテマトーデス、多発性軟骨炎、強皮症、ウェーゲナー肉芽腫症、皮膚筋炎、慢性活性肝炎、重症筋無力症、乾癬、スチーブン - ジョンソン症候群、特発性スプルー、自己免疫性炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎及びクローン病）、内分泌性眼障害、グレーブス眼症、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、若年性糖尿病（I 型糖尿病）、ブドウ膜炎（前部及び後部）、乾性角結膜炎及び春季角結膜炎、腸肺線維症、乾癬性関節炎及び糸球体腎炎などである。

【0085】

本発明の製剤は、マラリヤ、コクシジオイデス真菌症及び住血吸虫症などの抗寄生虫疾患又は抗原虫疾患の治療にも使用できる。それらは、腫瘍における抗ガン剤耐性を後退又は排除するための薬剤としても使用できる。

【0086】

本発明は、非経口投与（皮下又は筋肉内投与）製剤も意図している。この製剤は、下記を含んでなる：

10

20

30

40

50

- a) 薬物学的有効量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ;
- b) ビタミン E T P G S ;
- c) M C T 油 ;
- d) ツイーン 4 0 ; 及び
- e) エタノール。

このような製剤は、投与前に滅菌されるのが好ましい。

【 0 0 8 7 】

#### C. 方法論

我々は、シクロスポリン類似体 I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 の安定製剤を調製し得ることを見いだした。本発明の製剤は、下記の方法でつくることができる。しかし、当業者はこれらの工程のいかなる手順も可能であることを知っている。さらに、以下で使用する成分の量は上述したものと同一であり、以下に記載する方法は、一つ以上の工程を変えたり又はプロセスを完全に逆にすることが容易である。

10

【 0 0 8 8 】

製剤 5 だけが、マイクロエマルジョンプレコンセントレートを水溶液に加えてマイクロエマルジョンを形成する方法を詳述しているが、どのマイクロエマルジョンプレコンセントレート製剤も、水性メジウムと混合することによってマイクロエマルジョンに変えることができる。プレコンセントレートを、プレコンセントレート 1 部対メジウム 1 0 - 1 0 0 部の割合で水性メジウムと混合するのが好ましい。水性メジウムが、リンゴジュースであるのがより好ましい。

20

【 0 0 8 9 】

#### 製剤 1

まず、M C T 油をツイーン 4 0 に加えて、室温 ( 2 0 - 2 5 ) で混合物を形成する。次に、エタノールを M C T 油とツイーン 4 0 との混合物に加える。次に、ビタミン E T P G S をその混合物に加える。混合物を 3 0 - 3 5 で、透明になるまで攪拌しながらインキュベートする。その後、適量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を加える。最後に、成分を 3 0 - 3 5 で混合し、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を完全に溶解させる。

【 0 0 9 0 】

#### 製剤 2

まず、M C T 油をツイーン 8 0 に加えて、室温 ( 2 0 - 2 5 ) で混合物を形成する。次に、エタノールを M C T 油とツイーン 8 0 との混合物に加える。次に、ビタミン E T P G S をその混合物に加える。混合物を 3 0 - 3 5 で、透明になるまで攪拌しながらインキュベートする。その後、適量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を加える。最後に、成分を 3 0 - 3 5 で混合し、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を完全に溶解させる。

30

【 0 0 9 1 】

#### 製剤 3

まず、M C T 油をツイーン 8 0 に加えて、室温 ( 2 0 - 2 5 ) で混合物を形成する。次に、エタノールを M C T 油とツイーン 8 0 との混合物に加える。次に、トリアセチンをその混合物に加える。混合物を 3 0 - 3 5 で、透明になるまで攪拌しながらインキュベートする。その後、適量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を加える。最後に、成分を 3 0 - 3 5 で混合し、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を完全に溶解させる。

40

【 0 0 9 2 】

#### 製剤 4

まず、M C T 油をツイーン 8 0 に加えて、室温 ( 2 0 - 2 5 ) で混合する。次に、ミリスチン酸イソプロピル及びエタノールを、室温 ( 2 0 - 2 5 ) でその混合物に加える。その後、適量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を加える。最後に、成分を室温 ( 2 0 - 2 5 ) で混合し、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を完全に溶解させる。

【 0 0 9 3 】

#### 製剤 5

まず、M C T 油をツイーン 4 0 に加えて、室温 ( 2 0 - 2 5 ) で混合物を形成する。次

50

に、エタノールをMCT油とツイーン40との混合物に加える。次に、ビタミンE TPGSをその混合物に加える。混合物を30 - 35 で、透明になるまで攪拌しながらインキュベートする。その後、適量のISA<sub>TX</sub> 247を加える。最後に、成分類を30 - 35 で混合し、ISA<sub>TX</sub> 247を完全に溶解させる。生成したプレコンセントレートを、その後水性メジウムと混合する。好ましくは、プレコンセントレートは水性メジウムと、プレコンセントレート1部対メジウム10 - 100部の割合で混合する。

好ましい方法では、上記各製剤は、まずISA<sub>TX</sub> 247をエタノールに溶解することによってつくられる。残りの成分類は、どんな順序で加えてもよい。

#### 【0094】

#### 発明の実施例の開示

下の実施例において、下記の略号は下記の意味を有する。略号が定義されていない場合、それは一般的に容認される意味を有するものとする。

|                  |   |                                |
|------------------|---|--------------------------------|
| w / w            | = | 重量対重量                          |
| N F              | = | ( National Formulary ) 承認された処方 |
| N F / N P        | = | 承認された処方 / 国際薬局方                |
| U S P            | = | 米国薬局方                          |
| m g              | = | ミリグラム                          |
| m L              | = | ミリリットル                         |
| k g              | = | キログラム                          |
| n g              | = | ナノグラム                          |
| n m              | = | ナノメートル                         |
| T <sub>max</sub> | = | 最高濃度に達するまでの時間                  |
| C <sub>max</sub> | = | 最高濃度                           |
| A U C            | = | 曲線下面積                          |
| L C M S          | = | 液体クロマトグラフィー - 質量分析             |
| M C T            | = | 中鎖トリグリセリド                      |
| P K              | = | 薬物動態                           |
| P S              | = | ブタの皮膚                          |

#### 【0095】

2種類の薬剤製品、経口溶液及びソフトゼラチンカプセルが、イソテクニカ社によって開発された。両薬剤製品共、界面活性剤、エタノール、親油性及び/又は両親媒性溶媒を成分として含む。各薬剤製品の製法を以下に記す。

#### 【0096】

#### 実施例1：ISA<sub>TX</sub> 247経口溶液の製法

次の成分類がISA<sub>TX</sub> 247薬剤製品 - 経口溶液を構成する：ISA<sub>TX</sub> 247、d - アルファ トコフェリル ポリエチレングリコール1000琥珀酸(ビタミンE TPGS) N F、中鎖トリグリセリド(MCT)油U S P、ツイーン40 N F、及び95%エタノールU S P。

#### 【0097】

#### 【表1】

10

20

30

40

| I S A <sub>T X</sub> 2 4 7 経口溶液の組成                |                             |                   |                   |                   |
|---|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 構成成分（および試験基準）                                     | 単位および/またはパーセンテージ、濃度：50mg/mL | 1 バッチあたりの量        |                   |                   |
|   |                             | ロット番号<br>39120228 | ロット番号<br>30010532 | ロット番号<br>30040517 |
| d-アルファ トコフェリル ポリエチレングリコール 1000 琥珀酸(ビタミン E TPGS)NF | 4 2 . 2 4 %                 | 0.16205kg         | 0.544kg           | 0.768kg           |
| 中鎖トリグリセリド(MCT)油 USP                               | 2 1 . 1 2 %                 | 0.08102kg         | 0.272kg           | 0.384kg           |
| ツイーン 40 NF  | 2 1 . 1 2 %                 | 0.08102kg         | 0.272kg           | 0.384kg           |
| 95% エタノール USP                                     | 1 0 . 5 6 %                 | 0.04051kg         | 0.136kg           | 0.192kg           |
| I S A <sub>T X</sub> 2 4 7                        | 4 . 9 5 %                   | 0.01900kg         | 0.0637kg          | 0.090kg           |
| 合計  | 9 9 . 9 9 %                 | 0.38360kg         | 1.286kg           | 1.818kg           |

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 8 】

ビタミン E T P G S をホットボックス中で融解し、液体ディスペンサーに移した。各 T P G S 容器の温かい内容物を最低 1 分間混合し、均質な液体であることを肉眼で確認した。各バレルの内容物の温度が 3 5 になったとき、必要温度である 3 7 . 5 ± 2 . 5 のグレン (Groen) 容器を準備した。

## 【 0 0 9 9 】

必要量の成分ビタミン E T P G S、M C T 油、ツイーン 4 0 及び 9 5 % エタノールを、確認のために正しくラベルをつけた別々の容器に秤量した。ビタミン E T P G S は、直ちにグレン容器に移した。M C T 油、ツイーン 4 0 及びエタノールを、あらかじめ秤量したビタミン E T P G S を収容している容器に、逐次定量的に移した。エタノール蒸発を減らすために、その容器にしっかりと蓋をし、エタノール添加後 1 5 - 2 0 分間、3 7 . 5 ± 2 . 5 で混合した。

## 【 0 1 0 0 】

最上部と底部のサンプルを、無菌ガラス製使い捨てピペットを用いて観察した。ピペットの内容物は、肉眼的に均質、透明であることが期待された。

## 【 0 1 0 1 】

軽くボルテックスできるようにミキサーをセットした。容器に蓋をし、混合中のエタノールの蒸発を減らした。連続的に混合しているブレンドに、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を加えた。その後、容器を密封した。混合物を、粉末が完全に溶解するまで 3 0 分ごとにチェックした。

## 【 0 1 0 2 】

実施例 2 : I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 ゼラチンカプセルの製法

本発明は、ソフトゼラチンカプセルも意図している。このカプセルは、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 及び経口溶液のような非薬剤成分を、ゼラチン、グリセリン、水、及びソルビトールを含むゼラチン 2 D P S 型 (N F / N P) カプセルに封入して含む。

## 【 0 1 0 3 】

ISA<sub>TX</sub> 247ゼラチンカプセルは、ISA<sub>TX</sub> 247、ビタミンE TPGS NF、中鎖トリグリセリド(MCT)油USP、ツイーン40 NF、及び95%エタノールUSPを含んでなるISA<sub>TX</sub> 247経口溶液(50mg/mL)を、ゼラチン2DPS型(NF/NP)カプセルに封入するというやり方で作られた。ゼラチン2DPS型(NF/NP)カプセルは、ゼラチンNF(ブタ皮膚)、グリセリンUSP、精製水USP、及び76%ソルビトールスペシャルを用いて作られた。

## 【 0 1 0 4 】

## 実施例3：安定性/保存寿命の測定

下表はびん(30で保存)に入れた製剤1、及びソフトゲルカプセル形(室温で保存)の製剤1両方について、公知のLCMS法によって測定した安定性データを示す。製剤は、通常の保存条件では安定である。

【表2】

| ISA <sub>TX</sub> 247 濃度 (mg/mL) |            |            |                         |
|----------------------------------|------------|------------|-------------------------|
|                                  | 0 カ月       | 6 カ月       | 24 カ月                   |
| びんに入れた組成物                        | 57.1 ± 0.5 | 56.7 ± 0.7 | 58.0 ± 0.6              |
|                                  |            |            |                         |
| ソフトゲルカプセル                        | 41.1 ± 0.6 | 42.4 ± 1.0 | 41.4 ± 0.9 <sup>A</sup> |

<sup>A</sup> ソフトゲルカプセルの18カ月測定値

## 【 0 1 0 5 】

## 実施例4：薬物動態(PK)曲線の比較

下に示す製剤を、SDラットに経口胃管栄養法によって与え、ISA<sub>TX</sub> 247の血中濃度を規則的時間間隔でモニターし、濃度対時間曲線(すなわち薬物動態曲線)を作成した。下表は、ここに開示された製剤を含む、種々のISA<sub>TX</sub> 247製剤のPK曲線の比較である。群2は、表3に示されるように、ラットモデルにおいて良いバイオアベイラビリティを示すが、これらの結果は、イヌ又はヒトモデルではかなり変動する(表4を参照されたい)。

【表3】



| 種々の I S A <sub>TX</sub> 2 4 7 組成物の P K 曲線 |   |                  |                  |      |      |                          |
|---|---|------------------|------------------|------|------|--------------------------|
| 投与経路                                      | 群 | T <sub>max</sub> | C <sub>max</sub> | 半減期  | AUC  | 群 1 に比較した<br>バイオアベイラビリティ |
| 経口  | 1 | 2                | 49               | 7.3  | 559  | +0                       |
| 経口  | 2 | 4                | 75               | 6.1  | 1150 | +106                     |
| 経口  | 3 | 4                | 36               | 18.1 | 491  | -12                      |
| 経口  | 4 | 4                | 68               | 7.4  | 885  | +58                      |
| 経口  | 5 | 2                | 104              | 7.1  | 1298 | +132                     |
| 経口  | 6 | 4                | 57               | 7.7  | 750  | +34                      |

10

T<sub>max</sub> = I S A<sub>TX</sub> 2 4 7 の最高血中濃度に達するまでの時間

C<sub>max</sub> = I S A<sub>TX</sub> 2 4 7 の最高血中濃度 (n g / m L)

半減期 = 最高 I S A<sub>TX</sub> 2 4 7 血中濃度が半分になるまでの時間

AUC = 曲線下面積 (薬剤のバイオアベイラビリティに関係する)

20

#### 【0106】

群 1 :

V i t E T P G S / M C T 油 / ツイーン 4 0 / エタノール : 4 / 2 / 2 / 1 ( w / w / w / w ) 。 ( ここでは製剤 1 として開示されている )

群 2 :

V i t E T P G S / M C T 油 / ツイーン 8 0 / エタノール : 2 / 4 / 2 / 1 ( w / w / w / w ) 。 ( ここでは製剤 2 として開示されている )

群 3 :

M C T 油 / ツイーン 8 0 / トリアセチン / エタノール : 5 / 3 / 1 / 1 ( w / w / w / w ) 。 ( ここでは製剤 3 として開示されている )

30

群 4 : ツイーン 8 0 / V i t E T P G S / エタノール / ミリスチン酸イソプロピル : 2 / 1 / 1 / 6 ( w / w / w / w ) 。 ( ここでは製剤 4 として開示されている )

群 5 ( 比較実施例 ) :

V i t E / プロピレングリコール / マイシン / クレモフォル R H 4 0 / エタノール : 3 / 1 . 2 / 5 / 6 . 2 / 2 ( w / w / w / w ) 。

群 6 :

これはリンゴジュースで 1 : 6 5 に希釈され、マイクロエマルジョンを形成した製剤である。 ( ここでは製剤 5 として開示されている ) 。

#### 【0107】

実施例 5 : マイクロエマルジョンの製法

40

製剤の成分の比を 1 0 0 以上入れ替えて、マイクロエマルジョン形成を試験した ( 4 8 5 及び 9 0 0 n m における吸収率を、それぞれ 0 . 1 及び 0 . 0 1 未満と定義した ) 。試験した製剤は、下記の成分比を含んでいた :

5 - 1 0 % I S A<sub>TX</sub> 2 4 7

0 - 5 0 % ビタミン E T P G S

0 - 5 0 % ツイーン 4 0 及び / 又は ツイーン 8 0

0 - 5 0 % M C T 油

5 - 1 5 % エタノール。

#### 【0108】

試験した製剤の 2 0 % 未満が、マイクロエマルジョンを生成した。マイクロエマルジョン

50

形成は、ビタミン E T P G S 又はエタノールのどちらの比にも比較的依存しない。しかし、50%より大きい比のビタミン E T P G S 及び 5%未満の比のエタノールを有する製剤は、室温で凍結するプレコンセントレートを生成し、それはあまり好ましくない。図 1 は、ツイーン 40 及び M C T 油の賦形剤比の関数としてのマイクロエマルジョンプレコンセントレート形成をあらわす表である。

【0109】

#### 実施例 6：イヌにおける薬物動態 (P K) 曲線の比較

図 2 は、ビーグル犬における本発明の I S A<sub>T X</sub> 247 マイクロエマルジョンの薬物動態 (P K) 曲線を、ネオラル (商標) のそれと比較したグラフを示す。データは、下表にも示される。製剤をビーグル犬 (6 匹) に経口胃管栄養法で与え、I S A<sub>T X</sub> 247 の血中濃度を規則的時間間隔でモニターし、濃度対時間曲線 (すなわち薬物動態曲線) を作成した。より詳細に述べれば、イヌにいずれかの製剤 2 mL (100 mg / mL) を経口胃管栄養法によって与えた。投与後 0、0.5、1、2.5、5、7.5、12 及び 24 時間に採血し、液体クロマトグラフィー・質量分析 (L C M S) によって分析した。

10

【0110】

【表 4】

| 結果   |          |            |                        |           |
|------|----------|------------|------------------------|-----------|
| 投与経路 | 群        | T m a x    | C m a x                | A U C     |
| 経口   | <u>1</u> | <u>2 H</u> | <u>1 4 3 9 ± 3 7 8</u> | 8 2 9 0   |
| 経口   | <u>2</u> | <u>2 H</u> | <u>2 1 5 8 ± 6 7 7</u> | 1 1 4 6 0 |

20

T m a x = I S A<sub>T X</sub> 247 の最高血中濃度に達するまでの時間

C m a x = I S A<sub>T X</sub> 247 の最高血中濃度 (n g / mL)

A U C = 曲線下面積 (薬剤のバイオアベイラビリティに関係する)

【0111】

群 1：

製剤 1：V i t E T P G S / M C T 油 / ツイーン 40 / エタノール：4 / 2 / 2 / 1 (w / w / w / w)。

30

群 2：

ネオラル (商標)

【0112】

これらのデータによると、I S A<sub>T X</sub> 247 製剤のバイオアベイラビリティは、ネオラル (商標) に比べてわずかに低い、サンディミューン (Sandimmune) (商標) によるバイオアベイラビリティよりは実質的に大きい (データは示されず)。ネオラル (商標) は通常、約 40% のバイオアベイラビリティであることが報告されている。表 4 が示すように、群 1 のバイオアベイラビリティはネオラル (商標) に匹敵する。

これらのデータは、本発明の製剤が、シクロスポリンの他の製剤に匹敵するバイオアベイラビリティを有し、シクロスポリン投与に関連する副作用を軽減することを示している。

40

【0113】

#### 実施例 7：I S A<sub>T X</sub> 247 及びシクロスポリン A の薬物動態及び毒物動態特性

I S A<sub>T X</sub> 247 (45 - 50% の E - 異性体及び 50 - 55% の Z - 異性体) 及びシクロスポリン A の薬物動態及び毒物動態パラメーターを、ウサギモデルで試験した。そのウサギは、シクロスポリン A 腎臓毒性を研究するためのモデルとしても使われているが、ラットほどよく使われてはいない。研究では、ウサギに投与したシクロスポリン A は他の動物モデルでこれまでに報告されたものより低い用量、しかもヒトにおける治療範囲の少なくとも高い方の濃度以下でもある用量で、構造的及び機能的変化を引き起こすことが見いだされた (スリヴァリスら、1991、1994)。また、細管の細胞学的変化に加えて

50

、間質性線維症及び動脈症の所見があることは、ウサギが腎臓毒性の研究により適したモデルであることを示唆する。なぜならば、これらの構造的変化は、ヒトで認められる腎臓毒性の顕著な特徴だからである。下記のスケジュールによって、 $ISA_{Tx} 247$ を最初の7日間静脈注射（i . v . ）し、さらに23日間皮下注射した（s . c . ）。

【0114】

【表5】

ウサギモデルにおける $ISA_{Tx} 247$ の薬物動態的および毒物学的特性の研究

のための用量投与スケジュール

| 治 療 群          | 1－7日：       | 8－30日：      | 動物数 |   | 10 |
|----------------|-------------|-------------|-----|---|----|
|                | i . v . 投与量 | S . C . 投与量 | 雄   | 雌 |    |
|                | (m g ／ k g) | (m g ／ k g) |     |   |    |
| 1 . ビヒクル対照     | 0           | 0           | 4   | 4 |    |
| 2 . シクロスポリンA対照 | 1 0         | 1 0         | 6   | 6 |    |
| 3 . 少 量        | 5           | 5           | 0   | 2 |    |
| 4 . 中 程 度      | 1 0         | 1 0         | 4   | 4 |    |
| 5 . 多 量        | 1 5         | 1 5         | 4   | 4 | 20 |

【0115】

認められたいかなる腎臓変化も $ISA_{Tx} 247$ 効果によるもので、病原体によるものではないことを確実にするために、無病原体ウサギ（SPF）を使用した。1及び7日目に、薬剤を投与する前と、投与後0.5、1、2、4、8、12、18及び24時間後に血液サンプルを集め、薬物動態曲線を作成した。その他の評価パラメーターは、臨床的観察、体重、食餌消費量、血液検査値、臨床化学検査、肉眼的病理試験、及び選択された組織／臓器の組織病理学的検査などである。

【0116】

血液サンプルを、質量分析と高性能液体クロマトグラフィーとの組み合わせ（LCMS）によって分析した。下の表5は、シクロスポリンA又は $ISA_{Tx} 247$ の10mg / kgを投与したウサギにおける平均薬物動態パラメーターをまとめたものである。

【0117】

【表6】

雄ウサギに10mg / kg / 日を静脈注射したシクロスポリンAおよび $ISA_{Tx}$

$247$ の薬物動態パラメーター。結果は平均値±SDとして記される

| 測定パラメーター         | シクロスポリンA  |           | $ISA_{Tx} 247$ |           |    |
|------------------|-----------|-----------|----------------|-----------|----|
|                  | 1日目       | 7日目       | 1日目            | 7日目       |    |
| $t_{max}$ (時間)   | 0.5       | 0.5       | 0.5            | 0.5       | 40 |
| $C_{max}$ (@g/L) | 1954±320  | 2171±612  | 1915±149       | 1959±470  |    |
| $t^{1/2}$ (時間)   | 7.4±2.8   | 9.0±4.0   | 7.4±1.7        | 9.2±1.1   |    |
| 曲線下面積(@g@hr/L)   | 6697±1717 | 6685±1247 | 5659±1309      | 5697±1373 |    |

【0118】

10mg / kg / 日を投与した雄ウサギでは、シクロスポリンAと $ISA_{Tx} 247$ との薬物動態パラメーターの間に統計的有意差はなかった。同量を投与した雌ウサギの $ISA_{Tx} 247$ の薬物動態パラメーターは、7日目の最大濃度を除けば雄ウサギで認められた

パラメーターと有意に異ならなかった。

【 0 1 1 9 】

ビヒクル対照、シクロスポリン A、又は I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を投与されたウサギの血液学的パラメーターにおいて有意な変化は認められなかった。下の表 6 に示すように、研究コース中、種々の群においてクレアチニン濃度に差が認められた。これらの差は、シクロスポリン A が、ビヒクル対照又は I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 のいずれよりも有意に大きい負の効果を腎臓に与えることを示した。5 0 % 多い量、すなわち 1 5 m g / k g / 日ですえ、1 0 m g / k g / 日シクロスポリン A に比べて、I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 は血清クレアチニン濃度の有意な増加を誘起しなかった。

【 0 1 2 0 】

10

【表 7】

ビヒクル、シクロスポリン A または I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を 3 0 日間投与した雄ウサギ

における、クレアチニン濃度のベースラインを超えるパーセント変化

| 治療群  | 1 5 日目  | 3 0 日目  |
|--|---------|---------|
| ビヒクル   | + 6 %   | - 3 %   |
| シクロスポリン A ( 1 0 m g / k g )                  | + 2 2 % | + 3 3 % |
| I S A <sub>T X</sub> 2 4 7 ( 1 0 m g / k g ) | + 1 %   | + 1 0 % |
| I S A <sub>T X</sub> 2 4 7 ( 1 5 m g / k g ) | - 1 9 % | - 1 1 % |

20

【 0 1 2 1 】

ビヒクル対照、1 0 m g / k g シクロスポリン A、5 m g / k g I S A<sub>T X</sub> 2 4 7、又は 1 0 m g / k g I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を投与した全てのウサギの試験では、有意な異常はあらわれなかった。これは特に腎臓では事実であった；腎臓ではシクロスポリン A 投与動物で通常見られる、間質性線維症（スリヴァリスら、1 9 9 1、1 9 9 4）の徴候は認められなかった。1 5 m g / k g I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 を投与した雄ウサギでは、精子形成の減少が認められた。この 1 5 m g / k g 用量の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 投与で試験を完了した 3 匹の雌ウサギには、変化は認められなかった。

30

【 0 1 2 2 】

本発明を詳細に示し、その好ましい実施形態を参照して記述したが、添付の請求によって規定される本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細に種々の変更が行われ得ることは当業者には理解できるであろう。

【 0 1 2 3 】

上に述べた全ての参考文献は、参考としてそのまま本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 4 】

【図 1】図 1 は、ツイーン 4 0 及び M C T 油に関する賦形剤比の関数としてのマイクロエマルジョンプレコンセントレートの形成を示す表であり；

40

【図 2】図 2 は、ビーグル犬においてネオラル（Neoral）（商標）と比較した本件の I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 マイクロエマルジョンの薬物動態（P K）曲線を示すグラフであり；

【図 3】図 3 は、本発明のシクロスポリン類似体をつくるために使用できる典型的合成経路の概観を示し、ここで立体選択的経路は反応条件によってグループ化される；

【図 4】図 4 は、臭素化前駆体から I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 の（E）及び（Z）-異性体の混合物を生成する合成経路を示す図である；

【図 5】図 5 は、アルデヒド前駆体から I S A<sub>T X</sub> 2 4 7 の（E）及び（Z）-異性体の混合物を生成する別の合成経路を示す図である。

【図 1】

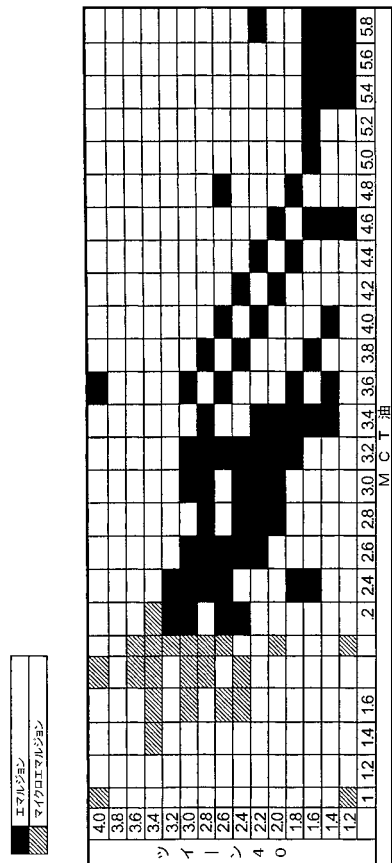


FIG. 1

【図 2】

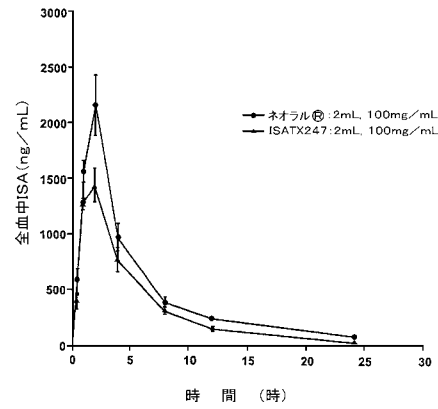


FIG. 2

【図 3】

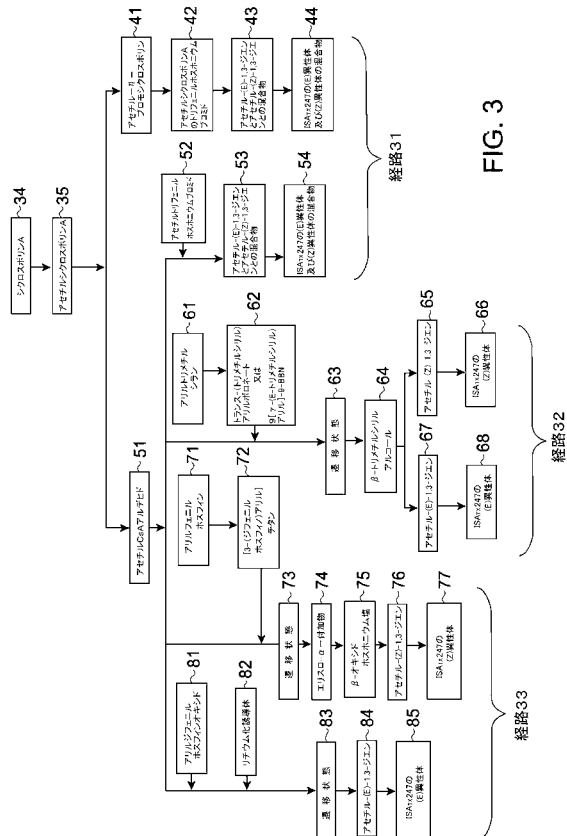


FIG. 3

【図 4】

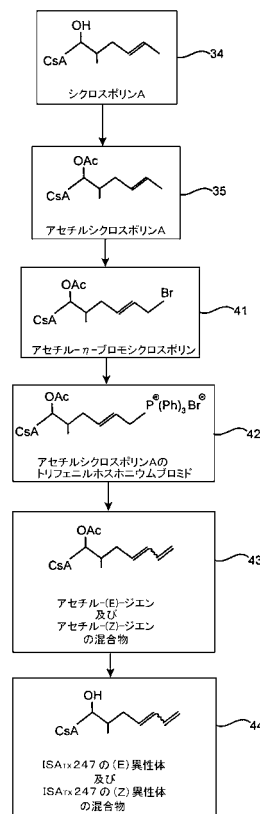


FIG. 4

## 【 図 5 】

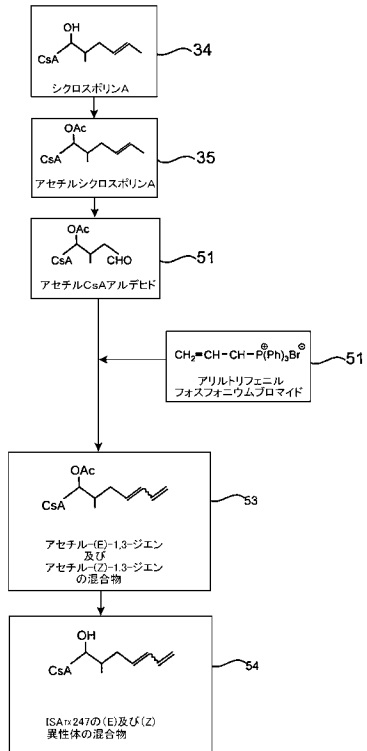


FIG. 5

## 【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  
24 April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/032949 A1(51) International Patent Classification<sup>2</sup>: A61K 9/107, 38/13

(21) International Application Number: PCT/CA02/01561

(22) International Filing Date: 17 October 2002 (17.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/346,201 19 October 2001 (19.10.2001) US  
60/370,597 5 April 2002 (05.04.2002) US(71) Applicants (for all designated States except US):  
ISOTECHNIKA INC. [CA/CA]; 2100 College Plaza,  
8215 112th Street, Edmonton, Alberta T6G 2C8 (CA).  
YATSCOFF, Randall, W. [CA/CA]; 1596 Hector Road,  
Edmonton, Alberta T6R 2Z5 (CA).

(72) Inventors: and

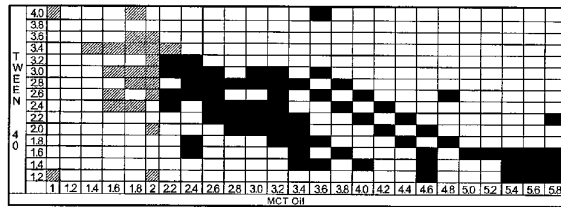
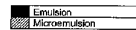
(75) Inventors/Applicants (for US only): NAICKER, Sel-  
varaj [CA/CA]; 3304 -117th Street, Edmonton, Alberta  
T6J 3J4 (CA). FOSTER, Robert, T. [CA/CA]; 4211 - 120  
Street, Edmonton, Alberta T6J 1X9 (CA).(74) Agent: TORYS LLP; Maritime Life Tower, Suite 3000,  
79 Wellington St. W., Box 270, TD Centre, Toronto, On-  
tario M5K 1N2 (CA).(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, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,  
TR), OAPI patent (BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

## Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted  
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD,  
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL CYCLOSPORIN ANALOG MICROEMULSION PRECONCENTRATES



(57) Abstract: The present invention relates to formulations containing cyclosporin analogs that are structurally similar to cyclosporin A, in particular isomeric mixtures of cyclosporin analogs that are structurally similar to cyclosporin A. The formulations form stable microemulsion preconcentrates and may provide superior drug bioavailability and/or may reduce one or more adverse effects associated with the administration of cyclosporin. Also disclosed are methods for using and preparing the formulations.

WO 03/032949 A1

WO 03/032949 A1



GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LF, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

**Published:**

- with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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 03/032949

PCT/CA02/01561

## NOVEL CYCLOSPORIN ANALOG MICROEMULSION PRECONCENTRATES

## CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority under 35 U.S.C. 119(e) to U.S. Provisional Application Serial No. 60/370,597 (Attorney Docket Number 031993-041) which was filed on April 5, 2002, and to U.S. Provisional Application Serial No. 60/346,201 (Attorney Docket Number 031993-125) which was filed on October 19, 2001, the disclosures of which are incorporated herein in their entirety.

## TECHNICAL FIELD

The present invention relates to formulations containing cyclosporin analogs that are structurally similar to cyclosporin A. In particular, the formulations contain isomeric mixtures of the cyclosporin analog ISA<sub>15</sub>247. These formulations form stable microemulsions which provide high drug solubility, superior drug bioavailability and may reduce one or more adverse effects associated with the administration of cyclosporin. Also disclosed are methods for using and preparing the formulations.

## BACKGROUND ART

## References:

The following references are referred to by numbers in parentheses at the relevant portion of the specification.

1. Gupta and Robinson, Treatise on Oral Controlled-drug Delivery, Text Ed. 1992, edited by Aegis Cadence, Mandel Decker, Inc.
2. Traber *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 60: 1247-1255 (1977)
3. Kobel *et al.*, *Europ. J. Applied Microbiology and Biotechnology*, 14: 237-240 (1982)
4. von Wartburg *et al.*, *Progress in Allergy*, 38: 28-45 (1986)
5. Rich *et al.* (*J. Med. Chem.*, 29: 978 (1986)
6. U.S. Patent No. 4,384,996, issued on May 24, (1983)
7. U.S. Patent No. 4,771,122, issued on September 13, (1988)
8. U.S. Patent No. 5,284,826, issued on February 8, (1994)
9. U.S. Patent No. 5,525,590, issued on June 11, (1996)
10. Sketris *et al.*, *Clin. Biochem.*, 28: 195-211 (1995)
11. Bennett, *Renal Failure*, 20: 687-90 (1998)
12. Wang *et al.*, *Transplantation*, 58:940-946 (1994)
13. "Eastman Vitamin E TPGS", Eastman Brochure, Eastman Chemical Co., Kingsport,

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

Tenn. (October 1996)

14. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, (1987)
15. Ellis, *Progress in Medicinal Chemistry* 25, (1988) Elsevier, Amsterdam
16. Sokol, R.J., *Lancet*, 338(8761): 212, (1991)
- 5 17. Sokol, R.J., *Lancet*, 338(8768): 697, (1991)

The disclosure of each of the above publications or patents is hereby incorporated by reference in its entirety to the same extent as if the language of each individual publication and patent were specifically and individually incorporated by reference.

*The Use of Cyclosporin as a Therapeutic Agent*

- 10 Despite efforts to avoid graft rejection through host-donor tissue type matching, in the majority of transplantation procedures, immunosuppressive therapy is critical to the viability of the donor organ in the host. A variety of immunosuppressive agents have been employed in transplantation procedures, including azathioprine, methotrexate, cyclophosphamide, FK-506, rapamycin and corticosteroids. Cyclosporins are finding
- 15 increasing use in immunosuppressive therapy due to their preferential effect on T-cell mediated reactions (1).

- Cyclosporin is a potent immunosuppressive agent that has been demonstrated to suppress humoral immunity and cell-mediated immune reactions such as allograft rejection, delayed hypersensitivity, experimental allergic encephalomyelitis, Freund's adjuvant
- 20 arthritis and graft versus host disease (GVHD). It is used for the prophylaxis of organ rejection subsequent to organ transplantation, for treatment of rheumatoid arthritis, for the treatment of psoriasis and for the treatment of other autoimmune diseases such as type I diabetes, Crohn's disease and lupus. Many naturally occurring cyclosporins are well known in the art. Non-natural cyclosporins have been prepared by total- or semi-synthetic means
- 25 or by the application of modified culture techniques. Thus, the class of available cyclosporins is substantial, and includes, for example, the naturally occurring cyclosporins A (CsA) through Z (CsZ), as well as other non-natural cyclosporin derivatives such as dihydro- and iso-cyclosporins (2, 3, 4). CsA analogs containing modified amino acids in the 1-position have been reported by Rich *et al.* (5). Immunosuppressive, anti-inflammatory
- 30 and anti-parasitic CsA analogs are described in U.S. Patent Nos. 4,384,996 (6), 4,771,122 (7), 5,284,826 (8) and 5,525,590 (9), assigned to Sandoz.

Cyclosporin is a lipophilic molecule having a molecular weight of 1202 daltons. Owing to the poor solubility in water and the high lipophilicity of cyclosporin A, pharmaceutical compositions of cyclosporin A with customary solid or liquid

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

pharmaceutical carriers often have disadvantages. For example, the cyclosporins are not satisfactorily absorbed from such compositions, or the compositions are not well tolerated, or they are not sufficiently stable when stored. Often, the dissolved concentration is low in relation to the daily dose.

5 *Adverse Effects of Cyclosporin Therapy*

There are numerous adverse effects associated with cyclosporin therapy. These include nephrotoxicity, hepatotoxicity, cataractogenesis, hirsutism, parathesis and gingival hyperplasia (10). The most serious adverse effect is nephrotoxicity.

Acute cyclosporin nephrotoxicity is accompanied morphologically by tubular  
10 lesions characterized by inclusion bodies, isometric vacuolation and microcalcification. That leads to a decrease in the glomerular filtration rate, which can be identified by the rapid increase in serum creatinine in patients treated with cyclosporin (11).

The exact mechanism by which cyclosporin causes renal injury is not known. In rat studies, chronic CsA-induced functional and structural deterioration of the kidney was  
15 accompanied by renal lipid peroxidation. It has been shown by Wang *et al.* that co-administration of an anti-oxidant with CsA reduced the renal injury in the rat (12).

Previous attempts in the art to reduce the nephrotoxic risks associated with cyclosporin therapy include the co-administration of the drug with an agent that delays the metabolism of cyclosporin, effectively reducing the dose required to maintain therapeutic  
20 blood levels. However, this method often does not resolve the problem of high variation of cyclosporin bioavailability(12). Thus, the problem of preparing a cyclosporin formulation that has excellent bioavailability but which does not cause adverse side effects is well known in the art.

*Dosage Forms*

25 In order for a drug to perform its therapeutic activity, a therapeutic amount of the drug must be made bioavailable, *i.e.*, it must be able to get to the site of action in the patient. Oral drug delivery is known in the art, and popular because of ease of administration. However, oral dosage forms are complicated by the fact that the drug must first be released from the dosage form over a given time in the gut, and must be solubilized  
30 and absorbed in the gastrointestinal tract. Thus, proper drug release from the dosage form and solubilization of the drug in the gastrointestinal (GI) tract are critical.

Well known oral dosage forms that work well within the confines of the GI tract include tablets, capsules, gel capsules, syrups, suspensions, emulsions, microemulsions and pre-emulsion concentrates. Solubility plays a large role in the development of oral dosage

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

formulations, because the formulation used to deliver the active drug will affect the amount and/or concentration of the drug that reaches the active site over a given period of time. The composition of the formulation also directly affects the solubilization of the drug compound in the gastrointestinal tract, and consequently the extent and rate of the absorption of the active drug compound into the blood stream. In addition, the therapeutic value of a drug is affected by the rate in which the drug is released from the delivery system itself, which in turn affects the rate and extent of solubilization of the active compound in the gastrointestinal tract before absorption (1).

In conventional systems known in the art, drug content is released into the gastrointestinal tract within a short period of time, and plasma drug levels peak at a given time, usually within a few hours after dosing. The design of known oral drug delivery systems, including cyclosporin formulations, is based on obtaining the fastest possible rate of drug dissolution at the risk of creating undesirable, dose related side effects.

Thus, there is a serious need for cyclosporin formulations with reduced toxicity but which retain high levels of bioavailability, and which do not need to be administered with another agent.

#### DISCLOSURE OF INVENTION

The present invention is based on the discovery that certain formulations, preferably microemulsion concentrate and microemulsion formulations, can provide the delivery of the cyclosporin analog, ISA<sub>TX</sub>247, which reduces one or more of the adverse effects associated with cyclosporin, while maintaining a high bioavailability of the drug. Further, the formulations of the present invention also increases the immunosuppressive effects of ISA<sub>TX</sub>247 by providing sufficient bioavailability.

The formulations of the present invention all contain ISA<sub>TX</sub>247 as the active ingredient and synthetic or vegetable oils emulsified with a synthetic co-emulsifier such as a non-ionic surfactant that has a polyoxylated moiety. Thus, the present formulations contain ISA<sub>TX</sub>247, a surfactant, ethanol, a lipophilic and/or an amphiphilic solvent. The formulations of the present invention may be adjusted for pH and isotonicity as needed, and may also include biocompatible polymers such as protective colloids, suspension stabilizers and building agents, excipients, binders and carriers, as needed.

In one preferred aspect, the invention is directed to a microemulsion concentrate comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247, b) Vitamin E TPGS, c) MCT oil, d) an emulsifier selected from the group consisting of Tween 40 and Tween 80; and e) ethanol. Preferably the microemulsion concentrate comprises from about 5 to

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

about 10% by weight of ISA<sub>TX</sub>247, greater than 0% to about 50% by weight of Vitamin E  
TPGS, greater than 0% to about 50% by weight of MCT oil, greater than 0% to about 50%  
by weight of emulsifier and about 5% to about 15% by weight of ethanol, wherein the  
formulation is a liquid microemulsion preconcentrate at room temperature. More preferably,  
5 the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:4:2:2:1.

The present invention also contemplates a method of preparing a microemulsion  
preconcentrate comprising mixing the MCT oil, the emulsifier, the ethanol, the Vitamin E  
TPGS, and the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved,  
wherein the formulation is a liquid at room temperature.

10 In another aspect, the invention is directed to a pharmaceutical formulation  
comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247, b) Vitamin E - -tocopheryl  
polyethylene glycol 1000 succinate (Vitamin E TPGS), c) medium chain triglyceride  
(MCT) oil, d) Tween 40, and e) ethanol. Preferably the pharmaceutical formulation is a  
microemulsion; more preferably the formulation is a microemulsion preconcentrate. The  
15 formulation preferably comprises from about 5 to about 10% by weight of ISA<sub>TX</sub>247, from  
about 20 to about 50% by weight of Vitamin E TPGS, from about 5 to about 20% by weight  
of MCT oil, from about 5% to about 50% of Tween 40 and about 5 to about 15% by weight  
of ethanol. More preferably, the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:4:2:2:1.

In a further aspect, the invention is directed to a method of producing  
20 immunosuppression comprising administering to a subject in need thereof an effective  
amount of the pharmaceutical formulation comprising a) a pharmaceutically effective  
amount of ISA<sub>TX</sub>247, b) Vitamin E TPGS, c) MCT oil, d) Tween 40, and e) ethanol.

The present invention also contemplates a method of preparing the pharmaceutical  
formulation of the present aspect of the invention comprising mixing the MCT oil, the  
25 Tween 40, the ethanol, the Vitamin E TPGS, and the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 until the  
ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved.

In a further aspect, the invention is directed to a pharmaceutical formulation  
comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247, b) Vitamin E TPGS, c)  
MCT oil, d) Tween 80, and e) ethanol. Preferably the pharmaceutical formulation is a  
30 microemulsion; more preferably the formulation is a microemulsion preconcentrate. The  
pharmaceutical formulation preferably comprises from about 5% to about 10% by weight of  
ISA<sub>TX</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of Vitamin E TPGS, from about 5% to  
about 20% by weight of MCT oil, from about 5% to about 50% by weight of Tween 80 and

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

about 5% to about 15% by weight of ethanol. More preferably, the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:2:4:2:1.

In a further aspect, the invention is directed to a method of producing immunosuppression comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical formulation comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247, b) Vitamin E TPGS, c) MCT oil, d) Tween 80, and e) ethanol.

The present invention also contemplates a method of preparing the pharmaceutical formulation of the present aspect of the invention comprising mixing the MCT oil, the Tween 80, the ethanol, the Vitamin E TPGS, and the proper amount of ISA<sub>Tx</sub>247 until the ISA<sub>Tx</sub>247 is completely dissolved.

In yet a further aspect, the present invention is directed to a pharmaceutical formulation comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247, b) MCT oil, c) Tween 80, d) triacetin, and e) ethanol. Preferably the pharmaceutical formulation is a microemulsion; more preferably the formulation is a microemulsion concentrate. The pharmaceutical formulation preferably comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of triacetin, from about 5% to about 50% by weight of MCT oil, from about 5% to about 50% by weight of Tween 80 and about 5% to about 15% by weight of ethanol. More preferably, the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:5:3:1:1.

In a further aspect, the invention is directed to a method of producing immunosuppression comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical formulation comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247, b) MCT oil, c) Tween 80, d) triacetin, and e) ethanol.

The present invention also contemplates a method of preparing the pharmaceutical formulation of the present aspect of the invention comprising mixing the MCT oil, the Tween 80, the ethanol, the triacetin, and the proper amount of ISA<sub>Tx</sub>247 until the ISA<sub>Tx</sub>247 is completely dissolved.

In still a further aspect, the invention is directed to a pharmaceutical formulation comprising a) a pharmaceutically effective amount of a) ISA<sub>Tx</sub>247, b) Tween 80, c) Vitamin E TPGS, d) ethanol, and e) isopropyl myristate. Preferably the pharmaceutical formulation is a microemulsion; more preferably, the formulation is a microemulsion concentrate. The pharmaceutical formulation preferably comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of Vitamin E TPGS, from about 5% to about 55% by weight of isopropyl myristate, from about 5% to about 50% by

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

weight of Tween 80 and about 5% to about 15% by weight of ethanol. More preferably, the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:2:1:1:6.

In a further aspect, the invention is directed to a method of producing immunosuppression comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical formulation comprising a) ISA<sub>TX</sub>247, b) Tween 80, c) Vitamin E TPGS, d) ethanol, and e) isopropyl myristate.

The present invention also contemplates a method of preparing the pharmaceutical formulation of the present aspect of the invention comprising mixing the isopropyl myristate, the Tween 80, the ethanol, the Vitamin E TPGS n, and the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved.

In still a further aspect, the invention is directed to a pharmaceutical formulation preconcentrate comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247, b) Vitamin E TPGS, c) MCT oil, d) Tween 40, and e) ethanol. The pharmaceutical formulation preconcentrate preferably comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>TX</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of Vitamin E TPGS, from about 5% to about 20% by weight of MCT oil, from about 5% to about 50% by weight of Tween 40 and about 5% to about 15% by weight of ethanol. More preferably, the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5:4:2:2:1. Even more preferably, the formulation is a microemulsion preconcentrate, wherein the preconcentrate, when mixed with an aqueous media, forms a clear stable microemulsion solution. Preferably, the aqueous media is water or fruit juice, excluding grapefruit juice. In addition, the preconcentrate is preferably mixed with the aqueous media in a ratio of about 1 part preconcentrate to between about 10 and about 100 parts aqueous media.

In a further aspect, the invention is directed to a method of producing immunosuppression comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical formulation comprising a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247, b) Vitamin E TPGS, c) MCT oil, d) Tween 40, and e) ethanol, mixed into an aqueous media.

The present invention also contemplates a method of preparing the pharmaceutical formulation of the present aspect of the invention comprising mixing the MCT oil, the Tween 40, the ethanol, the Vitamin E TPGS n, and the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved. The resulting preconcentrate is then mixed with aqueous media, preferably in a ratio of about 1 part preconcentrate to about 10 to about 100 parts media.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

In yet another aspect, the invention is directed to a pharmaceutical formulation comprising: a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247, b) Vitamin E TPGS, c) MCT oil, d) Tween 40, and e) ethanol. The pharmaceutical formulation may be administered parenterally, such as subcutaneously (SC) or intramuscularly (IM) and is

5 optionally sterilized.

In another aspect of the present invention any one of the microemulsion pre-concentrate formulations may be mixed with an aqueous media to form a clear thermodynamically stable microemulsion solution. The aqueous media may be water or fruit juice, excluding grapefruit juice, which may react adversely with the ISA<sub>TX</sub>247. In

10 addition, the pre-concentrate may be mixed with the aqueous media in a ratio of about 1 part pre-concentrate to between about 10 and about 100 parts aqueous media.

In yet another aspect of the present invention, any one of the microemulsion pre-concentrate formulations may be an oral formulation, preferably encapsulated in a soft gelatin capsule.

#### 15 BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Fig. 1 shows a table for the formation of microemulsion pre-concentrates as a function of excipient ratio for Tween 40 and MCT Oil.

Fig. 2 shows a graph providing a comparison of pharmacokinetic (PK) profiles for our ISA<sub>TX</sub>247 microemulsion in comparison with Neoral® in Beagle dogs.

20 Fig. 3 shows an overview of exemplary synthetic pathways that may be used to prepare the cyclosporin analogs of the present invention, where stereoselective pathways are grouped according to reactive conditions;

Fig. 4 illustrates a synthetic pathway that produces a mixture of (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247 from a bromine precursor;

25 Fig. 5 illustrates another synthetic pathway that produces a mixture of (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247 from an aldehyde precursor;

#### MODE(S) FOR CARRYING OUT THE INVENTION

In general, the terms in the present application are used consistently with the manner in which those terms are understood in the art.

30 The terms "cyclosporin" and "cyclosporine" are simply a variation in spelling and are used herein interchangeably to refer to the same compound, for example cyclosporin A and cyclosporine A are the same compound) or the same class of compounds, as appropriate.



WO 03/032949

PCT/CA02/01561

By the term "microemulsion preconcentrate", as used herein, is meant a system capable upon contact with an aqueous media of providing a microemulsion. The term microemulsion is used herein in its conventionally accepted sense as a non-opaque (clear) or substantially non-opaque thermodynamically stable colloidal dispersion comprising

5 water and organic components including hydrophobic (lipophilic) organic components.

The term "emulsion" is a heterogeneous system, consisting of at least one immiscible liquid intimately dispersed in another in the form of droplets, whose diameters, in general, exceed 0.1  $\mu\text{m}$ . Such systems possess a minimal stability, which may be accentuated by additives such as surface-active agents, finely divided solids, etc.

10 Conventional "emulsions", unlike the microemulsions of the present invention, are considered to be thermodynamically unstable dispersions.

#### **A. Preparation of Formulations**

The formulations of the present invention all contain ISA<sub>T</sub>,247 as the active ingredient and synthetic or vegetable oils emulsified with a coemulsifier, preferably a

15 synthetic co-emulsifier such as a non-ionic surfactant that has a polyoxylated moiety. The formulations of the present invention may be adjusted for pH and isotonicity as needed. The formulations of the present invention may also include biocompatible polymers such as protective colloids, suspension stabilizers and building agents, excipients, binders and carriers, as needed. Certain preferred embodiments form clear stable formulations

20 providing relatively high drug solubility and relatively quick dissolution in aqueous media (less than about 5 minutes with stirring) to form clear microemulsions.

Thus, the present formulation is a microemulsion, or a microemulsion preconcentrate, containing ISA<sub>T</sub>,247, a surfactant, an oil, ethanol, and an emulsifier that is either a lipophilic and/or an amphiphilic solvent. In certain embodiments, the preparation

25 comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>T</sub>,247, from about 20% to about 50% by weight of a surfactant, such as tocopheryl polyethylene glycol carboxylic acid ester (or, optionally, emulsion stabilizers such as triacetin) from about 5% to 20% by weight of an oil component, such as MCT oils or isopropyl myristate, from about 5% to about 15% by weight of ethanol, and from about 20% to about 40 % by weight of a lipophilic solvent

30 and/or from about 10% to about 55% by weight of an amphiphilic solvent. In addition, the formulation may optionally contain from about 10% to about 20% by weight of another surfactant.

Embodiments of the present invention may have sufficient drug bioavailability (see Tables. 3 and 5 and Fig. 2) and/or decreased toxicity (see Tables 5 and 7). The mechanisms

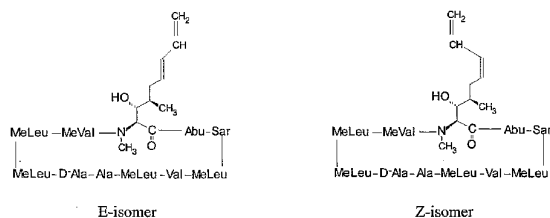
WO 03/032949

PCT/CA02/01561

for this increased bioavailability and/or decreased toxicity are unknown. However, without being limited by theory, Vitamin E TPGS may contribute to these features of the formulation. For example, co-administration of Vitamin E TPGS has been shown to increase the bioavailability of cyclosporin after liver transplants in children (see Sokol et. al.) Vitamin E TPGS may increase bioavailability by inhibiting cytochrome P450 drug metabolism in the gut. Vitamin E TPGS may inhibit the production of cyclosporin induced renal cytochrome P-450 and subsequent reduction in the formation of oxygenated metabolites. Or, Vitamin E TPGS may inhibit P-gp-controlled back transport to increase the net transport of drugs through the enterocyte layer of the gut, causing an increase in the bioavailability of a coadministered drug. In addition, Vitamin E TPGS is a known antioxidant. And, Vitamin E TPGS may play a role in arachidonic acid metabolism by influencing prostaglandin formation by inhibiting the arachidonic acid release and enzyme activity of lipoxigenase. By this process, Vitamin E TPGS may inhibit thrombocyte aggregation, and thus may decrease the nephrotoxic effect of ISA<sub>TX</sub>247 (15). Or, ISA<sub>TX</sub>247 may itself be more bioavailable and less toxic than cyclosporin A and other related compounds. Any one of these mechanisms, any combination of these mechanisms, or an unknown mechanism may contribute to the increased bioavailability and decreased toxicity of the formulations disclosed herein.

#### Active ingredient

The preferred active ingredient of the formulations of the present invention is an analog of cyclosporin, ISA<sub>TX</sub>247. ISA<sub>TX</sub>247 may be present in the formulation as a mixture of E- and Z- isomer or as a single E- or Z-isomer. The structural formulas of the ISA<sub>TX</sub>247 isomers are as follows:



WO 03/032949

PCT/CA02/01561

The present formulations are composed of the drug ISA<sub>TX</sub>247, a synthetic or vegetable oil, preferably MCT (medium chain triglycerides) oil emulsified with a synthetic co-emulsifier such as a non-ionic surfactant that has a polyoxyethylated moiety, preferably polyoxyethylated Vitamin E. The formulated content can be adjusted for pH and isotonicity as needed. These formulations can also include biocompatible polymers such as poly(vinyl pyrrolidone) (PVP), poly vinyl alcohol (PVA) or polyethylene glycol (PEG) and other polymers as protective colloids and suspension or bulking agents, excipients, binders and/or carriers, as appropriate.

*Synthesis of mixtures of the (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247 via the Wittig Reaction*

Wittig reaction pathways exemplified herein are identified by the reference numeral 31 in FIG. 3. Method 1 proceeds through the bromine intermediate acetyl--bromocyclosporin 41, whereas method 2 utilizes the aldehyde acetyl cyclosporin A aldehyde 51 as a starting point. The exemplary methods described below utilize a Wittig reaction to introduce an alkene functionality with a mixture of stereochemical configurations.

The Wittig reactions used in the exemplary embodiments disclosed herein to synthesize mixtures of the (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247 may optionally be carried out in the presence of a lithium halide. The presence of lithium halides in Wittig reactions is well known to have an effect on the ratio of geometrical isomers produced, and therefore the addition of such a compound can aid in producing a desired mixture of the (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247.

**Method 1**

In one embodiment of the present invention, a mixture of (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247 is prepared as shown in FIG. 4. The use of the wavy-lined representation in FIG. 4 (see especially compounds 43 and 44) is meant to denote that the exemplary reaction sequence produces a mixture of (E) and (Z)-isomers. In one embodiment the percentage ratio of the (E) to (Z)-isomers produced ranges from about 10 to 90 percent of the (E)-isomer to about 90 to 10 percent of the (Z)-isomer, but these ranges are only exemplary, and many other ranges are possible. For example, the mixture may contain from about 15 to 85 percent by weight of the (E)-isomer and about 85 to 15 percent of the (Z)-isomer. In other embodiments, the mixture contains about 25 to 75 percent by weight of the (E)-isomer and about 75 to 25 percent by weight of the (Z)-isomer; about 35 to 65 percent by weight of the (E)-isomer and about 65 to 35 percent by weight of the (Z)-isomer; and about 45 to 55 percent by weight of the (E)-isomer and about 55 to 45 percent of the (Z)-isomer. In still

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

another embodiment, the isomeric mixture is an ISATX247 mixture which comprises about 45 to 50 percent by weight of the (E)-isomer and about 50 to 55 percent by weight of the (Z)-isomer. These percentages by weight are based on the total weight of the composition, and it will be understood that the sum of the weight percent of the (E) isomer and the (Z) isomer is 100 weight percent. In other words, a mixture might contain 65 percent by weight of the (E)-isomer and 35 percent by weight of the (Z)-isomer, or vice versa.

Referring to FIG. 4, the terminal -carbon of the side chain of the 1-amino acid residue of acetyl-cyclosporin A is brominated in the next step of the reaction by refluxing acetyl cyclosporin A 35 with N-bromosuccinimide and azo-bis-isobutyronitrile in a solvent such as carbon tetrachloride, producing the intermediate acetyl--bromocyclosporin A 41. N-bromosuccinimide is a reagent that is often used to replace allylic hydrogens with bromine, and it is believed to do so via a free radical mechanism. The preparation of the intermediate 41 was essentially described by M.K. Eberle and F. Nuninger in "Synthesis of the Main Metabolite (OL-17) of Cyclosporin A," *J. Org. Chem.*, Vol. 57, pp. 2689-2691 (1992).

The novel intermediate triphenylphosphonium bromide of acetyl cyclosporin A 42 may be prepared from acetyl--bromocyclosporin A 41 by heating the latter compound with triphenylphosphine in a solvent such as toluene.

The novel intermediate 42, and others like it, are contemplated to be key intermediates in the synthesis of a plurality of cyclosporin A analogs that contain a conjugated diene system in the 1-amino acid residue. For example, in addition to triphenylphosphine, compounds such as triarylphosphines, trialkylphosphines, arylalkylphosphines, and triarylsilanes may be reacted with acetyl--bromocyclosporin A 41 to prepare other activated compounds similar to 42.

Referring again to FIG. 4, a mixture of the (E) and (Z)-isomers of acetyl-1,3-diene 43 may be prepared by stirring the triphenylphosphonium bromide of acetyl cyclosporin A 42 with an excess of formaldehyde in toluene at room temperature. Following addition of the formaldehyde, a base such as sodium hydroxide is added dropwise, and the isomeric mixture of dienes is extracted with ethyl acetate.

Numerous organic chemistry textbooks describe the Wittig reaction. One description in particular is provided by J. McMurry, *Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed. (Brooks/Cole, Pacific Grove, 2000), pp. 780-783. A Wittig reaction may be used to convert a ketone or an aldehyde to an alkene. In such a process, a phosphorus ylide, also called a phosphorane, may be reacted with the aldehyde or ketone to give a dipolar intermediate

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

called a betaine. Typically the betaine intermediate is not isolated; rather, it spontaneously decomposes through a four-membered ring to yield an alkene and triphenylphosphine oxide. The net result is a replacement of the carbonyl oxygen atom by the  $R_2C=$  group originally bonded to the phosphorus.

5 It will be appreciated by those skilled in the art that a wide variety of reagents may be substituted for the exemplary Wittig reaction reagents cited above. For example, numerous alkyl, aryl, aldehyde, and ketone compounds may be substituted for formaldehyde to prepare a vast number of cyclosporin derivatives. Applicants have carried out the above synthesis with formaldehyde, and in place of formaldehyde, compounds such  
10 as acetaldehyde, deuterated formaldehyde, deuterated acetaldehyde, 2-chlorobenzaldehyde, benzaldehyde, and butyraldehyde. Such Wittig reactions may be carried out with compounds other than triphenylphosphonium derivatives, such as triarylphosphines, trialkylphosphines, arylalkylphosphines and triarylsilanes. Instead of using sodium hydroxide, various other bases such as sodium carbonate, butyllithium, hexyllithium,  
15 sodium amide, lithium hindered bases such as lithium diisopropylamide, and alkali metal alkoxides may be used. In addition to varying these reagents, the reaction may be conducted in various organic solvents or mixtures of organic solvents and water, in the presence of various salts, particularly lithium halides, and at varying temperatures. All of the factors listed above can reasonably be selected by one of ordinary skill in the art to have  
20 the desired effect on the stereochemistry of the formed double bond; *i.e.*, the desired effect on the ratio of the *cis* to *trans*-isomers.

In a final step of this synthesis, the protecting group on the  $\alpha$ -carbon is removed using the following procedure. The mixture of acetyl-(E)-1,3-diene and acetyl-(Z)-1,3-diene 43 is dissolved in methanol, and then water is added. A base such as potassium carbonate is  
25 added, and the reaction mixture stirred at room temperature. Bases other than potassium carbonate that may be used include sodium hydroxide, sodium carbonate, sodium alkoxide, and potassium alkoxide. Ethyl acetate is then used to extract the final product mixture of (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247 44.

#### Method 2

30 In an alternative reaction pathway for synthesizing a mixture of (E) and (Z)-isomers of ISA<sub>TX</sub>247 via a Wittig reaction strategy, a four step synthetic pathway may be employed as follows: 1) protection of the  $\alpha$ -alcohol, as in method 1, 2) oxidation of the acetyl-cyclosporin A produced from the first step to produce an aldehyde; 3) a Wittig reaction; and 4) de-acetylation of the Wittig reaction product, or equivalently, hydrolysis of the acetate

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

ester to retrieve the alcohol. This reaction sequence is illustrated in FIG. 5.

This synthetic pathway begins in a manner similar to the Wittig reaction pathway of FIG. 4 in that the first step protects the -alcohol with an acetate ester group. The two pathways differ from here on, however, in that the next step of method 2 converts acetyl-cyclosporin A 35 to an aldehyde, acetyl cyclosporin A aldehyde 51. This reaction uses an oxidizing agent sufficiently strong to cleave a C=C bond to produce two fragments. Alkene cleavage is known in the art. Ozone is perhaps the most commonly used double bond cleavage reagent, but other oxidizing reagents such as potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>) or osmium tetroxide can cause double bond cleavage as well.

The use of ruthenium based oxidizing agents has been discussed by H.J. Carlsen *et al.* in "A Greatly Improved Procedure for Ruthenium Tetroxide Catalyzed Oxidations of Organic Compounds," *J. Org. Chem.*, Vol. 46, No. 19, pp 3736-3738 (1981). Carlsen *et al.* teach that, historically, the expense of ruthenium metal provided an incentive for the development of catalytic procedures, the most popular of which used periodate or hypochlorite as stoichiometric oxidants. These investigators found a loss of catalytic activity during the course of the reaction with the conventional use of ruthenium which they postulated to be due to the presence of carboxylic acids. The addition of nitriles to the reaction mixture, especially acetonitrile, was found to significantly enhance the rate and extent of the oxidative cleavage of alkenes in a CCl<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O/IO<sub>4</sub><sup>-</sup> system.

According to one embodiment of the present invention, acetyl cyclosporin A aldehyde 51 may be produced from acetyl cyclosporin A 35 by dissolving it in a mixture of acetonitrile and water, and then adding first sodium periodate and then ruthenium chloride hydrate. The aldehyde 51 may be extracted with ethyl acetate. It should be noted that the synthesis of the aldehyde 51 by this oxidative cleavage strategy is important to many of the stereoselective pathways.

The third step of method 2 involves converting the aldehyde 51 to a mixture of (E) and (Z) dienes via a Wittig reaction, in a similar fashion to that of method 1. As in method 1, a phosphorus ylide adds to the aldehyde to yield a betaine (which is not isolated), with the net result that the carbonyl oxygen atom of the aldehyde is replaced by the R<sub>2</sub>C= group originally bonded to phosphorus. Again, such Wittig reactions may be carried out with phosphorus containing compounds other than triphenylphosphonium derivatives, such as triarylphosphines, trialkylphosphines, arylalkylphosphines and triarylsilanes, at various temperatures, and using a variety of basic solutions and solvents or the addition of various

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

inorganic salts may be used to influence the stereochemistry of the newly formed double bond.

In one embodiment, acetyl cyclosporin A aldehyde 53 is dissolved in toluene, to which is added a base such as sodium hydroxide in water. Allyl triphenylphosphonium bromide 52 is then added, and the reaction stirred for some time. Workup of the product mixture of acetyl (E) and (Z)-1,3-dienes 53 involves extraction with hexane and/or ethyl acetate, where the term "workup" is intended to mean the process of extracting and/or isolating reaction products from a mixture of reactants, products, solvent, etc.

In a final step of method 2, similar to the final step of method 1, the acetate ester group protecting the alcohol at the  $\alpha$ -carbon position is removed with potassium carbonate, yielding a mixture of (E) and (Z) isomers of ISA<sub>TX</sub>247 54. Bases other than potassium carbonate that may be used to remove the protecting group include sodium hydroxide, sodium carbonate, sodium alkoxide, and potassium alkoxide.

#### *Vitamin E TPGS*

Tocopheryls are used in the formulations as antioxidants. D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (Vitamin E TPGS) (Eastman Kodak, Rochester, NY) is a water soluble derivative of Vitamin E, and has a dual nature of hydrophilicity and lipophilicity and has been used as an antioxidant or as a preservative in formulations known in the art. When used as an antioxidant, tocopheryl or Vitamin E TPGS may be present in

from about 0.5% to about 1%, and not more than 5% percent by weight.

Vitamin E TPGS is miscible in water and forms solutions with water at concentrations up to approximately 20% weight, beyond which liquid crystalline phases may form. Vitamin E TPGS has a high degradation temperature and good thermal stability. Micelles are formed at 0.02 percent weight. When Vitamin E TPGS concentration is above 20 percent weight, higher viscosity liquid crystalline phases form. With increasing Vitamin E TPGS concentration in water, more complex liquid crystalline phases evolve from isotropic globular micellar to isotropic cylindrical micellar and hexagonal, hexagonal, mixed hexagonal and reversed hexagonal, reversed globular micellar, and to the lamellar phase (13). In these formulations, Vitamin E TPGS is useful as a surface active agent or as an emulsifier. It may also be used in complex formulations that include a number of other excipients that function as solvent, binder, and filler.

In addition, the Vitamin E TPGS in the present invention may be present not only as an emulsifying agent and adjuvant, but also to inhibit the alteration of the oil, preventing them from becoming rancid.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

*Oil Component*

The oil component of the present formulations may be a vegetable oil, a synthetic oil, an oil substitute such as triacetin, a mineral oil or a medium chain triglyceride (MCT) oil, *i.e.*, a triglyceride oil in which the carbohydrate chain has 8-10 carbon atoms. Preferably, the oil component is MCT oil.

MCT oil has many advantages over vegetable oil, including: 1) a lower susceptibility to oxidation; 2) a specific density of about 0.94-0.95 which is higher than that of vegetable oil and which is close to that of water thus facilitating the obtaining of a stable microemulsion; 3) it is less hydrophobic than vegetable oil and therefore enables the achievement of higher concentrations of the drug dissolved therein; and 4) it has a lower viscosity which enables obtaining a higher concentration of the oily phase in the composition without substantially increasing its viscosity (15).

MCT oil is available commercially. Examples of MCT oils contemplated by the present invention include, but are not limited to, TCR<sup>TM</sup> (trade name of Societe Industrielle des Oleagineux, France, for a mixture of triglycerides wherein about 95% of the fatty acid chains have 8 or 10 carbons) and MIGLYOL 812<sup>TM</sup> (trade name of Dynamit Nobel, Sweden, for a mixed triester of glycerine and of caprylic and capric acids). Isopropyl myristate is another commercially available oil useful in formulations of the present invention.

Examples of vegetable oils contemplated by the present invention include, but are not limited to, soybean oil, cotton seed oil, olive oil, sesame oil and castor oil. Mineral oils include, but are not limited to, natural hydrocarbons or their synthetic analogs. Oily fatty acids, such as oleic acid and linoleic acid, fatty alcohols, such as oleyl alcohol, and fatty esters, such as sorbitan monooleate and hydrophobic sucrose esters, may be used as the oil component, although these are not as preferred as the other oils mentioned herein. Other lipids which may be used in the formulations of the present invention include, but are not limited to, synthetic and semi-synthetic mono-, di- and/or triglycerides, triglycerides prepared by solvent or thermal fractionation of natural, synthetic or semisynthetic triglycerides, and triglycerides prepared by interesterification and/or directed or random rearrangement.

*Emulsifiers*

The formulations of the present invention contain at least one emulsifier. Preferably the emulsifier or surfactant is a non-ionic lipophilic solvent or a non-ionic amphiphilic



WO 03/032949

PCT/CA02/01561

solvent; The emulsifier may be a Tween, such as Tween 40, Tween 80, or the like. However, any surfactant capable of forming and microemulsion preconcentrate maybe used. Some examples are given below.

The surfactant component may comprise amphiphilic, hydrophilic or lipophilic surfactants, or mixtures thereof. Especially preferred are non-ionic hydrophilic and non-ionic lipophilic surfactants. Examples of suitable hydrophilic surfactants for use as surfactant components are reaction products of natural or hydrogenated vegetable oils and ethylene glycol. Such products may be obtained in known manner, *e.g.* by reaction of a natural or hydrogenated castor oil or fractions thereof with ethylene oxide, with optional removal of free polyethyleneglycol components from the product. Also suitable are various tensides, or surfactants, available under the trade name Cremophor™. Particularly suitable is Cremophor™ RH 40 and Cremophor™ EL. Also suitable for use in this category are the various tensides available under the trade name Nikkol™.

Other examples include polyoxyethylene-sorbitan-fatty acid esters, *e.g.*, mono- and tri-lauryl, palmityl, stearyl and oleyl esters *e.g.*, Tweens, including polyoxyethylene(20)sorbitanmonolaurate [Tween® 20], polyoxyethylene(20)sorbitanmonopalmitate [Tween® 40], polyoxyethylene(20)sorbitanmonostearate [Tween® 60 ], polyoxyethylene(20)sorbitanmonooleate [Tween® 80 ], polyoxyethylene(20)sorbitantristearate [Tween® 65], polyoxyethylene(20)sorbitantriolate [Tween 85], polyoxyethylene(4)sorbitanmonolaurate [Tween® 21], polyoxyethylene(4)sorbitanmonostearate [Tween® 61], and polyoxyethylene(5) sorbitanmonooleate [Tween® 81 ]. Especially preferred products of this class for use in the compositions of the invention are Tween 40 and Tween 80, polyoxyethylene fatty acid esters, such as polyoxyethylene stearic acid esters, polyoxyethylene-polyoxypropylene co-polymers, polyoxyethylene-polyoxypropylene block co-polymers, *e.g.* of the type known and commercially available under the trade name Poloxamer™, dioctylsuccinate, dioctylsodiumsulfosuccinate, di-2-ethylhexyl-succinate or sodium lauryl sulfate, and phospholipids, in particular, lecithins. Lecithins suitable for use in the compositions of the invention include, but are not limited to, soya bean lecithins. Other suitable products include Cremophor™, Nikkol™, glycolated natural or hydrogenated vegetable oils, and caprylic-capric acid diester. Propylene glycol mono- and di-fatty acid esters such as propylene glycol dicaprylate, propylene glycol dilaurate, propylene glycol hydroxystearate, propylene glycol isostearate, propylene glycol laurate, propylene glycol ricinoleate, propylene glycol stearate are also suitable.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

The formulations of the present invention may further comprise a pharmaceutically acceptable surfactant, colloid, suspension, bulking agent, excipient, carrier, tenside or cotenside.

**B. Preferred Formulations of the Present Invention**

Embodiments of the present invention are preferably stable microemulsion pre-concentrates which provide sufficient drug bioavailability and/or reduced toxicity. These formulations may have superior ability to increase drug bioavailability and to reduce adverse effects associated with the administration of cyclosporin and its analogs. Microemulsion formulations allow for delivery of a drug in smaller particles. Delivery of a unit dosage of a drug in smaller particles allows for increased surface area and presumably higher absorption and better bioavailability. Microemulsions are known in the art. However, microemulsions using the components of the present formulation are formed by the judicious choice of ratios of ethanol, Vitamin E TP GS, oil component, and emulsifier which are outside the ranges of previous known formulations for active agents similar to ISA<sub>T<sub>2</sub></sub>247. Compositions containing less than 5% of ethanol, or greater than 50% of Vitamin E TP GS form solid microemulsion pre-concentrates at room temperature, which is a less preferred embodiment of the formulations of this invention.

The relative proportion of ingredients in the compositions of the invention will, of course, vary considerably depending on the particular type of composition concerned, *e.g.* whether it is a "microemulsion pre-concentrate", microemulsion, regular emulsion, solution and so forth. The relative proportions will also vary, depending on the particular function of ingredients in the composition, for example, in the case of a surfactant component of a "microemulsion pre-concentrate", on whether this is employed as a surfactant only or both a surfactant and a co-solvent. The relative proportions will also vary depending on the particular ingredients employed and the desired physical characteristics of the product composition. Determination of workable proportions in any particular instance will generally be within the capability of the skilled artisan. All indicated proportions and relative weight ranges described below are accordingly to be understood as being indicative of preferred or individually inventive teachings only and not as not limiting the invention in its broadest aspect. The microemulsions of the present inventions may be microemulsion pre-concentrates. Preferred formulations of the present invention are as follows:

**Formulation 1**

- a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>T<sub>2</sub></sub>247;
- b) Vitamin E TP GS;

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

- c) MCT oil;
  - d) Tween 40; and
  - e) ethanol
- in a ratio of ingredients of 0.5-1:4:2:2:1.

5 **Formulation 2**

- a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247;
  - b) Vitamin E TPGS;
  - c) MCT oil;
  - d) Tween 80; and
  - e) ethanol
- in a ratio of ingredients of 0.5-1:2:4:2:1.

10 **Formulation 3**

- a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247;
  - b) MCT oil;
  - c) Tween 80;
  - d) triacetin; and
  - e) ethanol
- in a ratio of ingredients of 0.5-1:5:3:1:1.

15 **Formulation 4**

- a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247;
  - b) Tween 80;
  - c) Vitamin E TPGS;
  - d) ethanol; and
  - e) isopropyl myristate
- in a ratio of ingredients of 0.5-1:2:1:1:6.

20 **Formulation 5**

- a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247;
- b) Vitamin E TPGS;
- c) MCT oil;
- d) Tween 40; and
- e) ethanol

in a ratio of ingredients of 0.5-1:4:2:2:1, with the formulation further mixed with an aqueous medium to form a clear stable microemulsion solution. Aqueous media may include, but are not limited to water, fruit juices, such as apple juice, tea, milk and cocoa.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

Useful fruit juices, exclude grapefruit juice and preferably include apple juice. The formulation is preferably dissolved into the aqueous media at a ratio of about 1 part formulation to about 10 to about 100 parts aqueous media.

The pharmaceutical formulations of the present invention preferably allow for sufficient bioavailability. Preferably, the bioavailability of ISA<sub>T</sub>247 is equal to or greater than 30%, more preferably the bioavailability is greater than 40%. The pharmaceutical formulations are preferably in a form for oral administration, such as microemulsions, or microemulsion preconcentrates. The aqueous media is preferably one which is palatable to a patient so that they will consume the oral formulation with ease.

When administered to a patient in need thereof in an effective amount, the formulations of the present invention will produce immunosuppression. Preferably, the amount of the pharmaceutical formulation administered is about 0.1 to 10 mg/kg of body weight of the subject per day, more preferably about 0.5 to 3 mg/kg of body weight of the subject per day. The formulation is preferably administered either once a day or twice a day.

When properly administered, the formulations of the present invention may be used for immunosuppression including, for example, to prevent organ rejection or graft vs. host disease, and to treat diseases and conditions, in particular, autoimmune and inflammatory diseases and conditions. Examples of autoimmune and inflammatory diseases contemplated herein include, but are not limited to, Hashimoto's thyroiditis, pernicious anemia, Addison's disease, psoriasis, diabetes, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, dermatomyositis, Sjogren's syndrome, dermatomyositis, lupus erythematosus, multiple sclerosis, myasthenia gravis, Reiter's syndrome, arthritis (rheumatoid arthritis, arthritis chronica progrediente and arthritis deformans) and rheumatic diseases, autoimmune hematological disorder (hemolytic anaemia, aplastic anaemia, pure red cell anaemia and idiopathic thrombocytopenia), systemic lupus erythematosus, polychondritis, scleroderma, Wegener granulomatosis, dermatomyositis, chronic active hepatitis, myasthenia gravis, psoriasis, Steven-Johnson syndrome, idiopathic sprue, autoimmune inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease) endocrine ophthalmopathy, Graves disease, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis, juvenile diabetes (diabetes mellitus type I), uveitis (anterior and posterior), keratoconjunctivitis sicca and vernal keratoconjunctivitis, interstitial lung fibrosis, psoriatic arthritis and glomerulonephritis.

The formulations of the present invention may also be used to treat anti-parasitic, or anti-protozoal diseases such as malaria, coccidiomycosis and schistosomiasis. They may

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

also be used as an agent for reversing or abrogating anti-neoplastic agent resistance in tumors.

The present invention also contemplates a formulation to be administered parenterally (e.g., subcutaneously or intramuscularly). This formulation comprises the

5 following:

- a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247;
- b) Vitamin E TP GS;
- c) MCT oil;
- d) Tween 40; and
- 10 e) ethanol.

Preferably such a formulation is sterilized prior to administration.

#### C. Methodology

We have found that stable formulations of the cyclosporin analog ISA<sub>TX</sub>247 can be prepared. The formulations of the present invention may be prepared in the following manner. However, the person skilled in the art knows that any sequence of these steps is possible. In addition, the amounts of components employed in the following is as detailed above and the methods described below can readily convert one or more steps or completely inverse the process.

While only Formulation 5 details how the microemulsion preconcentrate is added to an aqueous solution to form a microemulsion, any of the microemulsion preconcentrate formulations may be converted to microemulsions by mixing with an aqueous media. Preferably, the preconcentrate is mixed with the aqueous media at a ratio of 1 part preconcentrate to 10-100 parts media. More preferably the aqueous media is apple juice.

#### Formulation 1

25 First, the MCT oil is added to the Tween 40 to form a mixture at room temperature (20-25 °C). Next, ethanol is added to the mixture of MCT oil and Tween 40. Next, Vitamin E TP GS is added to the mixture. The mixture is then incubated with stirring at 30-35 °C until clear. Then, the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 is added. Finally, the ingredients are mixed at 30-35 °C until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved.

#### Formulation 2

30 First, the MCT oil is added to the Tween 80 to form a mixture at room temperature (20-25 °C). Next, ethanol is added to the mixture of MCT oil and Tween 80. Next, Vitamin E TP GS is added to the mixture. The mixture is then incubated with stirring at 30-35 °C

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

until clear. Then, the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 is added. Finally, the ingredients are mixed at 30-35 C until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved.

**Formulation 3**

First, the MCT oil is added to the Tween 80 to form a mixture at room temperature (20-25 C). Next, ethanol is added to the mixture of MCT oil and Tween 80. Next, triacetin is added to the mixture. The mixture is then incubated with stirring at 30-35 C until clear. Then, the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 is added. Finally, the ingredients are mixed at 30-35 C until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved.

**Formulation 4**

First, the MCT oil is added to the Tween 80 and mixed at room temperature (20-25 C). Next, isopropyl myristate and ethanol are added to the mixture at room temperature (20-25 C). Then, the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 is added. Finally, the ingredients are mixed until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved at room temperature (20-25 C).

**Formulation 5**

First, the MCT oil is added to the Tween 40 to form a mixture at room temperature (20-25 C). Next, ethanol is added to the mixture of MCT oil and Tween 40. Next, Vitamin E TPGS is added to the mixture. The mixture is then incubated with stirring at 30-35 C until clear. Then, the proper amount of ISA<sub>TX</sub>247 is added. Finally, the ingredients are mixed at 30-35 C until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved. The resulting preconcentrate is then mixed with aqueous media. Preferably, the preconcentrate is mixed with the aqueous media at a ratio of 1 part preconcentrate to 10-100 parts media.

In preferred methodologies, each of the above formulations are prepared by first dissolving the ISA<sub>TX</sub>247 in ethanol. The rest of the ingredients may be added in any order.

**DISCLOSURE OF THE EXAMPLES OF THE INVENTION**

In the examples below, the following abbreviations have the following meanings. If an abbreviation is not defined it has its generally accepted meaning.

|       |   |  |
|-------|---|--|
| w/w   | = | weight to weight                         |
| NF    | = | National Formulary                       |
| NF/NP | = | National Formulary/National Pharmacopeia |
| USP   | = | United States Pharmacopeia               |
| mg    | = | milligrams                               |
| mL    | = | milliliters                              |
| kg    | = | kilograms                                |
| ng    | = | nanograms                                |

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

nm = nanometers  
 $T_{\max}$  = Time of maximum concentration  
 $C_{\max}$  = maximum concentration  
AUC = area under the curve  
5 LCMS = Liquid Chromatography-Mass Spectrometry  
MCT = Medium chain triglycerides  
PK = Pharmacokinetics  
PS = pig skin

Two drug products, an oral solution and a soft gelatin capsule, have been developed  
10 by Isotechnika, Inc. Both drug products contain a surfactant, ethanol, a lipophilic and/or an  
amphiphilic solvent as ingredients. Preparation of each is described below.

**Example 1: Preparation of ISA<sub>T</sub>247 Oral Solution**

The following ingredients make up the ISA<sub>T</sub>247 drug product-oral solution:

ISA<sub>T</sub>247, d-alpha Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (vitamin E TPGS) NF,

15 Medium Chain Triglycerides (MCT) Oil USP, Tween-40 NF, and 95% Ethanol USP.

TABLE 1

| Composition of ISA <sub>T</sub> 247 Oral Solution                         |   |                    |               |               |
|---|---|--------------------|---------------|---------------|
| Ingredient (and Test Standard)  | Unit and/or Percentage Formula Strength: 50 mg/mL | Quantity per Batch |               |               |
|   |   | Lot #39120228      | Lot #30010532 | Lot #30040517 |
| d-alpha Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (vitamin E TPGS) NF | 42.24%  | 0.16205 kg         | 0.544 kg      | 0.768 kg      |
| Medium Chain Triglycerides (MCT) Oil USP                                  | 21.12%  | 0.08102 kg         | 0.272 kg      | 0.384 kg      |
| Tween-40 NF   | 21.12%  | 0.08102 kg         | 0.272 kg      | 0.384 kg      |
| 95% Ethanol USP   | 10.56%  | 0.04051 kg         | 0.136 kg      | 0.192 kg      |
| ISA <sub>T</sub> 247  | 4.95%   | 0.01900 kg         | 0.0637 kg     | 0.090 kg      |
| Total   | 99.99%  | 0.38360 kg         | 1.286 kg      | 1.818 kg      |

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

Vitamin E TP GS was melted in a hot box and transferred to a liquid dispenser. The warm contents of each TP GS container were mixed for at least one minute to ensure that it was a visually homogeneous liquid. When the temperature of the contents of each barrel was no less than 35 C, a Groen vessel at the required temperature  $37.5\text{ C} \pm 2.5\text{ C}$  was prepared.

The required amount of ingredients Vitamin E TP GS, MCT Oil, Tween 40 and 95% ethanol were weighed in separate vessels properly labeled for identification. The Vitamin E TP GS was immediately transferred into the Groen vessel. The MCT Oil, Tween 40, and ethanol were transferred in a stepwise fashion quantitatively to the vessel containing pre-weighed Vitamin E TP GS. The vessel was securely covered to reduce ethanol evaporation and mixed at  $37.5 \pm 2.5\text{ C}$  for 15-20 minutes after the addition of ethanol.

The top and bottom samples were observed using sterile glass disposable pipettes. The pipette contents were expected to be homogeneous and clear when viewed.

The mixer was set so that a slight vortex was achieved. The container was covered to reduce ethanol evaporation during mixing. ISA<sub>T<sub>x</sub></sub>247 was added to the continuously mixing blend. Then the container was sealed. The mixture was checked every half hour until the powder had completely dissolved.

#### Example 2: Preparation of ISA<sub>T<sub>x</sub></sub>247 Gelatin Capsule

The present invention also contemplates a soft gelatin capsule. This capsule contains ISA<sub>T<sub>x</sub></sub>247 and the same non-medicinal ingredients as the oral solution encapsulated in gelatin type 2D PS(NF/NP) capsules containing gelatin, glycerin, water, and sorbitol.

The ISA<sub>T<sub>x</sub></sub>247 gelatin capsule was prepared by encapsulating the ISA<sub>T<sub>x</sub></sub>247 oral solution (50 mg/mL) comprised of ISA<sub>T<sub>x</sub></sub>247, Vitamin E TP GS NF, medium chain triglycerides (MCT) oil USP, Tween-40 NF, and 95% ethanol USP, into gelatin type 2D PS(NF/NP) capsules. The gelatin type 2D PS(NF/NP) capsules was prepared using gelatin NF (pig skin), glycerin USP, purified water USP, and 76% sorbitol special.

#### Example 3: Stability/Shelf-life Measurements

The Table below shows stability data, as measured by well known LCMS techniques, for Formulation 1 in both bottled (stored at 30 °C) and soft-gel capsule forms (stored at room temperature). The formulations are stable under normal storage conditions.



WO 03/032949

PCT/CA02/01561

Table 2

| ISA <sub>TX</sub> 247 Concentration (mg/mL) |            |            |                         |
|---|------------|------------|-------------------------|
|   | 0 Months   | 6 Months   | 24 Months               |
| Bottled Formulation                         | 57.1 ± 0.5 | 56.7 ± 0.7 | 58.0 ± 0.6              |
| Soft-gel Capsules                           | 41.1 ± 0.6 | 42.4 ± 1.0 | 41.4 ± 0.9 <sup>A</sup> |

<sup>A</sup> 18 month measurement for soft-gel capsules**Example 4: Comparison of Pharmacokinetic (PK) Profiles**

The formulations indicated below were given to Sprague Dawley rats by oral gavage and blood levels of ISA<sub>TX</sub>247 were monitored at regular intervals over time to generate a concentration versus time curve (i.e., pharmacokinetic profile). Below is a comparison of the PK profiles of various ISA<sub>TX</sub>247 formulations, including those disclosed herein. While group number 2 shows good bioavailability in the rat model, as shown in Table 3, these results may vary substantially in dog or human models (see table 4).

Table 3

| PK profiles of various ISA <sub>TX</sub> 247 formulations |       |                  |                  |           |      |                                     |
|---|-------|------------------|------------------|-----------|------|-------------------------------------|
| Route of Admin.   | Group | T <sub>max</sub> | C <sub>max</sub> | Half-life | AUC  | Bioavailability relative to Group 1 |
| Oral  | 1     | 2                | 49               | 7.3       | 559  | +0                                  |
| Oral  | 2     | 4                | 75               | 6.1       | 1150 | +106                                |
| Oral  | 3     | 4                | 36               | 18.1      | 491  | -12                                 |
| Oral  | 4     | 4                | 68               | 7.4       | 885  | +58                                 |
| Oral  | 5     | 2                | 104              | 7.1       | 1298 | +132                                |
| Oral  | 6     | 4                | 57               | 7.7       | 750  | +34                                 |

T<sub>max</sub> = Time (hours) to maximum blood level of ISA<sub>TX</sub>247C<sub>max</sub> = Maximum blood level (ng/mL) of ISA<sub>TX</sub>247Half-life = Time (hours) to reach half maximal ISA<sub>TX</sub>247 blood level

AUC = Area under the curve. (Related to bioavailability of drug.)

10

**Group 1:**

VitE-TPGS / MCT Oil / Tween 40/ ethanol: 4/2/2/1 (w/w/w/w). (Disclosed herein as Formulation 1).

**Group 2:**

15 VitE-TPGS / MCT Oil / Tween 80/ ethanol: 2/4/2/1 (w/w/w/w). (Disclosed herein as Formulation 2).

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

**Group 3:**

MCT Oil / Tween 80 / Triacetin / ethanol: 5/3/1/1 (w/w/w/w). (Disclosed herein as Formulation 3).

**Group 4:**

5 Tween 80 / VitE-TPGS / ethanol / isopropyl myristate: 2/1/1/6 (w/w/w/w).  
(Disclosed herein as Formulation 4).

**Group 5 (comparative example):**

Vit E / propylene glycol / Maisine / Chremophor RH 40 / ethanol: 3/1.2/5/6.2/2  
(w/w/w/w).

**Group 6:**

10 This is the formulation diluted 1:65 in apple juice to form a microemulsion.  
(Disclosed herein as Formulation 5).

**Example 5: Preparation of Microemulsions**

Over 100 ratio permutations of formulation components were tested for microemulsion  
15 formation (defined as less than 0.1 and 0.01 absorbance at 485 and 900 nm, respectively).  
Formulations tested included ratios of components from:

5-10 % ISA<sub>TX</sub>247

0-50 % Vitamin E-TPGS

0-50 % Tween 40 and/or Tween 80

20 0-50 % MCT Oil

5-15 % Ethanol.

Less than 20% of the formulations tested produced microemulsions. The  
microemulsion formation is relatively independent of the ratio of either Vitamin E-TPGS or  
ethanol. However, formulations with ratio's of Vitamin E-TPGS greater than 50%, and  
25 ethanol less than 5%, result in preconcentrates that are frozen at room temperature, which  
are less preferred. Figure 1 shows a table for the formation of microemulsion  
preconcentrates as a function of excipient ratio for Tween 40 and MCT Oil.

**Example 6: Comparison of Pharmacokinetic (PK) Profiles in Dogs**

Figure 2 shows a graph providing a comparison of pharmacokinetic (PK) profiles  
30 for our ISA<sub>TX</sub>247 microemulsion in comparison with Neoral® in Beagle dogs. The data is  
also tabulated below. The formulations were given to Beagle dogs (n = 6) by oral gavage  
and blood levels of ISA<sub>TX</sub>247 were monitored at regular intervals over time to generate a  
concentration versus time curve (i.e., pharmacokinetic profile). Specifically, dogs were  
given 2 mL of either formulation (100 mg/mL) by oral gavage. Blood was withdrawn at T =

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 12 and 24 hours post-dose and analyzed by Liquid Chromatography

- Mass Spectrometry (LCMS).

Table 4

| Summary of Results      |       |      |            |       |
|-------------------------|-------|------|------------|-------|
| Route of Administration | Group | Tmax | Cmax       | AUC   |
| Oral                    | 1     | 2 H  | 1439 ± 378 | 8290  |
| Oral                    | 2     | 2 H  | 2158 ± 677 | 11460 |

Tmax = Time (hours) to maximum blood level of ISA<sub>TX</sub>247Cmax = Maximum blood level (ng/ml) of ISA<sub>TX</sub>247

AUC = Area under the curve. (Rated to bioavailability of drug.)

**Group 1:**

5 Formulation 1: VitE-TPGS / MCT Oil / Tween 40/ ethanol: 4/2/2/1 (w/w/w/w).

**Group 2:**

Neoral®

Although these data indicate a slightly lower bioavailability of the ISA<sub>TX</sub>247 formulation, relative to Neoral, it is substantially greater than the bioavailability provided by Sandimmune®. (Data not shown) Neoral® is generally reported to be about 40% bioavailable. As Table 4 illustrates, the bioavailability of Group number 1 is comparable to that of Neoral®.

These data indicate that the formulations of the present invention may have bioavailability comparable to other formulations of cyclosporin and may reduce adverse effects associated with the administration of cyclosporin.

15 **Example 7: Pharmacokinetic and Toxicokinetic Properties of ISA<sub>TX</sub>247 and Cyclosporin A**

The pharmacokinetic and toxicokinetic parameters of ISA<sub>TX</sub>247 (45-50% of E-isomer and 50-55% of Z-isomer) and cyclosporine A were tested in a rabbit model. The rabbit has also been used as a model to study cyclosporine A nephrotoxicity, but far less frequently than the rat. Studies have found that cyclosporine A administered to the rabbit causes structural and functional changes at a dose not only lower than has been previously reported in other animal models, but also within at least the upper level of the therapeutic range in humans (Thliveris *et al.*, 1991, 1994). Also, the finding of interstitial fibrosis and arteriolopathy, in addition to the cytological changes in the tubules, suggests that the rabbit

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

is a more appropriate model to study nephrotoxicity, since these structural entities are hallmarks of nephrotoxicity observed in humans. ISA<sub>TX</sub>247 was administered intravenously (i.v.) for the first 7 days and subcutaneously (s.c.) for an additional 23 days according to the following schedule.

5

Table 5

**The Dose Administration Schedule for the Investigation of the Pharmacokinetic and Toxicokinetic Properties of ISA<sub>TX</sub>247 in the Rabbit Model**

| Treatment Group           | Days 1-7:            | Days 8-30:           | Number of Animals |         |
|---------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------|
|                           | i.v. Dose<br>(mg/kg) | s.c. Dose<br>(mg/kg) | Males             | Females |
| 1. Vehicle Control        | 0                    | 0                    | 4                 | 4       |
| 2. Cyclosporine A Control | 10                   | 10                   | 6                 | 6       |
| 3. Low-Dose               | 5                    | 5                    | 0                 | 2       |
| 4. Medium-Dose            | 10                   | 10                   | 4                 | 4       |
| 5. High-Dose              | 15                   | 15                   | 4                 | 4       |

Pathogen free rabbits (SPF) were used to ensure any renal changes observed were due to the effect of ISA<sub>TX</sub>247 and not due to pathogens. On Days 1 and 7, blood samples were collected prior to drug administration and at 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 18, and 24 hours post-dose to generate a pharmacokinetic profile. Other evaluated parameters included clinical observations, body weight, food consumption, hematology, clinical chemistry, gross pathology, and histopathological examination of selected tissues/organs.

10

Blood samples were analyzed via high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LCMS). Table 6 below summarizes the average pharmacokinetic parameters in rabbits that received 10 mg/kg of cyclosporine A or ISA<sub>TX</sub>247.

15

Table 6

**Pharmacokinetic Parameters of Intravenously Administered Cyclosporine A and ISA<sub>TX</sub>247 in Male Rabbits Receiving 10 mg/kg/day. Results expressed as mean  $\pm$  SD**

| Measured Parameter       | Cyclosporine A  |                 | ISA <sub>TX</sub> 247 |                 |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
|                          | Day 1           | Day 7           | Day 1                 | Day 7           |
| t <sub>max</sub> (hours) | 0.5             | 0.5             | 0.5                   | 0.5             |
| C <sub>max</sub> (@g/L)  | 1954 $\pm$ 320  | 2171 $\pm$ 612  | 1915 $\pm$ 149        | 1959 $\pm$ 470  |
| t <sub>1/2</sub> (hours) | 7.4 $\pm$ 2.8   | 9.0 $\pm$ 4.0   | 7.4 $\pm$ 1.7         | 9.2 $\pm$ 1.1   |
| AUC (@g@hr/L)            | 6697 $\pm$ 1717 | 6685 $\pm$ 1247 | 5659 $\pm$ 1309       | 5697 $\pm$ 1373 |

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

There were no statistically significant differences between the pharmacokinetic parameters of cyclosporine A and ISA<sub>TX</sub>247 in male rabbits receiving 10 mg/kg/day. The pharmacokinetic parameters of ISA<sub>TX</sub>247 in female rabbits receiving the same dose were not significantly different from that observed in the male rabbits, with the exception of maximum concentration on Day 7.

No significant changes were noted in the hematological parameters of rabbits receiving a vehicle control, cyclosporine A, or ISA<sub>TX</sub>247. A difference was noted in the creatinine levels in the various groups over the course of the study, as is shown in Table 7 below. These differences indicated that cyclosporine A had a significantly greater negative effect on the kidneys than either the vehicle control or ISA<sub>TX</sub>247. It should be noted that even at a 50 % higher dose, 15 mg/kg/day, as compared to 10 mg/kg/day cyclosporine A, ISA<sub>TX</sub>247 did not result in any significant increase in serum creatinine levels.

Table 7

Percent Change in Serum Creatinine Levels Over Baseline in Male Rabbits Receiving Vehicle, Cyclosporine A, or ISA<sub>TX</sub>247 for 30 Days

| Treatment Group                 | Day 15 | Day 30 |
|---------------------------------|--------|--------|
| Vehicle                         | + 6%   | - 3%   |
| Cyclosporine A (10mg/kg)        | +22%   | +33%   |
| ISA <sub>TX</sub> 247 (10mg/kg) | +1%    | +10%   |
| ISA <sub>TX</sub> 247 (15mg/kg) | - 19%  | - 11%  |

Examination of organs in all rabbits receiving the vehicle control, 10 mg/kg cyclosporine A, 5 mg/kg ISA<sub>TX</sub>247, or 10 mg/kg ISA<sub>TX</sub>247 revealed no significant abnormalities. This was especially true for the kidneys, in which no evidence of interstitial fibrosis, normally seen in cyclosporine A-treated animals (Thliveris *et al.*, 1991, 1994) was noted. In male rabbits that received 15 mg/kg ISA<sub>TX</sub>247, a decrease in spermatogenesis was noted. No changes were noted in the 3 female rabbits that completed the study at this dose of 15 mg/kg ISA<sub>TX</sub>247.

While this invention has been particularly shown and described with references to preferred embodiments thereof, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and details may be made therein without departing from the spirit and scope of the invention as defined by the appended claims.

All references discussed above are herein incorporated by reference in their entirety.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

## CLAIMS

1. A microemulsion preconcentrate comprising:
  - a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247;
  - b) Vitamin E TPGS;
  - 5 c) MCT oil;
  - d) an emulsifier selected from the group consisting of Tween 40 and Tween 80; and
  - e) ethanol.
2. The microemulsion preconcentrate of claim 1, wherein the pharmaceutical
 10 formulation comprises from about 5 to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, greater than 0% to about 50% by weight of Vitamin E TPGS, greater than 0% to about 50% by weight of MCT oil, greater than 0% to about 50% by weight of emulsifier and about 5 to about 15% by weight of ethanol, wherein the formulation is a liquid microemulsion preconcentrate at room temperature.
- 15 3. The microemulsion preconcentrate of claim 2, wherein the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:4:2:2:1.
4. A method of preparing the microemulsion preconcentrate of claim 1 comprising mixing the MCT oil, the emulsifier, the ethanol, the Vitamin E TPGS, and the proper amount of ISA<sub>Tx</sub>247 until the ISA<sub>Tx</sub>247 is completely dissolved, wherein the formulation is
 20 a liquid at room temperature.
5. A pharmaceutical formulation comprising:
  - a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247;
  - b) Vitamin E TPGS;
  - c) MCT oil;
  - 25 d) Tween 40; and
  - e) ethanol.
6. The pharmaceutical formulation of claim 5, wherein the pharmaceutical formulation
 30 comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of Vitamin E TPGS, from about 5% to about 20% by weight of MCT oil, from about 5% to about 50% by weight of Tween 40 and about 5% to about 15% by weight of ethanol.
7. The pharmaceutical formulation of claim 6, wherein the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:4:2:2:1.
8. A method of preparing the pharmaceutical formulation of claim 5, comprising

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

mixing the MCT oil, the Tween 40, the ethanol, the Vitamin E TP GS , and the proper amount of ISA<sub>Tx</sub>247 until the ISA<sub>Tx</sub>247 is completely dissolved.

9. A pharmaceutical formulation comprising:
  - a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247;
  - 5 b) Vitamin E TP GS;
  - c) MCT oil;
  - d) Tween 80; and
  - e) ethanol.
10. The pharmaceutical formulation of claim 9, wherein the pharmaceutical formulation comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of Vitamin E TP GS, from about 5% to about 20% by weight of MCT oil, from about 5% to about 50% by weight of Tween 80 and about 5% to about 15% by weight of ethanol.
11. The pharmaceutical formulation of claim 10, wherein the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:2:4:2:1.
12. A method of preparing the pharmaceutical formulation of claim 9, comprising mixing the MCT oil, the Tween 80, the ethanol, the Vitamin E TP GS , and the proper amount of ISA<sub>Tx</sub>247 until the ISA<sub>Tx</sub>247 is completely dissolved
13. A pharmaceutical formulation comprising:
  - 20 a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247;
  - b) MCT oil;
  - c) Tween 80;
  - d) triacetin; and
  - e) ethanol.
- 25 14. The pharmaceutical formulation of claim 13, wherein the pharmaceutical formulation comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of triacetin, from about 5% to about 50% by weight of MCT oil, from about 5% to about 50% by weight of Tween 80 and about 5% to about 15% by weight of ethanol.
- 30 15. The pharmaceutical formulation of claim 14, wherein the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:5:3:1:1.
16. A method of preparing the pharmaceutical formulation of claim 13, comprising mixing the MCT oil, the Tween 80, the ethanol, the triacetin, and the proper amount of ISA<sub>Tx</sub>247 until the ISA<sub>Tx</sub>247 is completely dissolved.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

17. A pharmaceutical formulation comprising:
- a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247;
  - Tween 80;
  - Vitamin E TP GS;
  - 5 d) ethanol; and
  - e) isopropyl myristate.
18. The pharmaceutical formulation of claim 17, wherein the pharmaceutical formulation comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of Vitamin E TP GS, from about 5% to about 55% by weight of isopropyl myristate, from about 5% to about 50% by weight of Tween 80 and about 5% to about 15% by weight of ethanol.
19. The pharmaceutical formulation of claim 18, wherein the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:2:1:1:6.
20. A method of preparing the pharmaceutical formulation of claim 17, comprising
- 15 mixing the isopropyl myristate, the Tween 80, the ethanol, the Vitamin E TP GS, and the proper amount of ISA<sub>Tx</sub>247 until the ISA<sub>Tx</sub>247 is completely dissolved.
21. A pharmaceutical formulation preconcentrate comprising:
- a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247;
  - Vitamin E TP GS;
  - 20 c) MCT oil;
  - d) Tween 40; and
  - e) ethanol;
- wherein the preconcentrate when mixed with an aqueous media forms a clear stable microemulsion solution.
- 25 22. The pharmaceutical formulation preconcentrate of claim 21, wherein the pharmaceutical formulation comprises from about 5% to about 10% by weight of ISA<sub>Tx</sub>247, from about 20% to about 50% by weight of Vitamin E TP GS, from about 5% to about 20% by weight of MCT oil, from about 5% to about 50% by weight of Tween 40 and about 5% to about 15% by weight of ethanol.
- 30 23. The pharmaceutical formulation preconcentrate of claim 22, wherein the ratio by weight of a:b:c:d:e is about 0.5-1:4:2:2:1.
24. A microemulsion preconcentrate comprising:
- a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>Tx</sub>247;
  - b) Vitamin E TP GS;



WO 03/032949

PCT/CA02/01561

- c) MCT oil;
- d) Tween 40; and
- e) ethanol;

wherein the preconcentrate, when mixed with an aqueous media in a ratio of about 1 part  
 5 preconcentrate to about 10 to about 100 parts aqueous media forms a clear stable  
 microemulsion solution.

25. The pharmaceutical formulation of claim 21, wherein the aqueous media is selected  
 from the group consisting of water, fruit juice (excluding grapefruit juice), tea, milk and  
 cocoa.

10 26. The pharmaceutical formulation of claim 25, wherein the fruit juice is apple juice.

27. A method of preparing the pharmaceutical formulation of claim 21, comprising  
 mixing the MCT oil, the Tween 40, the ethanol, the Vitamin E TPGS n, and the proper  
 amount of ISA<sub>TX</sub>247 until the ISA<sub>TX</sub>247 is completely dissolved then mixing the  
 formulation into an aqueous medium until a microemulsion preconcentrate solution is  
 15 formed.

28. A pharmaceutical formulation comprising:

- a) a pharmaceutically effective amount of ISA<sub>TX</sub>247;
- b) Vitamin E TPGS;
- c) MCT oil;
- 20 d) Tween 40; and
- e) ethanol;

wherein the pharmaceutical formulation is suitable for subcutaneous or intramuscular  
 administration.

29. The pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, or 17 wherein the  
 25 pharmaceutical formulation is an emulsion or a microemulsion.

30. The pharmaceutical formulation of any of claims 5, 9, 13, or 17 wherein the  
 pharmaceutical formulation is an emulsion or a microemulsion preconcentrate.

31. The pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, 17, 21 or 28, wherein  
 the bioavailability of ISA<sub>TX</sub>247 is greater than about 30%.

30 32. The pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, 17 or 21, wherein the  
 pharmaceutical formulation is for oral administration.

33. The pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, 17, 21 or 28 wherein  
 the pharmaceutical formulation further comprises biocompatible polymers as protective  
 colloids, suspension stabilizers or bulking agents, excipients, binders and carriers.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

34. The pharmaceutical formulation of claim 33, wherein the biocompatible polymer is selected from the group consisting of polyoxyethylene glycolated natural or hydrogenated vegetable oils, Cremophor<sup>TM</sup>, Nikkol<sup>TM</sup>, Tweens, polyoxyethylene-polyoxypropylene block co-polymers, lecithins, propylene glycol mono- and di-fatty acid esters and propylene glycol caprylic-capric acid diester.
35. The pharmaceutical formulation of claim 34, wherein the Tween is selected from the group consisting of polyoxyethylene(20)sorbitanmonolaurate, polyoxyethylene(20)sorbitanmonopalmitate, polyoxyethylene(20)sorbitantriolate, polyoxyethylene(20)sorbitanmonostearate, polyoxyethylene(20)sorbitanmonooleate, polyoxyethylene(20)sorbitantristearate, polyoxyethylene(4)sorbitanmonolaurate, polyoxyethylene(4)sorbitanmonostearate, and polyoxyethylene(5)sorbitanmonooleate.
36. A method of producing immunosuppression comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of the pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, 17, 21 or 28.
37. The method of claim 36, wherein the amount of the pharmaceutical formulation administered is about 0.5 to 3 mg/kg of body weight of said subject per day.
38. The method of claim 36, wherein the pharmaceutical formulation is administered once a day.
39. The method of claim 36, wherein the pharmaceutical formulation is administered twice a day.
40. The method of claim 36, wherein the pharmaceutical formulation is used to treat an inflammatory or autoimmune disease or condition in said subject.
41. A method of increasing the immunosuppressive effects of ISA<sub>1</sub>247 by preparing the pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, 17, 21 or 28.
42. The pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, 17, or 28, wherein the concentrate is mixed with the aqueous media in a ratio of about 1 part concentrate to about 10 to about 100 parts aqueous media.
43. The pharmaceutical formulation of claim 42, wherein the aqueous media is selected from the group consisting of water, fruit juice (excluding grapefruit juice), tea, milk and cocoa.
44. The pharmaceutical formulation of claim 43, wherein the fruit juice is apple juice.
45. The pharmaceutical formulation of claim 32, wherein the oral formulation is encapsulated in a soft gelatin capsule.
46. A use of the pharmaceutical formulation of any of claims 1, 5, 9, 13, 17, 21 or 28 in

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

the manufacture of a medicament for producing immunosuppression when administered to a subject.

47. The use of claim 36, wherein the medicament is suitable for administration of about 0.5 to 3 mg of the pharmaceutical formulation per kilogram of body weight of said subject
- 5 per day.
48. The use of claim 36, wherein the medicament is to be administered once a day.
49. The use of claim 36, wherein the medicament is to be administered twice a day.
50. The use of claim 36, wherein the medicament is used to treat an inflammatory or autoimmune disease or condition in said subject.
- 10 51. A use of the pharmaceutical formulation of any claims 1, 5, 9, 13, 17, 21 or 28 in the preparation of a medicament for increasing the immunosuppressive effects of ISA<sub>Tx</sub>247.

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

1/5

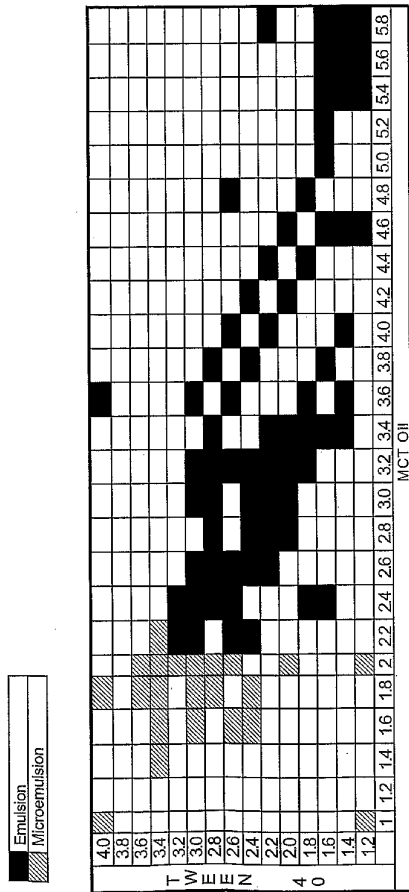


FIG. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/032949

PCT/CA02/01561

2/5

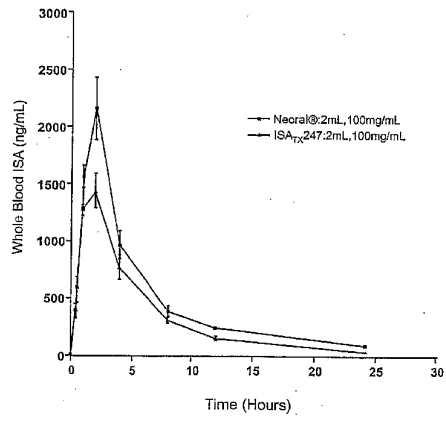
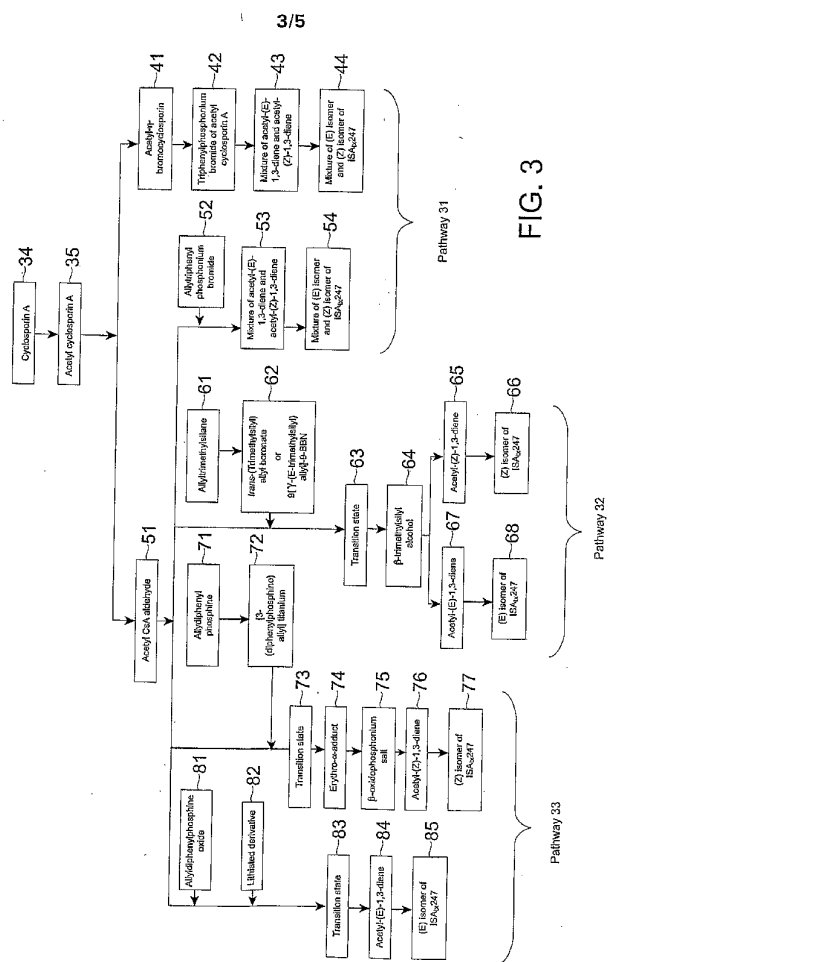


FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



4/5

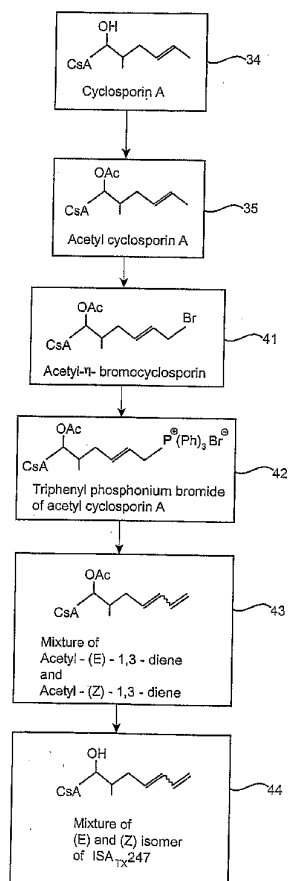


FIG. 4

5/5

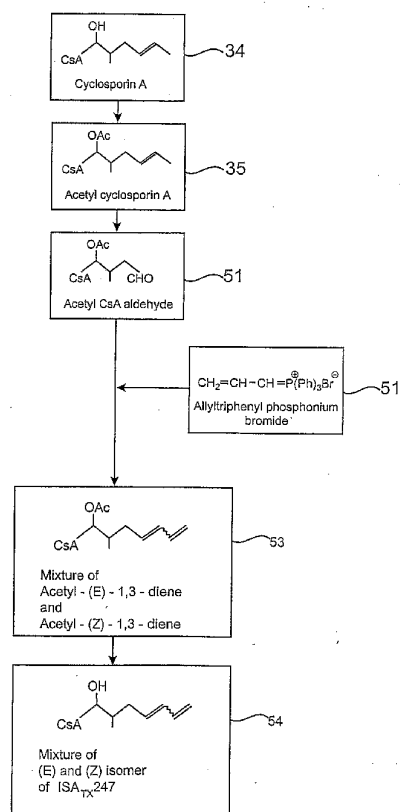


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |  | International Application No.<br>PCT/CA 02/01561                 |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 A61K9/107 A61K38/13  |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>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)<br>EPO-internal, EMBASE, BIOSIS, PAJ, WPI Data  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| A  | WO 01 21154 A (RTP PHARMA INC)<br>29 March 2001 (2001-03-29)<br>* page 10, last paragraph; page 11 second paragraph; page 12 line 1; page 15-page 17; claim 3  | 1-51   |
| A  | WO 01 28518 A (VESIFACT AG ; WEDER HANS G (CH); SUPERSAXO ANDREAS WERNER (CH); WED)<br>26 April 2001 (2001-04-26)<br>* page 1, line 6; page 4, line 12-29; page 5, line 33 - page 6, line 32; page 8, lines 9-27; page 10, lines 5-6 * | 1-51   |
| <input 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:<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)<br>*O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention<br>*** 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<br>**** 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<br>*A* document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>6 February 2003   |  | Date of mailing of the international search report<br>20/02/2003 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl<br>Fax (+31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br>Büttner, U                                 |

Form PCT/ISA210 (2001.01) (English)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
information on patent family membersInternational Application No  
PCT/CA 02/01561

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0121154 A                              | 29-03-2001          | AU 7984200 A               | 24-04-2001          |
|   |                     | CN 1384734 T               | 11-12-2002          |
|   |                     | EP 1214059 A2              | 19-06-2002          |
|   |                     | WO 0121154 A2              | 29-03-2001          |
| WO 0128518 A                              | 26-04-2001          | AU 7638200 A               | 30-04-2001          |
|   |                     | AU 7638300 A               | 30-04-2001          |
|   |                     | AU 7767600 A               | 30-04-2001          |
|   |                     | WO 0128518 A1              | 26-04-2001          |
|   |                     | WO 0128519 A1              | 26-04-2001          |
|   |                     | WO 0128520 A1              | 26-04-2001          |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 K 47/14            | A 6 1 K 47/14 |            |
| A 6 1 K 47/22            | A 6 1 K 47/22 |            |
| A 6 1 K 47/30            | A 6 1 K 47/30 |            |
| A 6 1 K 47/34            | A 6 1 K 47/34 |            |
| A 6 1 K 47/44            | A 6 1 K 47/44 |            |
| A 6 1 P 29/00            | A 6 1 P 29/00 |            |
| A 6 1 P 37/06            | A 6 1 P 37/06 |            |

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,EC,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ロバート ティー フォスター

カナダ、アルバータ T 6 J 2 C 9、エドムントン、ウェストブルック ドライブ 3 4

F ターム(参考) 4C076 AA17 AA54 AA55 AA56 BB01 BB15 BB16 CC04 CC07 DD09  
DD37 DD46 DD59 EE23 EE52 EE58 FF16 FF34  
4C084 AA03 BA01 BA09 BA17 BA25 CA59 MA05 MA22 MA37 MA52  
MA66 NA06 NA11 ZB08 ZB11