

(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2005-504715
(P2005-504715A)

(43) 公表日 平成17年2月17日(2005.2.17)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 47/48
A61K 9/14
A61K 38/28
A61K 47/02
A61K 47/12

F 1

A 61 K 47/48
A 61 K 9/14
A 61 K 47/02
A 61 K 47/12
A 61 K 47/18

テーマコード(参考)

4 C 0 7 6
4 C 0 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-554139 (P2002-554139)	(71) 出願人	500581847 アドバンスト インハレーション リサーチ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 139 ケンブリッジ, シドニー ストリート 88
(86) (22) 出願日	平成13年12月18日 (2001.12.18)	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月27日 (2003.6.27)	(72) 発明者	バス, スジト, ケイ. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 138 ケンブリッジ, ユニット 1, スターンズ ストリート 1
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/048956		
(87) 國際公開番号	W02002/053190		
(87) 國際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		
(31) 優先権主張番号	09/752,109		
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】持続放出特性を有する吸入用粒子

(57) 【要約】

本発明は、一般に、患者への治療剤、予防剤および診断剤の肺送達のための方法、ここで、薬剤は持続様式で放出される、および本発明における使用に適切な粒子に関する。特に、本発明は、荷電した脂質と会合した治療剤、予防剤または診断剤もしくはその組み合わせを含む粒子の有効量を治療、予防または診断を必要とする患者の気道に投与することを含む治療剤、予防剤、診断剤の肺送達方法に関し、ここで荷電した脂質は、薬剤との会合の際に薬剤とは逆の全体の正味の電荷を有する。投与された粒子からの放出は、持続様式で起こる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

荷電した脂質と会合した生物活性剤を含有し、ここで該荷電した脂質は全体で正味の正の電荷を有し、該薬剤は会合の際に全体で正味の負の電荷を有し、該薬剤の放出が持続される粒子の有効量を治療、予防または診断を必要とする患者の気道に投与することを含む、肺系を介する送達方法。

【請求項 2】

薬剤と荷電した脂質との会合がイオン複合体形成を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

脂質と薬剤との会合が水素結合をさらに含む請求項 2 記載の方法。

10

【請求項 4】

脂質対生物活性剤の電荷比が約 0.25:1 ~ 約 1:0.25 である請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

脂質対生物活性剤の電荷比が約 0.5:1 ~ 約 1:0.5 である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

脂質対生物活性剤の電荷比が約 1:1 である請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

生物活性剤がタンパク質である請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

タンパク質がインスリンである請求項 7 記載の方法。

20

【請求項 9】

持続放出が投与後少なくとも約 6 時間である請求項 8 記載の方法。

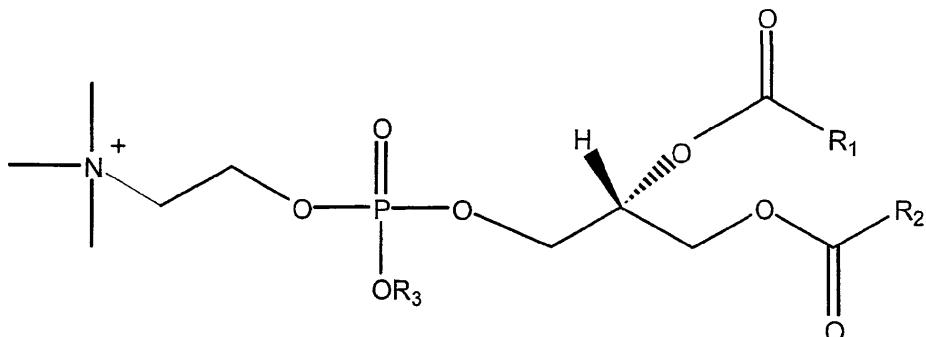
【請求項 10】

脂質が 1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホコリンまたは 1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホアルカノールアミンである請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホコリン脂質が式 III :

【化 1】



30

式中、R₁ および R₂ は独立して約 3 ~ 約 24 個の炭素を有する脂肪族基である；および R₃ は約 1 ~ 約 24 個の炭素を有する脂肪族基である、
により表される請求項 10 記載の方法。

40

【請求項 12】

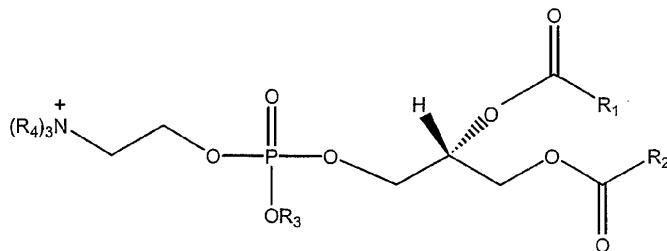
1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホコリンが 1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DPePC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DMePC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DSePC)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DLcPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DOePC) またはその任意の組み合わせである請求項 10 記載の方法。

50

【請求項 13】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホアルカノールアミンが式IV：

【化2】



10

式中、R₁およびR₂は、独立して約3～約24炭素を有する脂肪族基であり；

R₃は、約1～約24炭素を有する脂肪族基である；および

R₄は、独立して、水素または約1～約6炭素を有する脂肪族基である

により表される請求項10記載の方法。

【請求項14】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホアルカノールアミンが1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エチルエタノールアミン(DPePE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン(DMePE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン(DSePE)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン(DLePE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン(DOePE)またはその任意の組み合わせである請求項10記載の方法。

20

【請求項15】

粒子が約0.4g/cm³未満の嵩密度を有する請求項1記載の方法。

【請求項16】

粒子が約0.1g/cm³未満の嵩密度を有する請求項15記載の方法。

【請求項17】

粒子が約5マイクロメートル～約30マイクロメートルのメジアン幾何学的直径を有する請求項1記載の方法。

30

【請求項18】

粒子が約1～約5ミクロンの空気力学的直径を有する請求項1記載の方法。

【請求項19】

粒子が約1～約3ミクロンの空気力学的直径を有する請求項18記載の方法。

【請求項20】

粒子が約3～約5ミクロンの空気力学的直径を有する請求項18記載の方法。

【請求項21】

肺系への送達が深肺への送達を含む請求項1記載の方法。

【請求項22】

肺系への送達が中央気道への送達を含む請求項1記載の方法。

【請求項23】

肺系への送達が上気道への送達を含む請求項1記載の方法。

40

【請求項24】

粒子が全体で正味の電荷を有さない脂質をさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項25】

粒子がカルボン酸またはその塩をさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項26】

カルボン酸が少なくとも2つのカルボキシル基を含む請求項25記載の方法。

【請求項27】

粒子が多価金属塩またはそのイオン成分をさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項28】

50

多価塩がアルカリ土類金属の塩である請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

粒子がアミノ酸をさらに含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 0】

アミノ酸が疎水性である請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

疎水性アミノ酸がロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、フェニルアラニンまたはその任意の組み合わせである請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

荷電した脂質と会合したインスリンを含有し、ここで該荷電した脂質は、会合の際にインスリンの全体で正味の負の電荷とは逆の全体で正味の正の電荷を有し、該インスリンの放出が持続される粒子の有効量を治療を必要とする患者の気道に投与することを含む、肺系を介する送達方法。 10

【請求項 3 3】

脂質が1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホコリンまたは1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホアルカノールアミンである請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホコリンが1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DPePC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DMePC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DSePC)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DLePC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン (DOePC) またはその任意の組み合わせである請求項 3 3 記載の方法。 20

【請求項 3 5】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホアルカノールアミンが1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エチルエタノールアミン (DPePE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (DMePE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (DSePE)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (DLePE)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (DOePE) またはその任意の組み合わせである請求項 3 3 記載の方法。 30

【請求項 3 6】

薬剤と荷電した脂質との会合がイオン複合体形成を含む請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 7】

脂質および薬剤の会合が水素結合をさらに含む請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

脂質対生物活性剤の電荷比が約 0.25:1 ~ 約 1:0.25 である請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 9】

脂質対生物活性剤の電荷比が約 0.5:1 ~ 約 1:0.5 である請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 4 0】

脂質対生物活性剤の電荷比が約 1:1 である請求項 3 9 記載の方法。 40

【請求項 4 1】

粒子がカルボン酸をさらに含有する請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 4 2】

粒子がアミノ酸をさらに含有する請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 4 3】

粒子が全体で正味の電荷を有さない脂質をさらに含有する請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 4 4】

粒子が多価金属塩またはそのイオン成分をさらに含有する請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 4 5】

肺系への送達が深肺への送達を含む請求項 3 2 記載の方法。 50

【請求項 4 6】

肺系への送達が中央気道への送達を含む請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 4 7】

肺系への送達が上気道への送達を含む請求項 3 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0 0 0 1】****発明の背景**

生物活性剤、例えば、治療剤、診断剤、および予防剤の肺送達は、例えば、経口投与、経皮投与および非経口投与の魅力的な代替物を提供する。すなわち、肺投与は、典型的には、医学介入（自己投与）を必要とせず完了され、注入治療にしばしば付随する疼痛は避けられ、経口治療で頻繁に遭遇する、生物活性剤の酵素的およびpH媒介性分解の量が有意に減少されうる。さらに、肺は、薬物吸収のための大きな粘膜表面を提供し、吸収された薬物の初回通過肝臓影響がない。さらに、多くの分子、例えば、高分子の高バイオアベイラビリティが、肺送達または吸入により達成されうることが示された。典型的には、深肺、または肺胞は、吸入された生物活性剤、特に、全身送達を必要とする薬剤のための主要な標的である。

【0 0 0 2】

局所性循環および／または全身性循環への生物活性剤の放出動態または放出プロフィールは、肺送達を利用するものを含む、ほとんどの治療において鍵となる重要なものである。すなわち、多くの疾患または状態は、有効な治療を提供するために、定常性または持続性のレベルの生物活性剤の投与を必要とする。典型的には、これは、複数投薬レジメにより、または医薬を持続様式で放出する系を使用することにより達成されうる。

【0 0 0 3】

しかし、肺系への生物活性剤の送達は、典型的には、投薬後に薬物の迅速な放出を生じる。例えば、Pattonら、米国特許第5,997,848号は、肺送達による乾燥粉体製剤の投与後のインスリンの迅速な吸収を記載する。ピークインスリンレベルは、靈長類について約30分およびヒト被験体について約20分で到達された。さらに、Heinemann、TrautおよびHeiseは、Diabetic Medicine 14: 63-72 (1997)において、吸入後の健康なボランティアにおける作用の開始（グルコース注入速度により評価される）が迅速であり、約30分で最大半減作用に達したことを開示している。

【0 0 0 4】

このように、生物活性剤を含有し、製剤の生物活性剤が全身性循環および／または局所性循環に持続様式で放出される吸入に適切な製剤が必要とされている。

【0 0 0 5】**発明の要旨**

本発明は、荷電した薬剤と逆の電荷を有する脂質とを組み合わせることにより、薬剤の持続放出プロフィールを生じるという予期せぬ発見に基づく。

【0 0 0 6】

本発明は、一般に、薬剤が持続様式で放出される、患者への治療剤、予防剤および診断剤の肺送達の方法、および該方法における使用に適切な粒子に関する。特に、本発明は、治療、予防または診断を必要とする患者の気道に、荷電した脂質と会合した、治療剤、予防剤もしくは診断剤またはその任意の組み合わせを含有する粒子の有効量を投与することを含み、ここで荷電した脂質は薬剤と会合する際、薬剤の電荷とは逆の全体で正味の電荷を有する、治療剤、予防剤または診断剤の肺送達のための方法に関する。投与された粒子からの薬剤の放出は、持続様式で起こる。

【0 0 0 7】

ある態様では、治療剤、予防剤または診断剤と逆に荷電した脂質との会合は、イオン複合体形成から生じうる。別の態様では、治療剤、予防剤または診断剤と逆に荷電した脂質との会合は、水素結合から生じうる。

【0 0 0 8】

10

20

30

40

50

さらなる態様では、治療剤、予防剤または診断剤と逆に荷電した脂質との会合は、イオン複合体形成と水素結合との組み合わせから生じうる。

【0009】

前記方法における使用に適切な粒子は、薬剤の電荷とは逆の電荷を有する荷電した脂質と会合した治療剤、予防剤または診断剤を含有しうる。電荷は、投与の前、会合の際に逆である。好ましい態様では、投与の前、会合の際の薬剤および脂質の電荷は、肺のpHで薬剤および脂質が有する電荷である。

【0010】

例えば、肺送達に適切な粒子は、全体で正味の正の電荷を有する脂質と会合した全体で正味の負の電荷を有する治療剤、予防剤または診断剤を含有しうる。例えば、薬剤は、負である全体で正味の電荷を有するインスリンであり得、脂質は、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-エチルホスファチジルコリン(DPePC)であり得る。

【0011】

あるいは、肺送達に適切な粒子は、全体で正味の負の電荷を有する脂質と会合した全体で正味の正の電荷を有する治療剤、予防剤または診断剤を含有しうる。例えば、薬剤は、全体で正の電荷を有するアルブテロールであり得、脂質は、全体で正味の負の電荷を有する1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DPPG)であり得る。

【0012】

さらに、肺送達に適切な粒子は、脂質との会合の前に、薬剤の溶液のpHを調整することにより改変されうる全体で正味の電荷を有する治療剤、予防剤または診断剤を含有しうる。例えば、約7.4のpHで、インスリンは、負である全体で正味の電荷を有する。それゆえ、インスリンおよび正に荷電した脂質は、投与の前にこのpHで会合し得、荷電した脂質と会合した薬剤を有する粒子が調製され、ここで、荷電した脂質は薬剤の電荷とは逆の電荷を有する。しかし、インスリンにおける荷電はまた、溶液中にある場合には、インスリンのpI (pI = 5.5) よりも低いように溶液のpHを変更することにより正である全体で正味の電荷を有するように変更されうる。このように、例えば、インスリンが溶液中で約4のpHである場合、インスリンは正である全体で正味の電荷を有する。この場合のように、正に荷電したインスリンは、負に荷電した脂質、例えば、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DSPG)と会合しうる。

【0013】

荷電した脂質との会合の前の治療剤、予防剤、または診断剤の電荷の変更は、多くの薬剤、特にタンパク質により達成されうる。例えば、タンパク質における電荷は、タンパク質の等電点 (pI) より下または上で噴霧乾燥フィード溶液により調節されうる。電荷変更はまた、分子のpKaよりも下または上で噴霧乾燥フィード溶液により小分子について達成されうる。

【0014】

特定の態様では、本発明の粒子は、1より多くの脂質、1より多くの生物活性剤または両方を含有する。さらに、荷電した脂質は、正味の電荷を有さない脂質と組み合わされうる。

【0015】

粒子は、生物活性剤および脂質とは異なるカルボン酸をさらに含有しうる。ある態様では、カルボン酸は、少なくとも2つのカルボキシル基を含む。カルボン酸は、その塩ならびに2つまたはそれより多くのカルボン酸および/またはその塩の組み合わせを含む。好ましい態様では、カルボン酸は、親水性カルボン酸またはその塩である。クエン酸および例えばクエン酸ナトリウムなどのクエン酸塩が好ましい。カルボン酸および/またはその塩の組み合わせまたは混合物もまた使用されうる。

【0016】

本発明における使用に適した粒子は、多価塩またはそのイオン性成分をさらに含有しうる。好ましい態様では、塩は二価の塩である。別の好ましい態様では、塩は、例えば、塩化カルシウム等のアルカリ土類金属の塩である。本発明の粒子はまた、塩および/またはそ

10

20

30

40

50

れらのイオン性成分の混合物または組み合わせを含みうる。

【0017】

本発明における使用に適切な粒子は、アミノ酸をさらに含有しうる。好ましい態様では、アミノ酸は疎水性である。

【0018】

粒子（本明細書中では粉体とも呼ばれる）は、吸入に適切な乾燥粉体の形態でありうる。粒子は、約 $0.4\text{g}/\text{cm}^3$ よりも小さい、好ましくは約 $0.1\text{g}/\text{cm}^3$ よりも小さい嵩密度を有しうる。さらに、本発明における使用に適切な粒子は、約5マイクロメートル～約30マイクロメートルのメジアン幾何学的直径（median geometric diameter）を有しうる。さらに別の態様では、本発明における使用に適切な粒子は、約1～約5マイクロメートルの空気力学的直径を有する。

10

【0019】

本発明は、多数の利点を有する。例えば、吸入に適切な粒子は、持続放出プロフィールを有するように設計されうる。この持続放出プロフィールは、肺に投与された生物活性剤の長期滞在を提供し、薬剤の治療レベルが局所環境または全身性循環に存在する時間を増大する。薬剤の持続放出は、糖尿病の処置のためのインスリン等の薬剤の持続放出を必要とする多くの治療剤、診断剤および予防剤について現在使用されている注射治療の所望の代替物を提供する。さらに、本発明は、吸入治療において典型的に見られる薬剤の高初期放出が減少している肺系への送達方法を提供する。結果的に、患者コンプライアンスおよび快適さは、投薬の頻度が減少することだけでなく、患者により受け入れられる治療を提供することにより増大しうる。

20

【0020】

本発明の前述および他の目的、特徴ならびに利点は、付随する図面に説明されるような以下の本発明の好ましい態様のより詳細な記載から明らかである。図面は、縮図である必要はなく、本発明の原理を説明する上で強調がなされている。

30

【0021】

発明の詳細な説明

本発明の好ましい態様の記載は以下の通りである。

治療剤、予防剤、または診断剤はまた、本明細書中では「生物活性剤」、「医薬」または「薬物」とも呼ばれうる。

30

【0022】

本発明は、治療、予防、または診断を必要とする患者の気道に、荷電した脂質と会合した治療剤、予防剤もしくは診断剤または任意のその組み合わせを含有する粒子の有効量を投与することを含み、ここで荷電した脂質は薬剤とは逆の全体で正味の電荷を有する、治療剤、予防剤および診断剤の肺送達のための方法に関する。薬剤は、持続様式で投与された粒子から放出される。

40

【0023】

本発明の粒子は、持続様式で生物活性剤を放出する。このように、粒子は、持続放出特性を有する。本明細書中で使用される用語「持続放出」は、薬剤の有効なレベルの放出の期間が、投与の前に、逆に荷電した脂質と会合しない同一の生物活性剤で見られるよりも長い活性剤の放出をいう。さらに、持続放出はまた、投与後の最初の2時間、より好ましくは最初の1時間に典型的に見られる薬剤のバースト（初期バーストともしばしば呼ばれる）の減少をいう。好ましい態様では、持続放出は、バーストの減少に加えて放出の期間がより長いことの両方により特徴づけられる。例えば、インスリンの持続放出は、投与後少なくとも4時間以降（例えば、約6時間以上）で上昇したレベルを示す放出でありうる。

【0024】

本明細書中で使用される用語「肺送達」は、気道に送達することをいう。本明細書中で規定される「気管」は、口腔咽頭部および喉頭を含む上気道、続いて、気管および続いて気管支および細気管支への二分枝を含む下気道（例えば、末端および呼吸）を含む。上気道および下気道は、伝導気道と呼ばれる。次いで、末端細気管支は、次いで肺胞または深肺

50

と呼ばれる最終段階の呼吸帯域に至る呼吸細気管支に分かれ。深肺、または肺胞は、典型的には、全身薬物送達のために吸入された治療製剤の所望の標的である。

【0025】

ある態様では、治療剤、予防剤または診断剤および逆に荷電した脂質は、イオン結合、例えば、主としてイオン複合体形成の結果として会合されうる。別の態様では、治療剤、予防剤または診断剤および逆に荷電した脂質は、主として水素結合の結果として会合されうる。イオン結合および水素結合の組み合わせは、生物活性および荷電した脂質の会合に寄与しうることが理解される。

【0026】

イオン結合は、原子または原子群間の電荷／電荷相互作用により起こる結合である。逆の電荷は誘引するので、イオン性化合物中の原子はこの誘引により一緒になる。 10

【0027】

水素結合は、水素原子が2つの分子間で共有される結合をいう。例えば、窒素、酸素、硫黄または亜リン酸等の電気陰性原子に共有結合的に付着した水素原子は、第2の電気陰性原子、例えば、窒素、酸素、硫黄または亜リン酸と部分的な正の電荷を共有する。

【0028】

本方法における使用に適切な粒子は、投与の前、会合の際に薬剤の電荷とは逆の電荷を有する荷電した脂質と会合した治療剤、予防剤または診断剤を含みうる。好ましい態様では、会合の際に、薬剤および脂質により有される電荷は、薬剤および脂質が投与後に肺pHで有する電荷と等しい。 20

【0029】

例えば、肺送達に適切な粒子は、全体で正味の正の電荷を有する脂質と会合した全体で正味の負の電荷を有する治療剤、予防剤または診断剤を含有しうる。例えば、薬剤はインスリンであり得、脂質は、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エチルホスファチジルコリン(DPePC)等のエチルホスファチジルコリンでありうる。

【0030】

あるいは、肺送達に適切な粒子は、好ましくは肺pH範囲において、全体で正味の負の電荷を有する脂質と会合した全体で正味の正の電荷を有する治療剤、予防剤または診断剤を含有しうる。例えば、薬剤は、全体で正の電荷を有する硫酸アルブテロールであり得、脂質は、全体で正味の負の電荷を有する1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DPPG)でありうる。 30

【0031】

さらに、肺送達に適切な粒子は、荷電した脂質と会合する前に薬剤の溶液のpHを調整することにより変更されうる全体で正味の電荷を有する治療剤、予防剤または診断剤を含有しうる。例えば、約7.4のpHで、インスリンは、負である全体で正味の電荷を有する。それゆえ、インスリンおよび正に荷電した脂質は、投与の前に、このpHで会合し得、荷電した脂質と会合した生物活性剤を有する粒子が調整され、ここで荷電した脂質は会合の際に薬剤の電荷とは逆の電荷を有する。しかし、インスリンはまた、溶液中にある場合、インスリンのpI (pI = 5.5)よりも低く溶液のpHを変更することにより正である全体で正味の電荷を有するように変更されうる。このようにして、インスリンがpH4の溶液にある場合、例えば、正である全体で正味の電荷を有する。この場合のように、正に荷電したインスリンは、負に荷電した脂質、例えば、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DSPG)と会合し得る。治療剤、予防剤または診断剤の電荷の変更は、多くの薬剤、特にタンパク質に適用可能である。 40

【0032】

本明細書中に使用される用語「肺pH範囲」は、患者の肺において遭遇されうるpH範囲をいう。典型的には、ヒトにおいては、このpHの範囲は、6.4～約6.7のように約6.4～約7.0である。気道裏打ち液(airway lining fluid (ALF))のpH値は、R.A. Parentによる"Comparative Biology of the Normal Lung", CRC Press, (1991)において報告されており、6.4～6.74の範囲である。 50

【0033】

本明細書中で使用される用語「荷電された脂質」は、全体で正味の電荷を有しうる脂質をいう。脂質における電荷は、負または正でありうる。脂質は、脂質および活性剤が会合した場合、活性剤の電荷とは逆の電荷を有するように選択されうる。好ましい態様では、荷電された脂質は荷電されたリン脂質である。好ましくは、リン脂質は、肺に対して内因性であるか、または肺への投与の際に内因性リン脂質に代謝されうる。荷電した脂質の組み合わせが使用されうる。荷電した脂質の組み合わせはまた、会合の際に生物活性剤の電荷とは逆の全体で正味の電荷を有する。

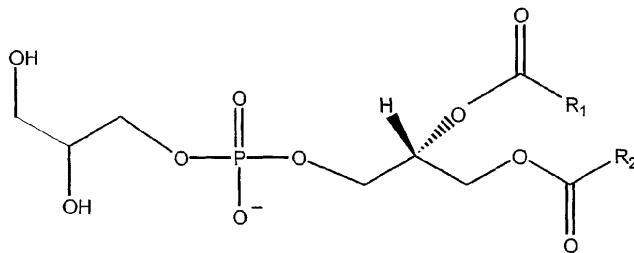
【0034】

荷電したリン脂質は、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)]および1,2-ジアシル-sn-グリセロール-3-ホスフェート等の負に荷電した脂質でありうる。 10

【0035】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)]リン脂質は、式Iにより表されうる：

【化1】



20

式中、R₁およびR₂は、独立して、約3～約24炭素原子、好ましくは約10～約20炭素原子を有する脂肪族基である。

【0036】

式I～VIにおける本明細書中で使用される用語としての脂肪族基は、完全に飽和されうる置換または非置換の直鎖、分岐鎖もしくは環状のC₁～C₂₄炭化水素をいい、これは窒素、酸素または硫黄等の1以上のヘテロ原子を含み得、および/または不飽和の1以上のユニットを含みうる。 30

【0037】

脂肪族基における適切な置換基としては、-OH、ハロゲン(-Br、-Cl、-Iおよび-F)、-O(脂肪族基、置換基された)、-CN、-NO₂、-COOH、-NH₂、-NH(脂肪族基、置換脂肪族基)、-N(脂肪族基、置換脂肪族基)₂、-COO(脂肪族基、置換脂肪族基)、-CONH₂、-CONH(脂肪族基、置換脂肪族基)、-SH、-S(脂肪族基、置換脂肪族基)および-NH-C(=NH)-NH₂が挙げられる。置換脂肪族基はまた、ベンジル、置換ベンジル、アリール(例えば、フェニル、ナフチルまたはピリジル)または置換アリール基を置換基として有しうる。置換脂肪族は、1以上の置換基を有しうる。

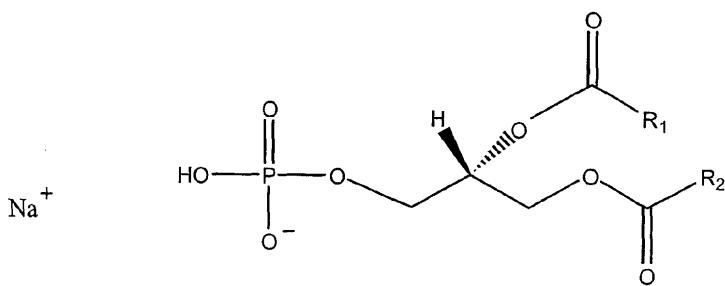
【0038】

このタイプの負に荷電したリン脂質の特定の例としては、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DSPG)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DMPG)、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DPPG)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DLPG)、および1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-rac-(1-グリセロール)](DOPG)が挙げられるが、これらに限定されない。 40

【0039】

1,2-ジアシル-sn-グリセロール-3-ホスフェートリン脂質は、式IIにより表されうる：

【化2】



式中、R₁およびR₂は、独立して、約3～約24炭素原子、好ましくは約10～約20炭素原子を有する脂肪族基である。

10

【0040】

このタイプのリン脂質の特定の例としては、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DMPA)、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DPPA)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DOPA)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DSPA)、および1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DLPA)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

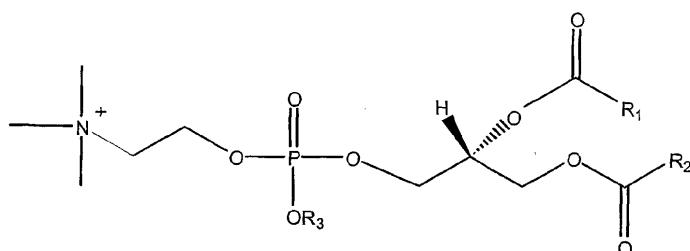
荷電した脂質は、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホコリン等、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリンおよび1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホアルカノールアミン等、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホエタノールアミン等の正に荷電した脂質であります。

20

【0042】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホコリンリン脂質は式IIIにより表されうる：

【化3】



30

式中、R₁およびR₂は、独立して約3～約24炭素原子、好ましくは、約10～約20炭素原子を有する脂肪族基である。R₃は、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等の約1～約24炭素を有する脂肪族基である。

【0043】

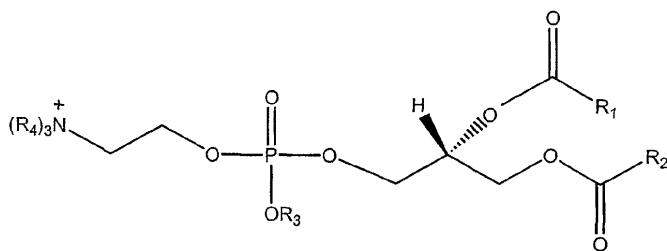
このタイプの正に荷電したリン脂質の特定の例としては、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DPePC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DMePC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DSePC)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DLePC)、および1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン(DOePC)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0044】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-アルキルホスホアルカノールアミンリン脂質は、式IVにより表されうる：

【化4】



式中、R₁およびR₂は、独立して約3～約24炭素原子、好ましくは約10～約20炭素原子を有する脂肪族基である。R₃は、約1～約24炭素を有する脂肪族基、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等である。R₄は、独立して、水素または約1～約6炭素原子を有する脂肪族基である。

【0045】

このタイプの正に荷電したリン脂質の特定の例としては、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エチルエタノールアミン (DPePE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (DMePE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (DSePE)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (DLePE)、および1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホエタノールアミン (D0ePE) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0046】

本発明における使用に適切な他の荷電した脂質としては、1995年11月14日に発行されたHorrobinら、米国特許第5,466,841号、それぞれ1997年12月16日および1999年5月11日に発行されたHeath、米国特許第5,698,721号および米国特許第5,902,802号、および1984年10月30日に発行されたMylesら、米国特許第4,480,041号に記載されているものを含み、それら全ての全体の内容が参考として本明細書中に援用される。

【0047】

荷電した脂質および治療剤、予防剤または診断剤は、約0.25:1以上、好ましくは約0.25:1～約1:0.25、例えば、約0.5:1～約1:0.5の脂質対活性剤の電荷比で本発明の粒子中に存在しうる。好ましくは、電荷比は約1:1である。過剰の電荷が存在する場合、過剰の電荷は液体により寄与されることが好ましい。

【0048】

適切な電荷比は以下のように決定されうる。最初に、生物活性剤および脂質の両方に存在する電荷の数が、投与の前に、2つの会合が起こる条件で決定されるべきである。次に、生物活性剤および脂質の両方の等量が決定されるべきである。これは、約7.4のpHで、生物活性剤としてインスリンおよび荷電した脂質としてDPePCを使用する以下の実施例で行われうる。

【0049】

インスリンの分子量：	5,800g/モル
インスリンにおける負荷電の数：	6等量
電荷当たりの等量：	5,800×1/6=967g
DPePCの分子量：	763g/モル
DPePCにおける負電荷の数：	1等量
電荷当たりの等量：	763×1/1=763g

【0050】

したがって、例えば、1:1荷電比のDPePC 対インスリンを得るために、763gのDPePC が967gのインスリンに関連するか、

または

1gのDPePC が1.27(967/763=1.27)g のインスリンに関連する。

代替的には、

967gのインスリンが763gのDPePC に関連するか、

10

20

30

40

50

または

1gのインスリンが0.79(763/967=0.79)g のDPePC に関連する。

モルに置き換えると、

1 モルのDPePC が1/6 モルのインスリンに関連するか、

または

1 モルのインスリンが6 モルのDPePC に関連する。

【0051】

この解析は、生物活性剤および脂質の所望の任意の比率およびその任意の組み合わせに必要な脂質および活性剤の量を決定するために使用されうる。

【0052】

荷電脂質は、約1 ~ 約99重量% の範囲の量で粒子中に存在しうる。好ましくは、荷電した脂質は、約10 ~ 約90重量% の範囲の量で粒子中に存在する。

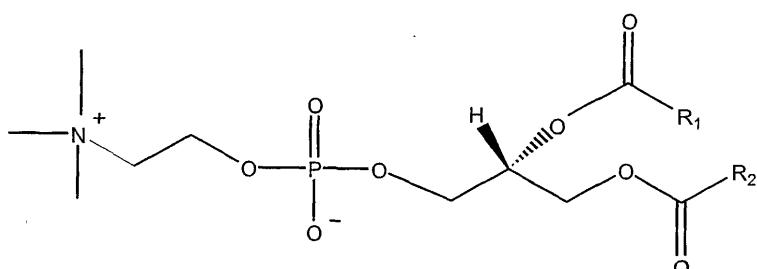
【0053】

本発明の粒子はまた、双性イオンであり、したがって全ての正味の電荷を所有しないリン脂質を含みうる。かかる脂質は、吸入に適切な特性を粒子に提供するのを援助しうる。本発明での使用に適切なかかるリン脂質としては、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンおよび1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンが挙げられるが、これらに限定されない。これらの脂質は、好ましくは、約10 ~ 約90重量% の範囲の量で粒子中に存在しうる。好ましくは、これらの脂質は、約50 ~ 約80重量% の範囲の量で粒子中に存在しうる。

【0054】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンリン脂質は、式V:

【化5】



10

20

30

R₁ および R₂ は、独立して約3 ~ 約24個の炭素原子、好ましくは約10 ~ 約20個の炭素原子を有する脂肪族基である

により表されうる。

【0055】

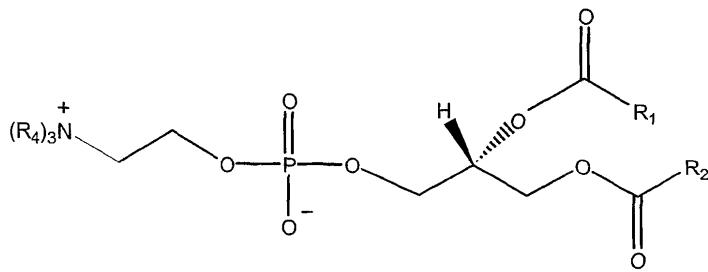
1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンリン脂質の具体的な例としては、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1,2-ジラウロイル(dilaureoyl)-sn-3-グリセロ-ホスホコリン(DLPC)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0056】

1,2-ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホアルカノールアミンリン脂質は、式VI:

【化6】

40



式中、R₁およびR₂は、独立して約3～約24個の炭素原子、好ましくは約10～約20個の炭素原子を有する脂肪族基であり、R₄は、独立して水素または約1～約6個の炭素原子を有する脂肪族基である

10

により表されうる。

【0057】

この型のリン脂質の具体的な例としては、1,2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-エタノールアミン(DPPE)、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DMPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DLPE)、および1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0058】

治療薬、予防薬または診断薬は、本明細書において「生物活性剤」、「医薬」または「薬物」とも呼ばれうる。1つ以上の生物活性剤が、本発明の粒子中に存在しうることが理解される。親水性薬剤ならびに疎水性薬剤が使用されうる。薬剤は、全体として正味の電荷を所有しうるはずである。本発明の粒子中に存在する生物活性剤の量は、約0.1重量%～約95重量%、例えば、約5～約75%、約10～約50%等でありうる。薬物が粒子中に分配されている粒子が好ましい。

20

【0059】

適切な生物活性剤としては、局所的に、全身的にまたはそれらの組み合わせで作用しうる薬剤が挙げられる。本明細書で使用される「生物活性剤」という用語は、インピボで放出された場合、所望の生物活性、例えば、インピボでの治療、診断および/または予防特性を所有する薬剤またはその薬学上許容されうる塩である。

30

【0060】

生物活性剤の例としては、治療、予防または診断活性を有する合成無機および有機化合物、タンパク質およびペプチド、多糖および他の糖、脂質、ならびにDNAおよびRNA核酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。例えば1モル当たり100～500,000グラム以上の広範囲の分子量を有する薬剤が、使用されうる。

30

【0061】

薬剤は、例えば、血管作用剤、神経刺激剤、ホルモン、抗凝固剤、免疫調節剤、細胞傷害剤、予防薬、抗生物質、抗ウイルス剤、アンチセンス、抗原、抗腫瘍剤および抗体等の種々の生物活性を有しうる。

40

【0062】

タンパク質としては、インスリン、免疫グロブリン、抗体、サイトカイン(例えば、リンフォカイン、モノカイン、ケモカイン)、インターロイキン、インターフェロン(-IFN、-IFNおよび-IFN)、エリスロポエチン、ヌクレアーゼ、腫瘍壞死因子、コロニー刺激因子、酵素(例えば、スーパーオキシドジスムターゼ、組織プラスミノゲン賦活剤)、腫瘍サプレッサー、血中タンパク質、ホルモンおよびホルモンアナログ(例えば、成長ホルモン、副腎皮質刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH))、ワクチン(例えば、腫瘍、細菌およびウイルス抗原)、抗原、血液凝固因子；成長因子；顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)等の完全なタンパク質、ムテインおよびその活性断片が挙げられる；ペプチドとしては、タンパク質インヒビター、タンパク質アンタゴニスト、およびタンパク質アゴニスト、カルシトニンが挙げられる；核酸としては、例えば、アンチ

50

センス分子、オリゴヌクレオチド、およびリボザイムが挙げられる。ヘパリン等の多糖もまた、投与されうる。

【0063】

肺内への局所送達のための生物活性剤としては、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気腫、または囊胞性線維症の治療のため等の薬剤が挙げられる。例えば、囊胞性線維症等の疾患の治療のための遺伝子が投与され得、喘息に対しては、アゴニストステロイド、抗コリン作用薬、およびロイコトリエンモディファイナーが投与されうる。

【0064】

他の具体的な生物活性剤としては、硫酸エストロン、硫酸アルブテロール、副甲状腺ホルモン放出ペプチド、ソマトスタチン、ニコチン、クロニジン、サリチレート、クロモリンナトリウム、サルメテロール(salmeterol)、ホルメテロール(formeterol)、L-ドバ、カルビドバまたはそれらの組み合わせ、ガバペナチン(gabapenatin)、クロラゼペート、カルバマゼピンおよびジアゼパムが挙げられる。

【0065】

核酸配列としては、遺伝子、例えば転写を阻害するために相補的なDNAに結合しうるアンチセンス分子、およびリボザイムが挙げられる。

【0066】

粒子は、任意の種々の診断薬を含み得、患者に投与した後、薬剤を局所的または全身的に送達する。例えば、画像剤が使用され得、画像剤としては、陽電子射出断層撮影法(PET)、コンピュータ連動断層撮影法(CAT)、シングルフォトンエミッショ nコンピュータ断層撮影法、X線、X線透視および磁気共鳴画像法(MRI)に使用される市販の薬剤が挙げられる。

【0067】

MRIにおける造影剤として使用するための適切な物質の例としては、ジエチレントリアミンペニタ酢酸(DTPA)およびガドペントテートジメグルミン(gadopentotate dimeglumine)等現在入手可能なガドリニウムキレート、ならびに鉄、マグネシウム、マンガン、銅およびクロムが挙げられる。

【0068】

CATおよびX線のために有用な物質の例としては、ジアトリゾエートおよびイオタラメトに代表されるイオン性モノマー、ならびにイオン性ダイマー(例えばイオキサグレート)等の静脈投与のためのヨウ素ベースの物質が挙げられる。

【0069】

診断薬は、当該分野で利用可能な標準技術および市販の装置を用いて検出されうる。

【0070】

粒子は、薬剤および脂質とは別個のカルボン酸をさらに含みうる。1つの態様において、カルボン酸は、少なくとも2つのカルボキシル基を含む。カルボン酸は、その塩ならびに2つ以上のカルボン酸および/またはその塩の組み合わせを含む。好ましい態様において、カルボン酸は親水性カルボン酸またはその塩である。適切なカルボン酸としては、ヒドロキシジカルボン酸、ヒドロキシリカルボン酸(hydroxytricarboxilic acid)等が挙げられるが、これらに限定されない。例えばクエン酸ナトリウム等のクエン酸およびクエン酸塩が好ましい。カルボン酸および/またはそれらの塩の組み合わせまたはその混合物もまた使用されうる。

【0071】

カルボン酸は、約0~約80重量%の範囲の量で粒子中に存在しうる。好ましくは、カルボン酸は、約10~約20%の量で粒子中に存在しうる。

【0072】

本発明での使用に適切な粒子は、多価塩またはそのイオン成分をさらに含みうる。本明細書で使用される場合、「多価」塩とは、1より大きい原子価のイオン成分を有する塩のことを言う。例えば、2価塩。好ましい態様において、塩は2価塩である。別の好ましい態様において、塩は、例えば塩化カルシウム等のアルカリ土類金属の塩である。本発明の粒

10

20

30

40

50

子はまた、塩および／またはそのイオン成分の混合物または組み合わせを含みうる。

【0073】

塩またはそのイオン成分は、約0～約40重量%の範囲の量で粒子中に存在する。

【0074】

本発明での使用に適切な粒子は、さらにアミノ酸を含有しうる。好ましい態様において、アミノ酸は疎水性である。適切な天然疎水性アミノ酸としては、ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、フェニルアラニン、グリシンおよびトリプトファンが挙げられるが、これらに限定されない。疎水性アミノ酸の組み合わせもまた使用されうる。非天然アミノ酸としては、例えば、-アミノ酸が挙げられる。疎水性アミノ酸のD、L立体配置およびラセミ混合物の両方が使用されうる。適切な疎水性アミノ酸としては、アミノ酸誘導体またはアミノ酸アナログもまた挙げられうる。本明細書で使用される場合、アミノ酸アナログとしては、以下の式： $-NH-CHR-CO-$ （式中、Rは、脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、芳香族基または置換芳香族基であり、Rは、天然アミノ酸の側鎖に対応しない）を有するDまたはL立体配置のアミノ酸が挙げられる。本明細書で使用する場合、脂肪族基としては、完全に飽和している、窒素、酸素または硫黄等の1個または2個のヘテロ原子を含む、および／または1個以上の不飽和単位を含むものである、直鎖、分枝または環状C1-C8炭化水素が挙げられる。芳香族基またはアリール基としては、フェニルおよびナフチル等の炭素環式芳香族基、ならびにイミダゾリル、インドリル、チエニル、フラニル、ピリジル、ピラニル、オキサゾリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、キノリニル、イソキノリニルおよびアクリジンチル等の複素環式芳香族基が挙げられる。

【0075】

脂肪族、芳香族またはベンジル基上の適切な置換基としては、-OH、ハロゲン(-Br、-Cl、-Iおよび-F)、-O(脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、アリール基または置換アリール基)、-CN、-NO₂、-COOH、-NH₂、-NH(脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、アリール基または置換アリール基)、-N(脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、アリール基または置換アリール基)、-CO(脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、アリール基または置換アリール基)、-CONH₂、-CONH(脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、アリール基または置換アリール基)、-SH、-S(脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、芳香族基または置換芳香族基)および-NH-C(=NH)-NH₂が挙げられる。また、置換ベンジル(benzylic)基または芳香族基は、脂肪族基または置換脂肪族基を置換基として有し得る。また、置換脂肪族基は、ベンジル基、置換ベンジル基、アリール基または置換アリール基を置換基として有し得る。置換脂肪族基、置換芳香族基または置換ベンジル基は、1個またはそれ以上の置換基を有し得る。アミノ酸置換基を修飾することにより、例えば、親水性である天然アミノ酸の脂質親和性または疎水性を高めることができる。

【0076】

多くの適切なアミノ酸、アミノ酸アナログおよびその塩が商業的に入手され得る。その他のものは、当該技術分野において公知の方法によって合成され得る。合成手法は、例えば、GreenとWuts、「有機合成における保護基(Protecting Groups in Organic Synthesis)」、John Wiley and Sons, 第5および7章、1991に述べられている。

【0077】

疎水性は、一般に、非極性溶媒と水との間でのアミノ酸の分配に関して定義される。疎水性アミノ酸は、非極性溶媒に選択性を示す酸である。アミノ酸の相対的疎水性は、疎水性スケールで表わすことができ、グリシンは、0.5の値を有する。かかるスケールでは、水に選択性を有するアミノ酸は、0.5より低い数値を有し、非極性溶媒に選択性を有するアミノ酸は、0.5より大きい数値を有する。本明細書で使用する場合、疎水性アミノ酸という用語は、疎水性スケールで0.5またはそれ以上の数値を有する、すなわち、少なくともグリシンに等しい、非極性酸中に分配する傾向を有するアミノ酸を指す。

10

20

30

40

50

【0078】

使用されうるアミノ酸の例としては、グリシン、プロリン、アラニン、システイン、メチオニン、バリン、ロイシン、チロシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい疎水性アミノ酸としては、ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、フェニルアラニン、グリシンおよびトリプトファンが挙げられる。疎水性アミノ酸の組み合わせも使用され得る。さらに、疎水性と親水性（水に選択的に分配する）アミノ酸の組み合わせも、全体としての組み合わせが疎水性である場合には、使用され得る。1以上のアミノ酸の組み合わせも用いられ得る。

【0079】

アミノ酸は、約0～約60重量%の量で本発明の粒子中に存在し得る。好ましくは、アミノ酸は、約5～約30重量%の範囲の量で粒子中に存在し得る。疎水性アミノ酸の塩は、約0～約60重量%の量で本発明の粒子中に存在し得る。好ましくは、アミノ酸の塩は、約5～約30重量%の範囲の量で粒子中に存在する。アミノ酸を含む粒子の形成および送達方法は、噴霧乾燥の間ににおける多孔性粒子の形成のための単純アミノ酸の使用なる表題の1999年8月25日に提出された米国特許出願第09/382,959号に記載されており、その全教示は、参考により、本明細書に取り込まれる。

【0080】

さらなる態様において、前記粒子は、例えば、緩衝塩、デキストラン、多糖類、ラクトース、トレハロース、シクロデキストリン、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、脂肪酸、脂肪酸エステル、無機化合物、リン酸塩等の他の物質をも含み得る。

10

20

30

40

【0081】

本発明の1つの態様において、粒子はポリマーをさらに含有しうる。ポリマーの使用は、放出をさらに延期しうる。生体適合性または生分解性のポリマーが好ましい。かかるポリマーは、例えば、Edwardsらに1999年2月23日に交付された米国特許第5,874,064号に記載されており、その教示は、その全体が参考により本明細書に組み込まれる。

【0082】

さらに別の態様において、粒子は、1つの上記荷電した脂質以外の界面活性剤を含む。本明細書で使用される場合、「界面活性剤」という用語は、水と有機系ポリマー溶液間の界面、水／空気界面または有機系溶剤／空気界面等の2つの非混和性相間の界面に優先的に吸収される任意の薬剤をいう。界面活性剤は、一般に、ミクロ粒子に吸収されると、同様にコートされた粒子は引き付けない部分を外部環境に対して提示する傾向にあるような親水性部分および親油性部分を有し、それにより粒子の凝集が低減される。界面活性剤はまた、治療薬または診断薬の吸収を促進し得、該薬剤のバイオアベイラビリティを増加し得る。

【0083】

本発明の粒子を作製するのに使用されうる適切な界面活性剤としては、ヘキサデカノール；ポリエチレングリコール(PEG)等の脂肪族アルコール；ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル；パルミチン酸またはオレイン酸等の界面活性脂肪酸；グリココール酸塩；サーファクチン(surfactin)；ポロキソマー(poloxamer)；トリオレイン酸ソルビタン(Span85)等のソルビタン脂肪酸エステル；およびチロキサポールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

前記界面活性剤は、約0～約60重量%の範囲の量で粒子中に存在し得る。好ましくは、約5～約50重量%の範囲の量で粒子中に存在し得る。

【0085】

粒子がカルボン酸、多価塩、アミノ酸、界面活性剤またはそれらの任意の組み合わせを含む場合、粒子のこれらの成分と荷電した脂質との間の相互作用が生じうることが理解される。

【0086】

粒子は、本明細書において粉体とも称され、吸入に適切な乾燥粉体の形態でありうる。特

50

定の態様では、粒子は、約 0.4g/cm^3 未満の嵩密度を有しうる。約 0.4g/cm^3 未満の嵩密度を有する粒子は、本明細書において、「空気力学的に軽い粒子」と称される。約 0.1g/cm^3 未満の嵩密度を有する粒子が、より好ましい。

【 0 0 8 7 】

空気力学的に軽い粒子は、好ましいサイズ、例えば、少なくとも約 5 ミクロン (μm) の体積メジアン幾何学的直径 (VMGD) を有する。1 つの態様において、VMGD は、約 $5\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $30\text{ }\mu\text{m}$ である。本発明の別の態様では、前記粒子は、約 $9\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $30\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の VMGD を有する。他の態様では、前記粒子は、少なくとも $5\text{ }\mu\text{m}$ 、例えば、約 $5\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $30\text{ }\mu\text{m}$ のメジアン直径、質量メジアン直径 (MMD) 、質量メジアンエンベロープ直径 (MMED) または質量メジアン幾何学的直径 (MMGD) を有する。

【 0 0 8 8 】

空気力学的に軽い粒子は、好ましくは約 $1\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $5\text{ }\mu\text{m}$ の、本明細書では「空気力学的直径」とも称される「質量メジアン空気力学的直径」 (MMAD) を有する。本発明の 1 つの態様では、MMAD は、約 $1\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $3\text{ }\mu\text{m}$ である。別の態様では、MMAD は約 $3\text{ }\mu\text{m}$ ~ 約 $5\text{ }\mu\text{m}$ である。

【 0 0 8 9 】

本発明の別の態様では、前記粒子は、約 0.4g/cm^3 未満の本明細書において「質量密度」とも称されるエンベロープ質量密度を有する。等方性粒子のエンベロープ質量密度は、それを内部に包み込むことができる最小球体エンベロープ体積で割った粒子の質量と定義される。

【 0 0 9 0 】

嵩密度は、デュアルプラットホームマイクロプロセッサ制御嵩密度テスター (Dual Platform Microprocessor Controlled Tap Density Tester) (Vankel, NC) または GeoPycTM 装置 (Micrometrics Instrument Corp., Norcross, GA 30093) 等の当業者に公知の装置を用いて測定され得る。嵩密度は、エンベロープ質量密度の標準測定値である。嵩密度は、「 U S P かさ密度および嵩密度」、米国薬局方協約、Rockville, MD, 第 10 版補遺、4950 ~ 4951、1999 の方法を用いて測定できる。低嵩密度に寄与することができる特徴としては、不規則な表面テクスチャーと多孔性構造が挙げられる。

【 0 0 9 1 】

粒子の直径、例えば、VMGD は、マルチサイザー (Multisizer) IIe (Coulter Electronics, Luton, Beds, England) のような電気的ゾーンセンシング装置またはレーザー回折装置 (例えば Sympatec, Princeton, NJ によって製造されている Helos) を用いて測定できる。粒子直径を測定するための他の装置は当該技術分野において周知である。サンプル中の粒子の直径は、粒子組成物および合成の方法等の要因に依存して変化する。サンプル中の粒子のサイズ分布は、気道内の標的部位内における至適沈着を可能にするように選択できる。

【 0 0 9 2 】

実験的には、空気力学的直径は、重力沈降法を用いて測定することができ、かかる方法により、粒子全体が一定の距離を沈降するのに要する時間を使用して、粒子の空気力学的直径を直接推定する。質量メジアン空気力学的直径 (MMAD) を測定するための間接的方法は、多段液体インピnjy- (MSLI) である。

【 0 0 9 3 】

空気力学的直径、 d_{aer} は、式：

【 数 1 】

$$d_{aer} = d_g \sqrt{\rho_{tap}}$$

(式中、 d_g は、幾何学的直径、例えば、MMGD であり、 ρ は、粉体密度である)
から算出され得る。

10

20

30

40

50

【0094】

約 0.4g/cm^3 未満の嵩密度、少なくとも約 $5\text{ }\mu\text{m}$ のメジアン直径、および約 $1\text{ }\mu\text{m} \sim$ 約 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $1\text{ }\mu\text{m} \sim$ 約 $3\text{ }\mu\text{m}$ の空気力学的直径を有する粒子は、口腔咽頭領域における慣性沈着および重力沈着をより多く免れることができ、気道または深肺 (deep lung) に標的される。より大きな、より多孔性の粒子は、吸入治療のために現在使用されているようなより小さく密なエーロゾル粒子よりも効率的にエーロゾル化することができる、それらの使用は好都合である。

【0095】

また、より小さな粒子に比べて、好ましくは、少なくとも約 $5\text{ }\mu\text{m}$ のVMGDを有するより大きな空気力学的に軽い粒子はまた、食細胞の細胞質ゾル空隙からの粒子のサイズ排除により、潜在的に肺胞マクロファージによる食作用吸収と肺からのクリアランスをより成功裡に回避することができる。肺胞マクロファージによる粒子の食作用は、粒子直径が約 $3\text{ }\mu\text{m}$ を超えると急激に低下する。Kawaguchi, H. ら、*Biomaterials* 7:61 ~ 66(1986); Krenis, L.J. と Strauss, B., *Proc. Soc. Exp. Med.*, 107:748 ~ 750(1961); および Rudt, S. と Muller, R.H., *J. Contr. Rel.*, 22:263 ~ 272(1992)。粗表面を有する球体のような統計的に等方性の形態の粒子に関しては、粒子エンベロープ体積は、完全な粒子食作用のためにマクロファージ内で必要とされる細胞質ゾル空隙の体積とほぼ等しい。

【0096】

当該粒子は、深肺または上気道または中央気道のような気道の選択された領域への局所送達のために、適切な材料、表面粗度、直径および嵩密度で作製され得る。例えば、上気道送達のためにはより高密度またはより大きな粒子が使用され得るか、あるいは同じまたは異なる治療薬で提供される、サンプル中における異なるサイズの粒子の混合物が1回の投与で肺の異なる領域を標的とするように投与され得る。約 $3 \sim$ 約 $5\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の空気力学的直径を有する粒子が中央気道および上気道への送達にとって好ましい。深肺への送達のためには約 $1 \sim$ 約 $3\text{ }\mu\text{m}$ の範囲の空気力学的直径を有する粒子が好ましい。

【0097】

エーロゾルの慣性嵌入と重力沈降が通常の呼吸条件での気道および肺細葉における主要な沈着機序である。Edwards, D.A., *J. Aerosol Sci.*, 26:293 ~ 317(1995)。両方の沈着機序の重要性は、粒子 (またはエンベロープ) 体積ではなくエーロゾルの質量に比例して上昇する。肺におけるエーロゾル沈着部位はエーロゾルの質量によって決定されるので (少なくとも平均空気力学的直径が約 $1\text{ }\mu\text{m}$ をこえる粒子については)、粒子表面の不規則性と粒子の多孔性を高めることによって嵩密度を低下させることは、他の物理的パラメータがすべて等しければ、より大きな粒子エンベロープ体積を肺に送達することができる。

【0098】

嵩密度が低い粒子は、実際のエンベロープ球体直径に比べて小さな空気力学的直径を有する。空気力学的直径、 d_{aer} は、式 :

【数2】

$$d_{aer} = d\sqrt{\rho}$$

40

(式中、エンベロープ質量 は、 g/cm^3 の単位である)

によってエンベロープ球体直径、 d に関係づけられる (Gonda, I. 「エーロゾル送達における物理・化学的原理 (Physico-chemical principles in aerosol delivery)」 *Topics in Pharmaceutical Sciences* 1991 より (D.J.A. Crommelin と K.K. Midha 編集)、p.95 ~ 117, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1992)。ヒト肺の肺胞領域における単分散エーロゾル粒子の最大沈着 (約 60%) は、約 $d_{aer} = 3\text{ }\mu\text{m}$ の空気力学的直径について起こる。Heyder, J. ら、*J. Aerosol Sci.*, 17:811 ~ 825(1986)。その小さなエンベロープ質量密度により、最大深肺沈着を示す単分散吸入粉末を含む空気力学的に軽い粒子の実際の直径 d は :

50

【数3】

$$d = 3/\sqrt{\rho} \text{ } \mu\text{m} \text{ (where } \rho < 1 \text{ g/cm}^3\text{);}$$

(式中、dは常に3 μmより大きい)

である。例えば、エンベロープ質量密度、 $\rho = 0.1 \text{ g/cm}^3$ を示す空気力学的に軽い粒子は、9.5 μmの大きさのエンベロープ直径を有する粒子について最大沈着を示す。粒子サイズが大きくなると粒子間接着力が低下する。Visser,J., Powder Technology, 58:1~10。従つて、大きな粒子サイズは、より低い食作用損失に寄与することに加えて、エンベロープ質量密度の低い粒子に関して深肺へのエーロゾル適用の効率を高める。10

【0099】

空気力学的直径は、肺内での最大沈着を提供するように算出され得、以前、直径約5ミクロン未満、好ましくは約1~約3ミクロンの非常に小さな粒子の使用によって達成されており、当該粒子は次いで食作用に供される。より大きな直径を有するが十分に軽い(すなわち「空気力学的に軽い」特徴の)粒子を選択することは、肺への等しい送達をもたらすが、より大きなサイズの粒子は食作用を受けない。滑面を有するものに比べて、粗面または不均質面を有する粒子を使用することによって改良された送達が得られ得る。

【0100】

適切な粒子は、予め選択されたサイズ分布を有する粒子サンプルを提供するために、例えば、濾過または遠心分離により作製または分離され得る。例えば、サンプルにおける約30%、50%、70%または80%を超える粒子は、少なくとも約5 μmの選択範囲内の直径を有し得る。特定の割合の粒子が含まれるべき選択範囲は、例えば、約5~約30 μmまたは最適には、約5~約15 μmであってもよい。1つの好ましい態様では、前記粒子の少なくとも一部が、約9~約11 μmの直径を有する。また、任意に、少なくとも約90%、または任意に、約95%もしくは約99%が選択範囲内の直径を有するものである粒子サンプルが、作製され得る。前記粒子サンプル中におけるより高い割合での空気力学的に軽く、かつより大きな直径の粒子の存在は、該粒子中に取り込まれた治療薬または診断薬の深肺への送達を増強する。大きな直径の粒子とは、一般的に、少なくとも約5 μmのメジアン幾何学的直径を有する粒子を意味する。20

【0101】

粒子は、噴霧乾燥によって調製されうる。例えば、噴霧乾燥混合物は、本明細書において「フィード溶液」または「フィード混合物」とも呼ばれ、会合の際に生物活性剤および該活性剤と反対の電荷を有する1つ以上の荷電した脂質を含み、噴霧ドライヤーに供給される。

【0102】

例えば、タンパク質活性剤を使用する際、薬剤は、薬剤のpIより大きいかまたは小さい緩衝系に溶解されうる。具体的には、インスリンは、例えば、水性緩衝系(例えば、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩等)または0.01N HClに溶解されうる。次に、得られた溶液のpHが、適切な塩基性溶液(例えば、1N NaOH)を用いて所望の値に調整されうる。1つの好ましい態様において、pHは、約pH7.4に調節されうる。このpHで、インスリン分子は、正味の負電荷(pI=5.5)を有する。別の態様において、pHは、約pH4.0に調整されうる。このpHで、インスリン分子は、正味の正電化(pI=5.5)を有する。典型的には、陽性リン脂質は、有機溶媒または溶媒の組み合わせに溶解される。次に、2つの溶液を共に混合し、得られた混合物を噴霧乾燥する。40

【0103】

小分子活性薬剤に関しては、薬剤は、イオン化しうる基のpKaより大きいかまたは小さい緩衝系に溶解されうる。詳細には、硫酸アルブテロールまたは硫酸エストロンが、例えば、水性緩衝系(例えば、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩等)または洗浄のために滅菌水に溶解されうる。次に、得られた溶液のpHが、適切な酸性または塩基性溶液を用いて所望の50

値に調整されうる。pHが約pH3～約pH8の範囲に調整される場合、硫酸エストロンは、1モル当たり1つの負電荷を所有し、硫酸アルブテロールは、1モル当たり1つの正電荷を所有する。したがって、電荷相互作用が、適切なリン脂質の選択により変更されうる。典型的には、負に帯電したリン脂質または正に帯電したリン脂質が、有機溶媒または溶媒の組み合わせに溶解され、次に2つの溶液を共に混合し、得られた混合物を噴霧乾燥する。

【0104】

噴霧乾燥される混合物に存在し得る適切な有機溶媒としては、アルコール、例えば、エタノール、メタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール等が挙げられるが、これらに限定されない。他の有機溶媒としては、ペルフルオロカーボン、ジクロロメタン、クロロホルム、エーテル、酢酸エチル、メチル-tert-ブチルエーテル等が挙げられるが、これらに限定されない。フィード混合物に存在しうる水性溶媒としては、水または緩衝溶液が挙げられる。有機溶媒および水性溶媒の両方が、噴霧ドライヤーに供給される噴霧乾燥混合物に存在しうる。1つの態様では、エタノール：水の比率が約50：50～約90：10の範囲であるエタノール水溶媒が好ましい。混合物は、酸性またはアルカリ性のpHを有しうる。任意に、pH緩衝液が含まれうる。好ましくは、pHは約3～約10の範囲でありうる。

【0105】

噴霧乾燥される混合物に使用される1つまたは複数の溶媒の全量は、一般に99重量%より大きい。噴霧乾燥される混合物に存在する固体（薬物、荷電した脂質および他の成分）の量は、一般に約1.0重量%よりも少ない。好ましくは、噴霧乾燥される混合物中の固体の量は、約0.05～約0.5重量%の範囲である。

【0106】

噴霧乾燥プロセスにおける有機溶媒および水性溶媒を含む混合物の使用は、親水性成分と疎水性成分の組み合わせを可能にする一方、粒子内でかかる成分の組み合わせの可溶化を促進するために、リポソームまたは他の構造もしくは複合体の形成を必要としない。

【0107】

適切な噴霧乾燥技術が、例えば、K. Mastersによる「噴霧乾燥ハンドブック (Spray Drying Handbook)」, John Wiley & Sons, New York, 1984に記載されている。一般に、噴霧乾燥の間に、加熱空気または加熱窒素等の熱ガス由来の熱を使用して、連続液体フィードを噴霧することにより形成された液滴由来の溶媒をエバボレートする。他の噴霧乾燥技術が、当業者に周知である。好ましい態様において、ロータリーアトマイザーが使用される。回転噴霧を使用する適切な噴霧ドライヤーの例としては、Niro, Denmarkにより製造されたMobile Minor噴霧ドライヤーが挙げられる。熱ガスは、例えば、空気、窒素またはアルゴンであり得る。

【0108】

好ましくは、本発明の粒子は、約100～400の入口温度および約50～約130の出口温度を用いる噴霧乾燥により得られる。

【0109】

噴霧乾燥粒子は、粒子凝集を低減し、粉体の流動性を改善するために、粗面テクスチャーで作製され得る。噴霧乾燥粒子は、乾燥粉体吸入デバイスを介してエアゾール化を増強する特性を有するよう作製され得、口、喉および吸入デバイスへのより低い沈着をもたらす。

【0110】

本発明の粒子は、肺系への薬物送達に適切な組成物中で使用され得る。例えば、かかる組成物は、患者への投与、好ましくは吸入を介する投与のための粒子および薬学上許容され得るキャリアを含み得る。粒子は、治療薬を含まないより大きなキャリア粒子と共に同時送達され得、後者は、例えば約50μm～約100μmの範囲の質量メジアン直径を有する。粒子は、呼吸系への投与のために、それのみで、または液体（例えば生理食塩水）もしくは粉体等の任意の適切な薬学上許容され得るキャリア中で投与され得る。

【0111】

医薬、例えば、1つ以上の上記薬物を含む粒子は、治療、予防または診断を必要とする患

10

20

30

40

50

者の気道に投与される。粒子の呼吸系への投与は、当該分野で公知の手段により得る。例えば、粒子は吸入デバイスから送達される。好ましい態様において、粒子は、乾燥粉体吸入器(DPI)を介して投与される。メーター用吸入器(MDI)、ネブライザーまたは点滴注入技術もまた使用され得る。

【0112】

患者の気道に粒子を投与するために使用され得る種々の適切なデバイスおよび吸入の方法は、当該分野で公知である。例えば、適切な吸入器が、1976年8月5日にValentiniらに発行された米国特許第4,069,819号明細書、1991年2月26日にValentiniらに発行された米国特許第4,995,385号明細書、および1999年12月7日にPattonらに発行された米国特許第5,997,848号明細書に記載されている。患者の気道に粒子を投与するために使用されうる種々の適切なデバイスおよび吸入の方法は、当該分野で公知である。例えば、適切な吸入器は、Valentiniらに発行された米国特許第4,995,385号明細書および米国特許第4,069,819号明細書、Pattonに発行された米国特許第5,997,848号明細書に記載されている。他の例としては、限定されないが、Spinhaler(登録商標)(Fisons, Loughborough, U.K.)、Rotahaler(登録商標)(Glaxo-Wellcome, Research Triangle Technology Park, North Carolina)、FlowCaps(登録商標)(Hovione, Loures, Portugal)、Inhalator(登録商標)(Boeringer-Ingelheim, Germany)、およびAerolizer(登録商標)(Novartis, Switzerland)、diskhaler(Glaxo-Wellcome, RTP, NC)および当業者に公知の他のものが挙げられる。好ましくは、粒子は、乾燥粉体吸入器を介して、乾燥粉体として投与される。

10

20

30

40

50

【0113】

好ましくは、気道に投与された粒子は、上気道(中咽頭および喉頭)、その後に気管支および細気管支への分岐部に続く気管を含む下気道を通過し、その後、最終的な呼吸領域である肺胞または深肺へと至る呼吸細気管支に順番に分かれる末端細気管支を通過して運ばれる。本発明の好ましい態様において、粒子の集団のほとんどは、深肺に沈着する。本発明の別の態様において、送達は主に中央気道に対して行われる。上気道への送達もまたなされうる。

【0114】

本発明の1つの態様において、粒子の肺系への送達は、2000年6月9日に提出された米国特許出願「大きな治療用質量エアゾールの非常に有効な送達」、米国出願第09/591,307号(参照により本明細書にそのまま取り込まれる)に記載のような単回の呼吸活性化ステップである。本発明の別の態様において、吸入器容器に保管された粒子の質量の少なくとも50%が、被験体の呼吸系に単回の呼吸活性化ステップで送達される。さらなる態様において、医薬の少なくとも5ミリグラム、好ましくは10ミリグラムが、単回呼吸で、容器に封入された粒子を被験体の気道に投与することにより送達される。15、20、25、30、35、40および50ミリグラム程の高量が送達され得る。

【0115】

本明細書で使用される用語「有効量」は、所望の治療または診断上の効果または効力を達成するのに必要な量を意味する。薬物の実際の有効量は、利用される具体的な薬物またはその組合せ、具体的な処方組成、投与の形態、患者の年齢、体重、状態、ならびに処置される症状または状態の重篤度により変化し得る。特定の患者に対する用量は、従来の考察を用いて(例えば、適切な従来の薬理学的プロトコルにより)当業者により決定され得る。例えば、硫酸アルブテロールの有効量は、約100マイクログラム(μg)~約10ミリグラム(mg)の範囲である。

【0116】

エアゾール用量、処方および送達系もまた、特定の治療適用に対して選択され得、例えば、Gonda, I. 「気道への治療剤および診断剤の送達のためのエアゾール」Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6: 273-313, 1990; およびMoren 「エアゾール用量型および処方」Aerosols in Medicine, Principles, Diagnosis and Therapy, Morenら編、Elsevier, Amsterdam, 1985に記載されている。

【0117】

薬物放出速度は、放出定数に関して記載され得る。一次放出定数は、以下の等式を用いて示され得る：

【数4】

$$M_{(t)} = M_{(\infty)} * (1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

式中、 k は一次放出定数である。 $M_{(\infty)}$ は、薬物送達システム、例えば乾燥粉体中の薬物の総質量であり、 $M_{(t)}$ は、時間 t において乾燥粉体から放出された薬物の質量である。

10

【0118】

等式(1)は、放出媒体のある特定の体積において放出された薬物の量(すなわち質量)または放出された薬物の濃度のいずれかで示され得る。例えば、等式(1)は、

【数5】

$$C_{(t)} = C_{(\infty)} * (1 - e^{-kt}) \text{ または } \text{放出}_{(t)} = \text{放出}_{(\infty)} * (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

のように表してもよい。式中、 k は一次放出定数である。 $C_{(\infty)}$ は、放出媒体における薬物の最大理論濃度であり、 $C_{(t)}$ は、時間 t において乾燥粉体から放出媒体に放出される薬物の濃度である。

20

【0119】

一次放出定数による薬物放出速度は、以下の式：

【数6】

$$k = -\ln(M_{(\infty)} - M_{(t)}) / M_{(\infty)} / t \quad (3)$$

を用いて計算することができる。

【0120】

表4および8に示す放出定数は、等式(2)に採用される。

30

【0121】

本明細書で使用される単語「 a 」または「 a_n 」は、1つまたはそれ以上をいう。

【0122】

本明細書で使用される用語「名目上の用量」は、投与の目的のための粒子の集団中に存在し、かつ投与に利用され得る最大量を示す生物学的活性剤の総質量をいう。

【実施例】

【0123】

材料

Humulin L(ヒトインスリン亜鉛懸濁液)をリリー社から入手した(100U/mL)。

40

【0124】

質量メジアン空気力学的直径 - MMAD(μm)

質量メジアン空気力学的直径を、Aerosizer/Aerodisper (Amherst Process Instrument, Amherst, MA)を用いて測定した。約2mgの粉体製剤をAerodisper内に導入し、空気力学径を飛行時間型測定により測定した。

【0125】

体積メジアン幾何学的直径 - VMD(μm)

体積メジアン幾何学的直径を、HELOSレーザー回折計(Sympatec)と共にRODOS乾燥粉体分散器(Sympatec, Princeton, NJ)を用いて測定した。粉体を、RODOS入口へ導入し、2バールで調節した圧縮気流によって生成され

50

る剪断力によってエアロゾル化した。エアロゾル雲を、続いて H E L O S の測定ゾーン(レーザービームからの光を散乱し、粒子サイズ分布を推測するため、およびメジアン値を測定するために使用されるフラウンホーファー回折パターンを生成する)へ引き寄せた。

【0126】

記載される場合、体積メジアン幾何学的直径を Coulter Multisizer II を用いて測定した。粒子の同時存在(coincidence)が 5 ~ 8 % の間になるまで、約 5 ~ 10 mg の粉体製剤を 50 mL のイソトン(isoton) II 溶液に添加した。

【0127】

血漿インスリンレベルの測定

ラット血漿中のインスリンの定量を、ヒトインスリン特異的RIAキット(Linco Research, Inc., St. Charles, MO、カタログ番号 HI-14K)を用いて行った。アッセイでは、ラットインスリンとの 0.1 % 未満の交差反応性が示された。アッセイキット手順を、ラットから得た低血漿容量が適用されるように改良した。感度は約 5 μU / mL であった。

【0128】

エストロン - 硫酸塩血漿レベルの測定

ラット血漿中のエストロン - 硫酸塩の定量を、エストロン - 硫酸塩 RIA キット(Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX、カタログ番号 DSL-C5400)を用いて行った。アッセイキット手順を、ラットから得た低血漿容量が適用されるように、およびヒト血清標準マトリクスの影響を補正されるように改良した。感度は約 0.025 ng / mL であった。

【0129】

インスリン製剤の調製

表 1 に列挙する粉体製剤を以下のようにして調製した。予備噴霧乾燥用溶液を、脂質をエタノールに、およびインスリン、ロイシンおよび/またはクエン酸ナトリウムを水に溶解することにより調製した。次いで、エタノール溶液と水溶液を、エタノール / 水が 60 / 40 の比率で混合した。噴霧乾燥に使用する溶液の最終の全溶質濃度は、1 g / L から 3 g / L で変動した。一例として、DPPC / クエン酸塩 / インスリン(60 / 10 / 30)噴霧乾燥用溶液を、600 mg の DPPC を 600 mL のエタノールに溶解し、100 mg のクエン酸ナトリウムおよび 300 mg のインスリンを 400 mL の水に溶解し、次いで 2 つの溶液を混合して 1 g / L (w / v) の全溶質濃度を有する 1 リットルの共溶媒を作製することにより調製した。3 g / L (w / v) の高溶質濃度は、同容量のエタノールおよび水に各溶質を 3 倍多く溶解することにより調製した。

【0130】

次いで、溶液を乾燥粉体を作製するために使用した。Nitro Atomizer Portable Spray Dryer (Nitro, Inc., Columbus, MD) を使用した。可変圧力(1 ~ 5 bar)で圧縮された空気が、ドライヤーの上に配置した回転アトマイザー(2,000 ~ 30,000 rpm)を動かした。種々の速度(20 ~ 66 mL / 分)での液体供給物を、電気的測定ポンプ(LMI、モデル番号 A151-192s)によって連続的にアトマイザーへポンピングした。入口温度および出口温度の両方を測定した。入口温度を、手動で制御した; 100 ~ 400 の間で変わり得、そして 100、110、150、175、または 200 で、5 の制御限界で安定させた。出口温度を、入口温度ならびに気体供給速度および液体供給速度のような因子によって決定した(50 ~ 130 の間で変化した)。容器を、粉体産物を収集するためにサイクロンへきつく取り付けた。

【0131】

【表 1】

粉体製剤 番号	組成 (%)						
	DPePC	DSePC	DPPG	DPPC	ロイシン	クエン酸 塩	インスリン
1†				70	10		20
2		70			20		10
3		70			10		20
4	50						50
5‡			40			10	50
6	70				10		20
7	50						50
8	54.5						45.5
9	50				10		40
10	70				10		2
11	70				8	2	20

10

粉体製剤 番号	組成 (%)						
	DPePC	DSePC	DPPG	DPPC	ロイシン	クエン酸 塩	インスリン
12†				40		10	50
13†				60		10	30
13A†				60		10	30
14‡			70		20		‘
15†				70	20		10

20

† ロット# 4-XXX-201002 (#1), 4-XXX-201 065 (#12), 04-00024 (#13), 4-XXX-114068C

(#13A)および4-XXX-167113 (#15) は脂質DPPCを含み、陰性対照とする。

30

‡ 粉体製剤# 5はpH=4, 0で噴霧乾燥した。

‡ 粉体製剤# 14はpH=7, 4で噴霧乾燥した。

【 0 1 3 2 】

インスリン含有粉体の物理的特徴を表2に記載する。M M A D およびV M G D は先に詳述したようにして測定した。

【 0 1 3 3 】

【 表 2 】

製剤	組成 (重量%基準)	MMAD (μm) §	VMGD (μm) ¶	密度 (g/cc) ‡
Humulin R	--	--	--	--
Humulin L	--	--	--	--
Humulin U	--	--	--	--
1	DPPC/Leu/インスリン(シガ'マ) = 70/10/20	2.6	13.4	0.038
2	DSePC (アラニン)/Leu/インスリン(シガ'マ) = 70/10/20	3.3	10.0	0.109
3	DSePC (アラニン)/Leu/インスリン(シガ'マ) = 70/10/20	3.4	13.6	0.063
4	DPePC (アラニン)/インスリン(シガ'マ)= 50/50	3.2	15.3	0.044
5	DPPG/カニ酸ナトリウム/インスリン = 40/10/50	3.9	11.6	0.113
6	DPePC (アラニン)/Leu/インスリン (シガ'マ)= 70/10/20	2.6	9.1	0.082
7	DPePC (アラニン)/インスリン (シガ'マ)= 50/50	2.8	11.4	0.060
8	DPePC (アラニン)/インスリン (シガ'マ) = 54.5/45.5	2.8	12.6	0.049

10

製剤	組成 (重量%基準)	MMAD (μm) §	VMGD (μm) ¶	密度 (g/cc) ‡
9	DPePC (アラニン)/Leu/インスリン (シガ'マ)= 50/10/40	2.2	8.4	0.069
10	DPePC (アラニン)/Leu/インスリン (シガ'マ) = 70/10/20	3.7	15.5	0.057
11	DPePC (アラニン)/Leu/カニ酸ナトリウム/ インスリン(シガ'マ)= 70/8/2/20	2.6	15.3	0.029
12	DPPC/カニ酸ナトリウム/インスリン = 40/10/50	3.5	11.6	0.091
13	DPPC/インスリン/カニ酸ナトリウム= 60/30/10	1.9	8.0	0.056

20

† インビトロ試験またはインビオ試験のいずれかでの比較のための対照製剤として使用

§ 質量メジアン空気力学的直径

¶ 2バール圧での体積メジアン幾何学的直径

‡ $d_{aer} = d_g \sqrt{\rho}$ を用いて測定

30

【0134】

インスリンを含有する製剤の物理的特徴を示す表2に記載のデータは、該製剤の吸入可能性を示唆するもの(predictive)である。すなわち、先に考察したように、本明細書に記載のようにして調製された粉体が有する大幾何学的直径、小空気力学的直径および低密度は、該粒子を吸入可能なものとする。

【0135】

インビオインスリン実験

インスリンを含有する乾燥粉体製剤をラットに肺投与後の、ラットの血流内へのインスリン吸収の速度および程度を測定するために、以下の実験を行った。

【0136】

投与した名目上のインスリン投与量は、ラット1匹あたり100 μg とした。名目上の投与量を達成するため、ラット1匹あたりに投与した粉体の全重量を、各粉体の組成割合に応じて0.2mg~1mgの範囲とした。雄Sprague-DawleyラットをTaconic Farms (Germantown, NY) から入手した。使用時、動物の体重は平均386g ($\pm 5\text{g}$ S.E.M.) であった。動物は食事と水に自由にアクセス可能とした。

【0137】

粉体は、ラット用吸入デバイス (Penn Century (Philadelphia, PA) を用いて肺に送達した。粉体量を吸入試料チャンバーに移した。吸入器の送達チューブを、口を介して気管へ挿入し、チューブの先端がカリナ (最初の分岐部) から約1cm

40

50

になるまで進めた。吸入器サンプルチャンバから粉体を送達するために使用した空気体積は3mLであった(10mL注射器から送達される)。ラットへの粉体送達を最大にするため、この注射器を、1粉体用量あたり合計で3回の空気放出のためにもう2回多く再充填および排出した。

【0138】

注射可能なインスリン製剤Humulin Lを、25 μ gインスリンの名目上の投与量に対して7.2 μ Lの注射容量で皮下注射により投与した。投与の前日にラットの頸静脈内にカテーテルを配置した。サンプリング時に、血液サンプルを頸静脈カテーテルから採取し、直ぐにEDTAコートチューブに移した。サンプリング時間は、粉体投与後0、0.25、0.5、1、2、4、6、8および24時間とした。場合によっては、さらなるサンプリング時間(12時間目)を含める、および/または24時間目を割愛した。遠心分離後、血液サンプルから血漿を回収した。血漿サンプルを、24時間以内に解析を行なう場合には4で、または回収後24時間より後に解析を行なう場合には-75で保存した。血漿インスリン濃度は上述のようにして測定した。

【0139】

表3は、上述のアッセイを用いて定量したインスリン血漿レベルを含む。

【0140】

【表3】

時間 (時間)	血漿インスリン濃度 (μ U/mL) ± S. E. M.									
	1	2	3	4	5	6	13A	14	Hum- lin L	15
0	5.0 ±0.0	5.2 ±0.2	5.0 ±0.0	5.0 ±0.0	5.3 ±0.2	5.7 ±0.7	5.0 ±0.0	5.0 ±0.0	5.0 ±0.0	5.0 ±5.0
0.25	1256.4 ±144.3	61.6 ±22.5	98.5 ±25.3	518.2 ±179.2	240.8 ±67.6	206.8 ±35.1	1097.7 ±247.5	933.9 ±259.7	269.1 ±82.8	1101.9 ±258.9
0.5	1335.8 ±81.9	85.2 ±21.7	136.7 ±37.6	516.8 ±190.9	326.2 ±166.9	177.3 ±7.8	893.5 ±177.0	544.9 ±221.1	459.9 ±91.6	1005.4 ±263.9
1	859.0 ±199.4	85.4 ±17.6	173.0 ±28.8	497.0 ±93.9	157.3 ±52.5	170.5 ±32.9	582.5 ±286.3	229.6 ±74.4	764.7 ±178.8	387.5 ±143.9

10

時間 (時間)	血漿インスリン濃度 (μ U/mL) ± S. E. M.									
	1	2	3	4	5	6	13A	14	Hum- lin L	15
2	648.6 ±171.1	94.8 ±25.0	158.3 ±39.1	496.5 ±104.9	167.7 ±70.5	182.2 ±75.0	208.5 ±78.3	129.8 ±45.7	204.4 ±36.7	343.8 ±95.3
4	277.6 ±86.8	52.5 ±9.1	98.0 ±24.3	343.8 ±66.7	144.8 ±43.8	170.2 ±56.3	34.9 ±5.4	41.9 ±28.7	32.1 ±22.6	170.6 ±79.9
6	104.0 ±43.1	33.0 ±10.7	58.7 ±4.1	251.2 ±68.4	95.7 ±27.3	159.5 ±43.4	12.3 ±2.4	9.0 ±2.9	11.1 ±7.5	15.4 ±4.5
8	54.4 ±34.7	30.2 ±8.1	42.5 ±17.8	63.2 ±16.5	52.5 ±13.7	94.8 ±23.5	5.2 ±0.1	5.0 ±0.0	5.5 ±2.1	6.5 ±0.6
12				17.2 ±6.5						
24				5.0 ±0.0	5.5 ±0.3					
n	5	5	6	6	6				8	

20

30

40

50

【0141】

表3のインビボ放出データは、インスリンおよび正に荷電した脂質 (DPePCおよびDSePC) を含有する粉体製剤は、インスリンおよび脂質DPPCを含有する粉体製剤(製剤1および13)で見られるものよりも有意に低いインスリン初期バースト、ならびに6~8時間で、持続的な上昇レベルを有することを示す。図1に製剤2、3、6および15からのインスリンの放出プロフィールを示す。

【0142】

さらに、脂質および活性剤が、全体として正反対であり、したがって電荷相互作用を行いうる電荷を有するpHにおいて噴霧乾燥製剤の調製がなされるならば、中性pHで達成されるのと同じ電荷を有する帶電脂質の使用も採用され得る。例えば、負に荷電した脂質DPPGを用いた製剤5を参照のこと。製剤5は、約4.0のpHで調製し、噴霧乾燥した。このpHでは、DPPGは負に荷電しており、インスリンは正に荷電していることにより(pI=5.5)、電荷相互作用の発生をもたらす。しかしながら、DPPGおよびインスリンの両方が全体として負電荷を有するpH=7.4においてDPPGおよびインスリンを調製し、噴霧乾燥する場合である製剤14では、電荷相互作用が起こるための適切な環境は提供されない。製剤5が示したインスリンの初期バースト(240.8±67.5)。

6 μ U / mL) が、製剤 14 (933.9 \pm 259.7 μ U / mL) と比べて有意に低く、処置後 6 ~ 8 時間でより高い持続レベルを有したことは特筆すべきである。図 2 は、製剤 5、14 および 13A (脂質、DPPC) のインビボ放出プロフィールの比較を示す。

【0143】

インスリン含有製剤のインビトロ解析

インスリン含有乾燥粉体製剤のインビトロ放出を、Gietz らによる Eur. J. Pharm. Biopharm., 45:259-264 (1998) に記載のようにして行なったが、いくつかの変更を伴った。簡単には、20 mL のスクリューキャップ付ガラス製シンチレーションバイアル内で、約 10 mg の各粉体製剤と 4 mL の加温 (37°C) 1% アガロース溶液とをポリスチレン搅拌棒を用いて混合した。次いで、得られた混合物を 1 mL のアリコートで、1 組の 5 つの別の 20 mL 容ガラス製シンチレーションバイアルに分配した。乾燥粉体含有アガロース分散物を、遮光した室温デシケーターボックス内で冷却し、ゲル化させた。約 37°C の回転振盪器で放出試験を行った。所定の時点で先の放出媒体 (1.5 mL) を除去し、新たな放出媒体 (1.5 mL) を各バイアルに添加した。これらの試験の代表的な時間点は、5 分、1, 2, 4, 6 および 24 時間とした。使用した放出媒体は、20 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-ピペラジン-1-エタンスルホン酸 (HEPES)、138 mM NaCl、0.5% Pluronics (Synperonic PE/F68; 放出媒体中でのインスリン線維化を防止するため); pH 7.4 から構成された。既知濃度のインスリン標準品を用いる Pierce (Rockford, IL) タンパク質アッセイキット (Anal Biochem, 150:76-85 (1985)) を参照のこと) を用いて放出媒体中のインスリン濃度をモニターした。

10

20

【0144】

表 4 に、インスリンを含有する表 1 の粉体製剤のインビトロ放出データおよび一次放出定数をまとめた。

【0145】

【表 4】

粉体製剤 番号	6時間で放出 されたインスリンの 累積%	24時間で放出 されたインスリンの 累積%	24時間での [†] 最大放出 (累積%)	一次 [‡] 放出 定数(時 ⁻¹)
Humulin R	92.67 ± 0.36	94.88 ± 0.22	91.6 ± 5.42	1.0105 ± 0.2602
Humulin L	19.43 ± 0.41	29.71 ± 0.28	36.7 ± 2.56	0.0924 ± 0.0183
Humulin U	5.17 ± 0.18	12.65 ± 0.43	46.6 ± 27.0	0.0158 ± 0.0127
2	31.50 ± 0.33	47.52 ± 0.43	48.22 ± 0.46	0.1749 ± 0.0038
3	26.34 ± 0.71	37.49 ± 0.27	38.08 ± 0.72	0.1837 ± 0.0079
4	24.66 ± 0.20	31.58 ± 0.33	31.51 ± 1.14	0.2457 ± 0.0214
5	29.75 ± 0.17	35.28 ± 0.19	33.66 ± 2.48	0.4130 ± 0.0878
6	17.04 ± 0.71	24.71 ± 0.81	25.19 ± 0.52	0.1767 ± 0.0083
7	13.53 ± 0.19	19.12 ± 0.40	19.51 ± 0.48	0.1788 ± 0.0101
8	13.97 ± 0.27	17.81 ± 0.46	17.84 ± 0.55	0.2419 ± 0.0178
9	17.47 ± 0.38	22.17 ± 0.22	21.97 ± 0.64	0.2734 ± 0.0196
10	25.96 ± 0.31	34.94 ± 0.31	35.43 ± 0.90	0.2051 ± 0.0120
11	34.33 ± 0.51	47.21 ± 0.47	47.81 ± 0.85	0.1994 ± 0.0082
12	61.78 ± 0.33	68.56 ± 0.23	65.20 ± 3.34	0.5759 ± 0.0988
13	78.47 ± 0.40	85.75 ± 0.63	84.9 ± 3.81	0.5232 ± 0.0861

[†] 放出_(t) = 放出_(inf) * (1 - e^{-kt})

[‡] 対照製剤として使用

10

20

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

表4に示すデータは、正に荷電した脂質D p e P C (製剤4および6~11) およびD S e P C (製剤2および3) を用いたインスリン含有粉体製剤では、低速放出性の注射可能なインスリン製剤Humulin Lで観察されるものと類似の一次放出定数が達成され得ることを示す。さらにこれらの同製剤の一次放出定数は、高速放出性の注射可能なインスリン製剤Humulin Rで観察されるものより有意に小さい。そのため、種々の組成の正に荷電した脂質を有する持続放出乾燥粉体インスリン製剤が製剤化され得る。

【 0 1 4 7 】

硫酸エストロン含有粉体製剤の調製

表に記載の硫酸エストロン粉体製剤を、以下のようにして調製した。予備噴霧乾燥用溶液を、脂質(lipin)をエタノールに、および硫酸エストロンとロイシンを水に溶解することにより調製した。次いで、エタノール溶液と水溶液を、エタノール/水が70/30の比率(ration)で混合した。噴霧乾燥に使用する溶液の最終の全溶質濃度は、1g/Lから3g/Lで変動した。一例として、D P e P C / ロイシン / 硫酸エストロン(76/20/4)噴霧乾燥用溶液を、760mgのD P e P Cを700mLのエタノールに溶解し、200mgのロイシンおよび40mgの硫酸エストロンを300mLの水に溶解し、次いで2つの溶液を混合して1g/L(w/v)の全溶質濃度を有する1リットルの共溶媒を作製することにより調製した。例えば3g/L(w/v)の高溶質濃度は、同容量のエタノールおよび水に各溶質を3倍多く溶解することにより調製した。

【 0 1 4 8 】

インスリンを含有する粉体製剤について上述した手順にしたがって混合物を噴霧乾燥した。噴霧乾燥中、供給速度は約50mL/分とし、入口温度は約110~約120の範

囲とし、出口温度は約52とした。

【0149】

硫酸エストロン含有粉体の物理的特徴を表5に記載する。MMA DおよびVMGDは先に詳述したようにして測定した。

【0150】

【表5】

粉体製剤 番号	組成 (重量%基準)	MMAD (μm) §	VMGD (μm) ¶	密度 (g/cc) ‡
16	DPePC (アボンテイ)/オイシ/ 硫酸エストロン(ナトリウム塩) =76/20/4	5.9	16.0	0.136
17	DPPC/オイシ/ 硫酸エストロン(ナトリウム塩) =76/20/4	3.7	12.7 #	0.085

†インビオ試験での比較のための対照として使用

§質量メジアン空気力学的直径

¶2バール圧での体積メジアン幾何学的直径

#コ-ルツ-マルチサザー-を用いて測定

‡ $d_{\text{aer}} = d_g \sqrt{\rho}$ を用いて測定

10

20

【0151】

硫酸エストロンを含有する製剤の物理的特徴を示す表5に記載のデータは、該製剤の吸入可能性を示唆するものである。すなわち、先に考察したように、本明細書に記載のようにして調製された粉体が有する大幾何学的直径、小空気力学的直径および低密度は、該製剤を吸入可能なものとする。

【0152】

インビオ実験 - 硫酸エストロン含有粉体

硫酸エストロンを含有する乾燥粉体製剤の肺投与後の、ラットの血流内への硫酸エストロン吸収の速度および程度を測定するために、以下の実験を行った。

【0153】

投与した名目上の硫酸エストロン投与量は、ラット1匹あたり1mgの粉体中40 μg とした。雄Sprague-DawleyラットをTaconic Farms (Germantown, NY) から入手した。使用時には、動物の体重は平均415g ($\pm 10\text{ g S.E.M.}$) であった。動物は食事と水に自由にアクセス可能とした。

【0154】

粉体を、ラット用吸入デバイス (PennCentury (Philadelphia, PA) を用いて肺に送達した。粉体量を吸入器の試料チャンバに移した。次いで、吸入器の送達チューブを、口を介して気管へ挿入し、チューブの先端がカリナ (最初の分岐部) から約1cmになるまで進めた。吸入器の試料チャンバから粉体を送達するために使用した空気体積は3mLであった (10mL注射器から送達される)。ラットへの粉体送達を最大にするため、この注射器を、1粉体用量あたり合計で3回の空気放出のためにもう2回多く再充填および排出した。

【0155】

投与の前日にラットの頸静脈内にカテーテルを配置した。サンプリング時に、血液サンプルを頸静脈カテーテルから採取し、直ぐにEDTAコートチューブに移した。サンプリング時間は、粉体投与後0、0.25、0.5、1、2、4および6時間とした。遠心分離後、血液サンプルから血漿を回収した。血漿サンプルを、24時間以内に解析を行なう場合には4で、または回収後24時間より後に解析を行なう場合には-75で保存した。

【0156】

30

40

50

表6は、上述のアッセイを用いて定量した硫酸エストロン血漿レベルを含む。

【0157】

【表6】

血漿硫酸エストロン濃度		(ng/mL) ± S.E.M.
時間 (時間)	製剤16	製剤17
0	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.05
0.25	12.07 ± 1.96	22.26 ± 8.96
0.5	18.88 ± 2.21	23.39 ± 12.72
1	12.20 ± 3.31	10.59 ± 0.61
2	4.65 ± 0.77	3.45 ± 0.63
4	4.02 ± 1.42	0.86 ± 0.10
6	1.49 ± 0.48	0.33 ± 0.12
n	4	3

10

20

【0158】

表6に示し、図3に図示的に示した結果は、脂質DPPC(全体として正味電荷がない)および硫酸エストロンを用いた製剤と比較した場合、DPePC(全体として正電荷)および硫酸エストロン(負電荷)を含有する製剤は、硫酸エストロンの持続放出を示すことを示す。具体的には、投与後6時間目、硫酸エストロンの血漿レベルは、DPPC含有製剤で 0.33 ± 0.12 ng/mLであるのと比べ、DPePC含有製剤では 1.49 ± 0.48 ng/mLであった。

【0159】

アルブテロール含有粉体製剤の調製

30

表7に記載の硫酸アルブテロール粉体製剤を、以下のようにして調製した。予備噴霧乾燥用溶液を、脂質をエタノールに、および硫酸アルブテロールとロイシンとを水に溶解することにより調製した。次いで、エタノール溶液と水溶液を、エタノール/水が70/30の比率で混合した。噴霧乾燥に使用する溶液の最終の全溶質濃度は、1g/Lから3g/Lで変動した。一例として、DPPC/ロイシン/硫酸アルブテロール(76/16/8)噴霧乾燥用溶液を、760mgのDPPCを700mLのエタノールに溶解し、160mgのロイシンおよび870mgの硫酸アルブテロールを300mLの水に溶解し、次いで2つの溶液を混合して1g/L(w/v)の全溶質濃度を有する1リットルの共溶媒を作製することにより調製した。3g/L(w/v)の高溶質濃度は、同容量のエタノールおよび水に各溶質を3倍多く溶解することにより調製した。溶液を、インスリン含有製剤について上述したようにして噴霧乾燥した。具体的には、入口温度は約110～約140とし、出口温度は約45～57の範囲とした。

40

【0160】

硫酸アルブテロール含有粉体の物理的特徴を表7に記載する。MMA DおよびVMGDは先に詳述したようにして測定した。

【0161】

【表7】

粉体製剤番号	組成 (重量%基準)	MMAD (μm) §	VMGD (μm) ¶	密度 (g/cc) ‡
18	DSPC/ロイシン/ 硫酸アルブテロール = 76/16/8	3.3	6.1	0.293
19	DSPG/ロイシン/ 硫酸アルブテロール = 76/16/8	4.1	6.4	0.410
20	DPPC/ロイシン/ 硫酸アルブテロール = 76/23/1	2.8	12.0	0.054
21	DPPG/ロイシン/ 硫酸アルブテロール = 76/16/8	3.3	7.1	0.216

† インビトロ試験またはインビボ試験のいずれかでの比較のための対照として使用

§ 質量メジアン空気力学的直径

¶ 2 バール圧での体積メジアン幾何学的直径

‡ $d_{aer} = d_g \sqrt{\rho}$ を用いて測定

10

20

【 0 1 6 2 】

硫酸アルブテロールを含有する製剤の物理的特徴を示す表 7 に記載のデータは、該製剤の吸入可能性を示唆するものである。すなわち、先に考察したように、本明細書に記載のようにして調製された粉体が有する大幾何学的直径、小空気力学的直径および低密度は、該粒子を吸入可能なものとする。

【 0 1 6 3 】

硫酸アルブテロール製剤のインビボ試験

表 7 に記載の硫酸アルブテロール製剤の持続効果を評価するため、モルモットにおける肺機能評価のための全身体プレチスモグラフィ方法を使用した。

30

【 0 1 6 4 】

使用したシステムは、BUXCO X A 肺機能ソフトウェアを備える BUXCO 全身体無制限プレチスモグラフィーシステム (BUXCO Electronics, Inc., Sharon, CT) であった。この方法は、Silbaugh, S. A. およびMauderly, J. L. 、American Physiological Society, Vol. 84 : 1666 - 1669 (1984) ならびに Chang, B. T. ら、Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol. 39 (3) : 163 - 168 (1998) に記載される通りに行なった。この方法は、霧状化によって得られるメタコリンを用いて個々の動物を経時的に繰り返しチャレンジすることを可能にした。流れパラメータに基づく気道抵抗の計算した測定値、強化休止PenHを、メタコリン誘導性気管支収縮からの保護のマーカーとして使用した。ベースライン肺機能(気道過剰反応)値を、いずれの実験処理の前にも測定した。次いで、生理食塩水およびメタコリンに応じる気道過剰反応を、硫酸アルブテロール製剤の投与後の種々の時点 (2 ~ 3, 16 および 24 時間) で評価した。平均 PenH を、生理食塩水またはメタコリンを用いたチャレンジ後の 4 分と 9 分の間に収集したデータから計算した。各時点でのベースライン PenH の割合を、各実験動物について計算した。その後、同じ硫酸アルブテロール製剤を受けた動物からの値を、平均して、各時点での平均群応答 (± 標準誤差) を決定した。

40

【 0 1 6 5 】

投与した硫酸アルブテロールの名目上の投与量は、DPPG を基剤とする製剤 (# 21)

50

では 50 μg とし、DPPC を基剤とする製剤 (# 20) では 25 μg とした。この名目投与量を達成するため、投与した粉体の全重量を、それぞれ 0.625 mg および 2.5 mg とした。

【0166】

雄性 Hartley モルモットを、Elm Hill Breeding Labs (Chelmsford, MA) から入手した。使用時、動物の体重は平均 363 g ($\pm 5\text{ g}$ S.E.M.) であった。動物は食事と水に自由にアクセス可能とした。粉体量を吸入試料チャンバ (モルモット用吸入器デバイス Penn Century (Philadelphia, PA) に移した。吸入器の送達チューブを、口を介して気管へ挿入し、チューブの先端がカリナ (最初の分岐部) から約 1 cm になるまで進めた。吸入器サンプルチャンバから粉体を送達するために使用した空気体積は 3 mL であった (10 mL 注射器から送達される)。モルモットへの粉体送達を最大にするため、注射器を、1 粉体用量あたり合計で 3 回の空気放出のためにもう 2 回多く再充填および排出した。メタコリンチャレンジを、投与後 2~3、16 および 24 時間の時点で実行した。

【0167】

図 4 は、DPPC (全体として正味電荷がない) および硫酸アルブテロールを含有する製剤と比較した場合、DPPG (全体として負電荷) および硫酸アルブテロール (全体として正電荷) を含有する製剤は、投与後少なくとも 24 時間、メタコリン誘導性気管支収縮に対する持続的保護を提供したことを示す。

【0168】

別の実験では、DPPC を基剤とする製剤における 200 μg の硫酸アルブテロールは、誘導された気管支収縮に対する長時間保護を提供しなかった。

【0169】

インビトロ放出試験 - 硫酸アルブテロール

硫酸アルブテロールの制御放出試験を、COSTAR (登録商標) Brand Transwell Inserts, With Plates, Sterile を用いて行った。プレートに 4.7 cm^2 の面積を有する 6 つのウェルを設けた。インサートサイズは 2.4 mm であり、孔径は 3.0 μm であった。所定量の被験粉体 (約 10~15 mg) を HPMC Size # 2 カプセル内に入れた。次いで、カプセルを吸入器内に配置し、内蔵 (in-house) 真空システムを用いて粉体を Transwell インサート上に噴霧した。製剤化は三連で行なった。

【0170】

噴霧後、予め 37 度 30 分間平衡化しておいた容量 1.8 mL のリン酸緩衝生理食塩水 ($\text{pH} = 7.4$) を含む Transwell プレート内にインサートを配置した。実験中において緩衝液の蒸発を防ぐため、Transwell プレートを密閉した。

【0171】

Transwell 実験は、回転振盪器の 37 のインキュベータにおいて 100 min⁻¹ のスピードで行った。実験中の特定の時間点において、1.8 mL のリン酸緩衝生理食塩水を Transwell プレートから取り出した。次いで、インサートを、1.8 mL の新しいリン酸緩衝生理食塩水を含む別の Transwell プレートに入れた。典型的な Transwell 実験は 4 時間行なう。サンプルは、5 分、15 分、30 分、1 時間、1.5 時間、2 時間、3 時間および 4 時間後に抜き出す。

【0172】

予め決められたのインビトロ放出時間点にサンプリングした PBS 緩衝液中の硫酸アルブテロールの量を、Phenomenex Luna 5 μm 、C8 (2)、250 \times 4.6 mm カラム (Torrance, CA) および 275 nm での UV 検出を用いて RPLC 法により定量した。

【0173】

表 8 に、硫酸アルブテロールを含有する表 7 の粉体製剤のインビトロ放出データおよび一次放出定数をまとめる。DSPC (正味電荷がない) および硫酸アルブテロール (正) を

10

20

30

40

50

含有する粉体製剤と比較した場合、D S P G (負電荷) および硫酸アルブテロールを含有する粉体製剤の一次放出定数は約4倍低い。

【0174】

【表8】

粉体製剤番号	組成(重量%基準)	4時間で放出されたインスリンの累積%	4時間での最大放出(累積%) [†]	一次放出定数(時 ⁻¹) [‡]
18	DSPC/ロイシン/硫酸アルブテロール(ナトリウム塩) 76/16/8	106.21 ± 1.73	105.64 ± 0.20	29.7360 ± 0.7504
19	DSPC/ロイシン/硫酸アルブテロール(ナトリウム塩) 76/16/8	97.44 ± 0.68	95.13 ± 1.39	7.9334 ± 0.6877

$$\frac{1}{2} \text{ 放出}_{(t)} = \text{放出}_{(\infty)} * (1 - e^{-kt})$$

† 対照製剤として使用

10

20

【0175】

本発明をその好ましい態様に関して具体的に示し記載したが、当業者は、添付の請求の範囲に包含される本発明の範囲を逸脱することなく本発明において形態および詳細の種々の変更を行いうることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0176】

【図1】図1は、インスリンおよび全体で正味の電荷を有さない脂質(DPPC)またはインスリンとは逆の全体で正味の電荷を有する脂質(DSePCおよびDPePC)のいずれかを含有する乾燥粉体製剤のインビボ放出プロフィールを示すグラフである。

【図2】図2は、pH4または7.4のいずれかで活性剤とともに噴霧乾燥した、全体で正味の電荷を有さない脂質(DPPC)と組み合わせたインスリンまたは全体で負の電荷を有する荷電した脂質(DPPC)と組み合わせたインスリンを含有する乾燥粉体製剤のインビボ放出プロフィールのグラフである。

【図3】図3は、硫酸エストロン(-)、および全体で正味の電荷を有さない脂質(DPPC)または全体で硫酸エストロンとは逆の電荷を有する脂質(DPePC, +)のいずれかを含有する乾燥粉体製剤のインビボ放出プロフィールを示すグラフである。

【図4】図4は、噴霧により与えられたメタコリンで何度も繰り返しチャレンジした動物における硫酸アルブテロールおよび脂質の乾燥粉体製剤の投与後の時間に対するベースラインより上のPenHのパーセントのグラフである。

30

【図1】

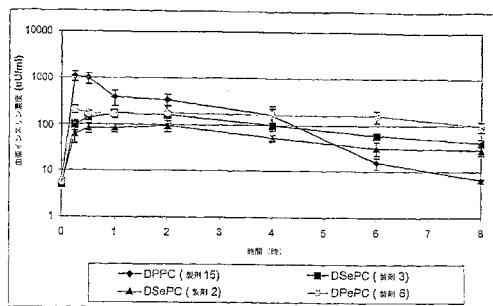


FIG. 1

【図2】

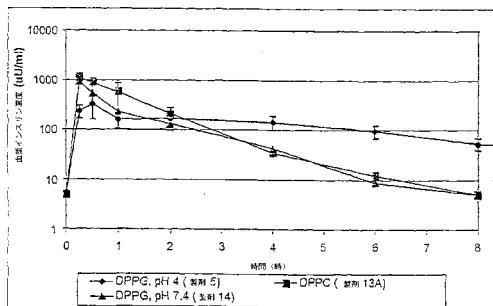


FIG. 2

【図3】

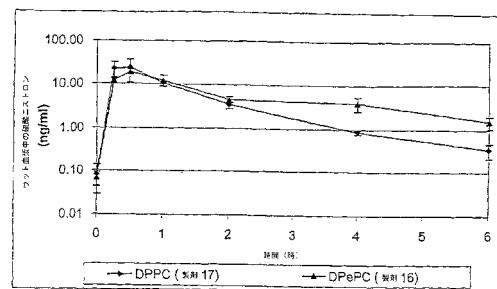


FIG. 3

【図4】

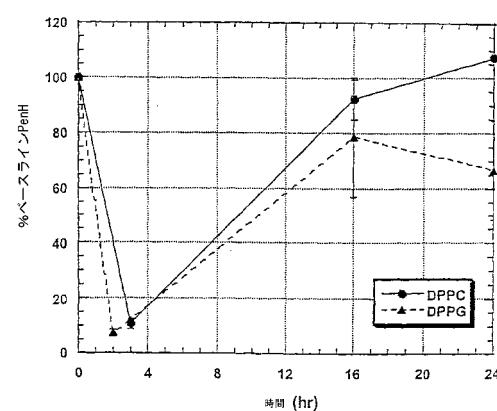


FIG. 4

【国際公開パンフレット】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053190 A2

(51) International Patent Classification: A61K 47/48. (74) Agents: ELMORE, Carolyn, S. et al.; Hamilton, Brook, Smith & Reynolds, P.C., 530 Virginia Road, P.O. Box 9133, Concord, MA 01742-9133 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/48956

(22) International Filing Date:
18 December 2001 (18.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/752,109 29 December 2000 (29.12.2000) US

(71) Applicant: ADVANCED INHALATION RESEARCH, INC. [US/US]; 840 Memorial Drive, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors: BASU, Sujit, K.; Sterns Street, Unit 1, Cambridge, MA 02138 (US); HRKACH, Jeffrey, S.; 24 Cambridge Terrace, Unit 2, Cambridge, MA 02140 (US); LIPP, Michael; 11 Salvi Drive, Framingham, MA 01701 (US); ELBERT, Katharina; Sterns Street, Unit 1, Cambridge, MA 02138 (US); EDWARDS, David, A.; 171 Commonwealth Avenue, Unit 3, Cambridge, MA 02116 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU,

CZ, DL, DK, DM, DZ, EC, IE, IS, H, GB, GD, GE, GH,

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KU, KG, KP, KR, KZ, L, C,

LK, I, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

MX, MZ, NO, NZ, OM, PII, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,

SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,

YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, TM), European patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

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



WO 02/053190 A2

(54) Title: PARTICLES FOR INHALATION HAVING SUSTAINED RELEASE PROPERTIES

(57) Abstract: The invention generally relates to a method for pulmonary delivery of therapeutic, prophylactic and diagnostic agents to a patient wherein the agent is released in a sustained fashion, and to particles suitable for use in the method. In particular, the invention relates to a method for the pulmonary delivery of a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent comprising administering to the respiratory tract of a patient in need of treatment, prophylaxis or diagnosis an effective amount of particles comprising a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent or any combination thereof in association with a charged lipid, wherein the charged lipid has an overall net charge which is opposite to that of the agent upon association with the agent. Release of the agent from the administered particles occurs in a sustained fashion.

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-1-

PARTICLES FOR INHALATION HAVING SUSTAINED RELEASE
PROPERTIES

BACKGROUND OF THE INVENTION

Pulmonary delivery of bioactive agents, for example, therapeutic, diagnostic and prophylactic agents provides an attractive alternative to, for example, oral, transdermal and parenteral administration. That is, pulmonary administration can typically be completed without the need for medical intervention (self-administration), the pain often associated with injection therapy is avoided, and the amount of enzymatic and pH mediated degradation of the bioactive agent, frequently encountered with oral therapies, can be significantly reduced. In addition, the lungs provide a large mucosal surface for drug absorption and there is no first-pass liver effect of absorbed drugs. Further, it has been shown that high bioavailability of many molecules, for example, macromolecules, can be achieved via pulmonary delivery or inhalation. Typically, the deep lung, or alveoli, is the primary target of inhaled bioactive agents, particularly for agents requiring systemic delivery.

The release kinetics or release profile of a bioactive agent into the local and/or systemic circulation is a key consideration in most therapies, including those employing pulmonary delivery. That is, many illnesses or conditions require administration of a constant or sustained levels of a bioactive agent to provide an effective therapy. Typically, this can be accomplished through a multiple dosing regimen or by employing a system that releases the medicament in a sustained fashion.

However, delivery of bioactive agents to the pulmonary system typically results in rapid release of the agent following administration. For example, U.S. Patent No. 5,997,848 to Patton *et al.* describes the rapid absorption of insulin following administration of a dry powder formulation via pulmonary delivery. The peak insulin level was reached in about 30 minutes for primates and in about 20 minutes for human subjects. Further, Heinemann, Traut and Heise teach in *Diabetic Medicine* 14:63-72 (1997) that the onset of action, assessed by glucose infusion rate,

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-2-

in healthy volunteers after inhalation was rapid with the half-maximal action reached in about 30 minutes.

As such, a need exists for formulations suitable for inhalation comprising bioactive agents and wherein the bioactive agent of the formulation is released in a 5 sustained fashion into the systemic and/or local circulation.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention is based upon the unexpected discovery that combining a charged agent with a lipid carrying an opposite charge results in a sustained release profile of the agent.

10 The invention generally relates to a method for pulmonary delivery of therapeutic, prophylactic and diagnostic agents to a patient wherein the agent is released in a sustained fashion, and to particles suitable for use in the method. In particular, the invention relates to a method for the pulmonary delivery of a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent comprising administering to the 15 respiratory tract of a patient in need of treatment, prophylaxis or diagnosis an effective amount of particles comprising a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent or any combination thereof in association with a charged lipid, wherein the charged lipid has an overall net charge which is opposite to that of the agent upon association with the agent. Release of the agent from the administered particles 20 occurs in a sustained fashion.

In one embodiment, the association of the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent and the oppositely charged lipid can result from ionic complexation. In another embodiment, association of the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent and the oppositely charged lipid can result from hydrogen 25 bonding.

In yet a further embodiment, the association of the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent and the oppositely charged lipid can result from a combination of ionic complexation and hydrogen bonding.

The particles suitable for use in the method can comprise a therapeutic, 30 prophylactic or diagnostic agent in association with a charged lipid having a charge

opposite to that of the agent. The charges are opposite upon association, prior to administration. In a preferred embodiment, the charges of the agent and lipid upon association, prior to administration, are those which the agent and lipid possess at pulmonary pH.

5 For example, the particles suitable for pulmonary delivery can comprise a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent which possesses an overall net negative charge, in association with a lipid which possesses an overall net positive charge. For example, the agent can be insulin which has an overall net charge which is negative and the lipid can be 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphatidylcholine
10 (DPePC).

Alternatively, the particles suitable for pulmonary delivery can comprise a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent which possesses an overall net positive charge in association with a lipid which possesses an overall net negative charge. For example, the agent can be albuterol which possesses an overall positive charge
15 and the lipid can be 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)](DPPG) which possesses an overall net negative charge.

Further, the particles suitable for pulmonary delivery can comprise a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent which has an overall net charge which can be modified by adjusting the pH of a solution of the agent, prior to association
20 with the lipid. For example, at a pH of about 7.4 insulin has an overall net charge which is negative. Therefore, insulin and a positively charged lipid can be associated at this pH prior to administration to prepare a particle having an agent in association with a charged lipid wherein the charged lipid has a charge opposite to that of the agent. However, the charges on insulin can also be modified, when in
25 solution, to possess an overall net charge which is positive by modifying the pH of the solution to be less than the pI of insulin (pI=5.5). As such, when insulin is in solution at a pH of about 4, for example, it will possess an overall net charge which is positive. As this is the case, the positively charged insulin can be associated with a negatively charged lipid, for example, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-
30 (1-glycerol)] (DSPG).

Modification of the charge of the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent prior to association with the charged lipid, can be accomplished with many agents, particularly, proteins. For example, charges on proteins can be modulated by spray drying feed solutions below or above the isoelectric points (pI) of the protein.

5 Charge modulation can also be accomplished for small molecules by spray drying feed solutions below or above the pKa of the molecule.

In a particular embodiment, the particles of the invention comprise more than one lipid, more than one bioactive agent or both. Also charged lipids can be combined with lipids without a net charge.

10 The particles, can further comprise a carboxylic acid which is distinct from the bioactive agent and lipid. In one embodiment, the carboxylic acid includes at least two carboxyl groups. Carboxylic acids, include the salts thereof as well as combinations of two or more carboxylic acids and/or salts thereof. In a preferred embodiment, the carboxylic acid is a hydrophilic carboxylic acid or salt thereof.

15 Citric acid and citrates, such as, for example sodium citrate, are preferred. Combinations or mixtures of carboxylic acids and/or their salts also can be employed.

The particles suitable for use in the invention can further comprise a multivalent salt or its ionic components. In a preferred embodiment, the salt is a 20 divalent salt. In another preferred embodiment, the salt is a salt of an alkaline-earth metal, such as, for example, calcium chloride. The particles of the invention can also include mixtures or combinations of salts and/or their ionic components.

The particles suitable for use in the invention can further comprise an amino acid. In a preferred embodiment the amino acid is hydrophobic.

25 The particles, also referred to herein as powder, can be in the form of a dry powder suitable for inhalation. The particles can have a tap density of less than about 0.4 g/cm³, preferably less than about 0.1 g/cm³. Further, the particles suitable for use in the invention can have a median geometric diameter of from about 5 micrometers to about 30 micrometers. In yet another embodiment, the particles 30 suitable for use in the invention have an aerodynamic diameter of from about 1 to about 5 micrometers.

The invention has numerous advantages. For example, particles suitable for inhalation can be designed to possess a sustained release profile. This sustained released profile provides for prolonged residence of the administered bioactive agent in the lung and increases the amount of time in which therapeutic levels of the agent 5 are present in the local environment or systemic circulation. The sustained release of agent provides a desirable alternative to injection therapy currently used for many therapeutic, diagnostic and prophylactic agent requiring sustained release of agent, such as insulin for the treatment of diabetes. In addition, the invention provides a 10 method of delivery to the pulmonary system wherein the high initial release of agent typically seen in inhalation therapy is reduced. Consequently, patient compliance and comfort can be increased by not only reducing frequency of dosing, but by providing a therapy which is more amenable to patients.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a graph showing the *in vivo* release profile of dry powder 15 formulations comprising insulin and either a lipid (DPPC) with no overall net a charge or lipid having an overall net charge opposite to that of insulin (DSePC and DPePC).

FIG. 2 is a graph of the *in vivo* release profile of dry powder formulations comprising insulin in combination with a lipid with no overall net charge (DPPC) or 20 insulin in combination with a charged lipid having an overall negative charge (DPPG) and spray dried with the active agent at either pH 4 or 7.4.

FIG. 3 is a graph showing the *in vivo* release profile of dry powder 25 formulation comprising estrone sulfate (-) and either a lipid with no overall net charge (DPPC) or a lipid having an overall charge opposite (DPePC, +) to that of the estrone sulfate.

FIG. 4 is a graph of percent of PenH above baseline versus time following administration of dry powder formulations of albuterol sulfate and lipid in animals which have been challenged repeatedly over time with methacholine given by nebulization.

The foregoing and other objects, features and advantages of the invention will be apparent from the following more particular description of preferred embodiments of the invention, as illustrated in the accompanying drawings. The drawings are not necessarily to scale, emphasis instead being placed upon illustrating the principles of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A description of preferred embodiments of the invention follows.

Therapeutic, prophylactic or diagnostic agents, can also be referred to herein as "bioactive agents", "medicaments" or "drugs".

10 The invention relates to a method for the pulmonary delivery of therapeutic, prophylactic and diagnostic agents comprising administering to the respiratory tract of a patient in need of treatment, prophylaxis or diagnosis an effective amount of particles comprising a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent or any combination thereof in association with a charged lipid, wherein the charged lipid 15 has an overall net charge which is opposite to that of the agent. The agent is released from the administered particles in a sustained fashion.

The particles of the invention release bioactive agent in a sustained fashion. As such, the particles possess sustained release properties. "Sustained release", as that term is used herein, refers to a release of active agent in which the period of 20 release of an effective level of agent is longer than that seen with the same bioactive agent which is not associated with an oppositely charged lipid, prior to administration. In addition, a sustained release also refers to a reduction in the burst of agent typically seen in first two hours following administration, and more preferably in the first hour, often referred to as the initial burst. In a preferred 25 embodiment, the sustained release is characterized by both the period of release being longer in addition to a decreased burst. For example, a sustained release of insulin can be a release showing elevated levels out to at least 4 hours post administration, such as about 6 hours or more.

"Pulmonary delivery", as that term is used herein refers to delivery to the 30 respiratory tract. The "respiratory tract", as defined herein, encompasses the upper

airways, including the oropharynx and larynx, followed by the lower airways, which include the trachea followed by bifurcations into the bronchi and bronchioi (e.g., terminal and respiratory). The upper and lower airways are called the conducting airways. The terminal bronchioi then divide into respiratory bronchioi which then 5 lead to the ultimate respiratory zone, namely, the alveoli, or deep lung. The deep lung, or alveoli, are typically the desired the target of inhaled therapeutic formulations for systemic drug delivery.

In one embodiment, the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent and the oppositely charged lipid can be in association primarily as a result of ionic bonding, 10 for example, ionic complexation. In another embodiment, the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent and the oppositely charged lipid can be in association primarily as a result of hydrogen bonding. It is understood that a combination of ionic and hydrogen bonding can contribute to the association of the bioactive and charged lipid.

15 Ionic bonding is bonding which occurs via charge/charge interactions between atoms or groups of atoms. Since opposite charges attract, the atoms in an ionic compound are held together by this attraction.

Hydrogen bonding refers to bonding wherein a hydrogen atom is shared 20 between two molecules. For example, a hydrogen atom covalently attached to an electronegative atom such as nitrogen, oxygen, sulfur or phosphorous shares its partial positive charge with a second electronegative atom, for example, nitrogen, oxygen, sulfur or phosphorous.

The particles suitable for use in the method can comprise a therapeutic, 25 prophylactic or diagnostic agent in association with a charged lipid having a charge opposite to that of the agent upon association, prior to administration. In a preferred embodiment, the charges possessed by the agent and lipid, upon association, are the same as the charges which the agent and lipid possess at pulmonary pH following administration.

For example, the particles suitable for pulmonary delivery can comprise a 30 therapeutic, prophylactic or diagnostic agent which possesses an overall net negative charge in association with a lipid which possesses an overall net positive charge.

For example, the agent can be insulin and the lipid can be an ethylphosphatidyl-choline, such as 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphatidylcholine (DPePC).

Alternatively, the particles suitable for pulmonary delivery can comprise a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent which possesses an overall net positive 5 charge in association with a lipid which possesses an overall net negative charge, preferably in the pulmonary pH range. For example, the agent can be albuterol sulfate which possesses an overall positive charge and the lipid can be 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DPPG) which possesses an overall net negative charge.

10 Further, the particles suitable for pulmonary delivery can comprise a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent which has an overall net charge which can be modified by adjusting the pH of a solution of the agent prior to association with the charged lipid. For example, at a pH of about 7.4 insulin has an overall net charge which is negative. Therefore, insulin and a positively charged lipid can be 15 associated at this pH, prior to administration, to prepare a particle having an bioactive agent in association with a charged lipid wherein the charged lipid has a charge opposite to that of the agent upon association. However, insulin can also be modified when in solution to possess an overall net charge which is positive by modifying the pH of the solution to be less than the pI of insulin (pI=5.5). As such, 20 when insulin is in solution at a pH of 4, for example, it will possess an overall net charge which is positive. As this is the case, the positively charged insulin can be associated with a negatively charged lipid, for example, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DSPG). Modification of the charge of the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent is applicable to many agents, particularly, proteins.

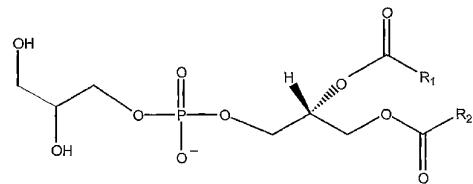
25 "Pulmonary pH range", as that term is used herein, refers to the pH range which can be encountered in the lung of a patient. Typically, in humans, this range of pH is from about 6.4 to about 7.0, such as from 6.4 to about 6.7. pH values of the airway lining fluid (ALF) have been reported in "Comparative Biology of the Normal Lung", CRC Press, (1991) by R.A. Parent and range from 6.44 to 6.74)

30 "Charged lipid" as that term is used herein, refers to lipids which are capable of possessing an overall net charge. The charge on the lipid can be negative or

positive. The lipid can be chosen to have a charge opposite to that of the active agent when the lipid and active agent are associated. In a preferred embodiment the charged lipid is a charged phospholipid. Preferably, the phospholipid is endogenous to the lung or can be metabolized upon administration to a lung endogenous 5 phospholipid. Combinations of charged lipids can be used. The combination of charged lipid also has an overall net charge opposite to that of the bioactive agent upon association.

The charged phospholipid can be a negatively charged lipid such as, a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] and a 1,2-diacyl-*sn*-glycerol-3-10 phosphate.

The 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] phospholipids can be represented by the Formula I:



wherein R₁ and R₂ are independently aliphatic groups having from about 3 to about 15 24 carbon atoms, preferably from about 10 to about 20 carbon atoms.

Aliphatic group as that term is used herein in Formulas I-VI refers to substituted or unsubstituted straight chained, branched or cyclic C₃-C₂₄ hydrocarbons which can be completely saturated, which can contain one or more heteroatoms such as nitrogen, oxygen or sulfur and/or which can contain one or more units of 20 unsaturation.

Suitable substituents on an aliphatic group include -OH, halogen (-Br, -Cl, -I and -F), -O(aliphatic, substituted), -CN, -NO₂, -COOH, -NH₂, -NH(aliphatic group, substituted aliphatic), -N(aliphatic group, substituted aliphatic group)₂, -COO

WO 02/053190

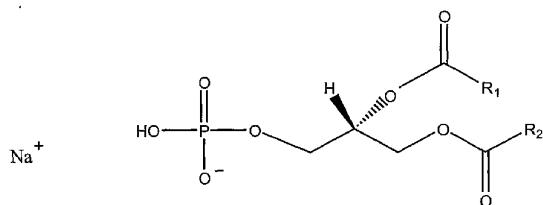
PCT/US01/48956

-10-

(aliphatic group, substituted aliphatic group), -CONH₂, -CONH(aliphatic, substituted aliphatic group), -SH, -S(aliphatic, substituted aliphatic group) and -NH-C(=NH)-NH₂. A substituted aliphatic group can also have a benzyl, substituted benzyl, aryl (e.g., phenyl, naphthyl or pyridyl) or substituted aryl group as a substituent. A substituted aliphatic can have one or more substituents.

5 Specific examples of this type of negatively charged phospholipid include, but are not limited to, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DSPG), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DMPG), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DPPG), 1,2-dilauroyl-*sn*-10 glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DLPG), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DOPG).

The 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphate phospholipids can be represented by the Formula II:



15 R₁ and R₂ are independently an aliphatic group having from about 3 to about 24 carbon atoms, preferably from about 10 to about 20 carbon atoms.

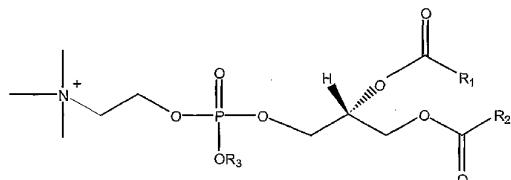
Specific examples of this type of phospholipid include, but are not limited to, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DMPA), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DPPA), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DOPA), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DSPA), and 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DLPA).

20 The charged lipid can be a positively charged lipid such as a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphocholine, such as 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-ethylphospho-

choline and a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphoalkanolamine, such as 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphoethanolamine.

The 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphocholine phospholipids can be represented by the Formula III:

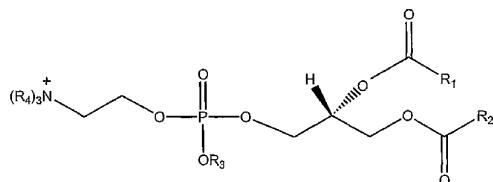
5



wherein R₁ and R₂ are independently an aliphatic group having from about 3 to about 24 carbon atoms, preferably from about 10 to about 20 carbon atoms. R₃ is an aliphatic group having from about 1 to about 24 carbons, for example, methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl and the like.

10 Specific examples of this type of positively charged phospholipid include, but are not limited to, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DPePC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DMcPC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DSePC), 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (DLcPC), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DOePC).

15 The 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphoalkanolamine phospholipids can be represented by the Formula IV:



WO 02/053190

PCT/US01/48956

-12-

wherein R₁ and R₂ are independently an aliphatic group having from about 3 to about 24 carbon atoms, preferably from about 10 to about 20 carbon atoms. R₃ is an aliphatic group having from about 1 to about 24 carbons, for example, methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl and the like. R₄ is independently hydrogen, 5 or an aliphatic group having from about 1 to about 6 carbon atoms.

Specific examples of this type of positively charged phospholipid include, but are not limited to, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethylphospholamine(DPePE), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphoethanolamine(DMePE), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphoethanolamine(DSePE), 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-10 ethylphosphoethanolamine (DLePE), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphoethanolamine (DOePE).

Other charged lipids suitable for use in the invention include those described in U.S. Patent No. 5,466,841 to Horrobin *et al.* issued on November 14, 1995, U. S. Patent Nos. 5,698,721 and 5,902,802 to Heath issued December 16, 1997 and May 15 11, 1999, respectively, and U.S. Patent No. 4,480,041 to Myles *et al.* issued October 30, 1984, the entire contents of all of which are incorporated herein by reference.

The charged lipid and the therapeutic, prophylactic or diagnostic agent can be present in the particles of the invention at a charge ratio of lipid to active of from about 0.25:1 or more, preferably from about 0.25:1 to about 1:0.25, for example, 20 about 0.5:1 to about 1:0.5. Preferably the charge ratio is about 1:1. When an excess of charge is present, it is preferred that the excess charge is contributed by the lipid.

A suitable charge ratio can be determined as follows. First, the number of charges present on both the bioactive agent and lipid, at the conditions under which association of the two will occur, prior to administration, should be determined. 25 Next, the equivalent weight of both the bioactive agent and lipid should be determined. This can be carried out following the example below employing insulin as the bioactive agent and DPePC as the charged lipid at a pH of about 7.4.

	Molecular Weight of Insulin:	5,800 g/mole
	Number of Negative Charges on Insulin:	6 equivalent
30	Equivalent Weight Per Charge:	5,800 x 1/6 = 967 g

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-13-

Molecular Weight of DPePC: 763 g/mole
Number of Negative Charges on DPePC: 1 equivalent
Equivalent Weight Per Charge: $763 \times 1/1 = 763$ g

Therefore, to obtain for example, a 1:1 charge ratio of DPePC to insulin

5 763 g DPePC is associated with 967 g insulin

OR

1 g DPePC is associated with 1.27 ($967/763 = 1.27$) g insulin.

Alternatively,

967 g insulin is associated with 763 g DPePC

10 OR

1 g insulin is associated with 0.79 ($763/967 = 0.79$) g DPePC.

In molar terms,

1 mole DPePC is associated with 1/6 mole insulin

OR

15 1 mole insulin is associated with 6 moles DPePC.

This analysis can be used to determine the amount of lipid and active agent needed for any ratio desired and any combination of bioactive agent and lipid.

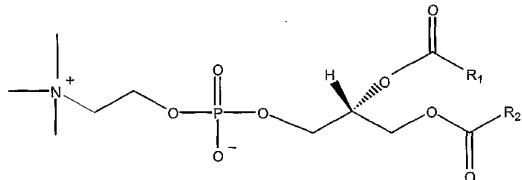
The charged lipid can be present in the particles in an amount ranging from about 1 to about 99 % by weight. Preferably, the charged lipid is present in the 20 particles in an amount ranging from about 10% to about 90% by weight.

The particles of the invention can also comprise phospholipids, which are zwitterionic and therefore do not possess an overall net charge. Such lipids, can assist in providing particles with the proper characteristics for inhalation. Such phospholipids suitable for use in the invention include, but are not limited to, a 1,2-25 diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine. These lipids can preferably be present in the particles in an amount ranging from about 10% to about 90% by weight. Preferably, these lipids

can be present in the particles in an amount ranging from about 50% to about 80% by weight.

The 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine phospholipids can be represented by Formula V:

5

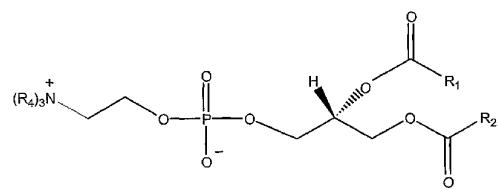


R₁ and R₂ are independently an aliphatic group having from about 3 to about 24 carbon atoms, preferably from about 10 to about 20 carbon atoms.

Specific examples of 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine phospholipids include, but are not limited to, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine 10 (DPPC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1,2-dilauroyl-*sn*-3-glycero-phosphocholine (DLPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC),

The 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoalkanolamine phospholipids can be represented by Formula VI:

15



wherein R₁ and R₂ are independently an aliphatic group having from about 3 to about 24 carbon atoms, preferably, from about 10 to about 20 carbon atoms and R₄ is independently hydrogen or an aliphatic group having from about 1 to about 6 carbon atoms.

5 Specific examples of this type of phospholipid include, but are not limited to, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethanolamine(DPPE), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(DMPE), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(DSPE), 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DLPE), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE).

10 Therapeutic, prophylactic or diagnostic agents, can also be referred to herein as "bioactive agents", "medicaments" or "drugs". It is understood that one or more bioactive agents can be present in the particles of the invention. Hydrophilic as well as hydrophobic agents can be used. The agent must be capable of possessing an overall net charge. The amount of bioactive agent present in the particles of the 15 invention can be from about 0.1 weight % to about 95 weight %, for example, from about 5 to about 75%, such as from about 10 to about 50%. Particles in which the drug is distributed throughout a particle are preferred.

20 Suitable bioactive agents include agents which can act locally, systemically or a combination thereof. The term "bioactive agent," as used herein, is an agent, or its pharmaceutically acceptable salt, which when released *in vivo*, possesses the 25 desired biological activity, for example therapeutic, diagnostic and/or prophylactic properties *in vivo*.

25 Examples of bioactive agent include, but are not limited to, synthetic inorganic and organic compounds, proteins and peptides, polysaccharides and other sugars, lipids, and DNA and RNA nucleic acid sequences having therapeutic, prophylactic or diagnostic activities. Agents with a wide range of molecular weight can be used, for example, between 100 and 500,000 grams or more per mole.

30 The agents can have a variety of biological activities, such as vasoactive agents, neuroactive agents, hormones, anticoagulants, immunomodulating agents, cytotoxic agents, prophylactic agents, antibiotics, antivirals, antisense, antigens, antineoplastic agents and antibodies.

Proteins, include complete proteins, muteins and active fragments thereof, such as insulin, immunoglobulins, antibodies, cytokines (e.g., lymphokines, monokines, chemokines), interleukins, interferons (β -IFN, α -IFN and γ -IFN), erythropoietin, nucleases, tumor necrosis factor, colony stimulating factors, enzymes 5 (e.g. superoxide dismutase, tissue plasminogen activator), tumor suppressors, blood proteins, hormones and hormone analogs (e.g., growth hormone, adrenocorticotrophic hormone and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)), vaccines (e.g., tumoral, bacterial and viral antigens), antigens, blood coagulation factors; growth factors; granulocyte colony-stimulating factor ("G-CSF"); peptides include protein 10 inhibitors, protein antagonists, and protein agonists, calcitonin; nucleic acids include, for example, antisense molecules, oligonucleotides, and ribozymes. Polysaccharides, such as heparin, can also be administered.

Bioactive agent for local delivery within the lung, include such as agents as those for the treatment of asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 15 emphysema, or cystic fibrosis. For example, genes for the treatment of diseases such as cystic fibrosis can be administered, as can beta agonists steroids, anticholinergics, and leukotriene modifiers for asthma.

Other specific bioactive agents include, estrone sulfate, albuterol sulfate, parathyroid hormone-related peptide, somatostatin, nicotine, clonidine, salicylate, 20 cromolyn sodium, salmeterol, formoterol, L-dopa, Carbidopa or a combination thereof, gabapentin, clorazepate, carbamazepine and diazepam.

Nucleic acid sequences include genes, antisense molecules which can, for instance, bind to complementary DNA to inhibit transcription, and ribozymes. The particles can include any of a variety of diagnostic agents to locally or 25 systemically deliver the agents following administration to a patient. For example, imaging agents which include commercially available agents used in positron emission tomography (PET), computer assisted tomography (CAT), single photon emission computerized tomography, x-ray, fluoroscopy, and magnetic resonance imaging (MRI) can be employed.

30 Examples of suitable materials for use as contrast agents in MRI include the gadolinium chelates currently available, such as diethylene triamine pentacetic acid

(DTPA) and gadopentotate dimeglumine, as well as iron, magnesium, manganese, copper and chromium.

Examples of materials useful for CAT and x-rays include iodine based materials for intravenous administration, such as ionic monomers typified by 5 diatrizoate and iothalamate and ionic dimers, for example, ioxagalte.

Diagnostic agents can be detected using standard techniques available in the art and commercially available equipment.

The particles can further comprise a carboxylic acid which is distinct from the agent and lipid. In one embodiment, the carboxylic acid includes at least two 10 carboxyl groups. Carboxylic acids, include the salts thereof as well as combinations of two or more carboxylic acids and/or salts thereof. In a preferred embodiment, the carboxylic acid is a hydrophilic carboxylic acid or salt thereof. Suitable carboxylic acids include but are not limited to hydroxydicarboxylic acids, hydroxytricarboxylic acids and the like. Citric acid and citrates, such as, for example sodium citrate, are 15 preferred. Combinations or mixtures of carboxylic acids and/or their salts also can be employed.

The carboxylic acid can be present in the particles in an amount ranging from about 0 to about 80% weight. Preferably, the carboxylic acid can be present in the particles in an amount of about 10 to about 20%.

20 The particles suitable for use in the invention can further comprise a multivalent salt or its ionic components. As used herein, a "multivalent" salt refers to salts having a ionic component with a valency greater than one. For example, divalent salts. In a preferred embodiment, the salt is a divalent salt. In another preferred embodiment, the salt is a salt of an alkaline-earth metal, such as, for 25 example, calcium chloride. The particles of the invention can also include mixtures or combinations of salts and/or their ionic components.

The salt or its ionic components are present in the particles in an amount ranging from about 0 to about 40% weight.

30 The particles suitable for use in the invention can further comprise an amino acid. In a preferred embodiment the amino acid is hydrophobic. Suitable naturally occurring hydrophobic amino acids, include but are not limited to, leucine,

isoleucine, alanine, valine, phenylalanine, glycine and tryptophan. Combinations of hydrophobic amino acids can also be employed. Non-naturally occurring amino acids include, for example, beta-amino acids. Both D, L configurations and racemic mixtures of hydrophobic amino acids can be employed. Suitable hydrophobic amino acids can also include amino acid derivatives or analogs. As used herein, an amino acid analog includes the D or L configuration of an amino acid having the following formula: -NH-CHR-CO-, wherein R is an aliphatic group, a substituted aliphatic group, a benzyl group, a substituted benzyl group, an aromatic group or a substituted aromatic group and wherein R does not correspond to the side chain of a naturally-occurring amino acid. As used herein, aliphatic groups include straight chained, branched or cyclic C1-C8 hydrocarbons which are completely saturated, which contain one or two heteroatoms such as nitrogen, oxygen or sulfur and/or which contain one or more units of unsaturation. Aromatic or aryl groups include carbocyclic aromatic groups such as phenyl and naphthyl and heterocyclic aromatic groups such as imidazolyl, indolyl, thiienyl, furanyl, pyridyl, pyranyl, oxazolyl, benzothienyl, benzofuranyl, quinoliny, isoquinoliny and acridinyl. Suitable substituents on an aliphatic, aromatic or benzyl group include -OH, halogen (-Br, -Cl, -I and -F), -O(aliphatic, substituted aliphatic, benzyl, substituted benzyl, aryl or substituted aryl group), -CN, -NO₂, -COOH, -NH₂, -NH(aliphatic group, substituted aliphatic, benzyl, substituted benzyl, aryl or substituted aryl group), -N(aliphatic group, substituted aliphatic, benzyl, substituted benzyl, aryl or substituted aryl group), -COO(aliphatic group, substituted aliphatic, benzyl, substituted benzyl, aryl or substituted aryl group), -CONH₂, -CONH(aliphatic, substituted aliphatic group, benzyl, substituted benzyl, aryl or substituted aryl group), -SH, -S(aliphatic, substituted aliphatic, benzyl, substituted benzyl, aromatic or substituted aromatic group) and -NH-C(=NH)-NH₂. A substituted benzyl group can also have an aliphatic or substituted aliphatic group as a substituent. A substituted aliphatic group can also have a benzyl, substituted benzyl, aryl or substituted aryl group as a substituent. A substituted aliphatic, substituted aromatic or substituted benzyl group can have one or more substituents. Modifying

an amino acid substituent can increase, for example, the hydrophilicity or hydrophobicity of natural amino acids which are hydrophilic.

A number of the suitable amino acids, amino acids analogs and salts thereof can be obtained commercially. Others can be synthesized by methods known in the art. Synthetic techniques are described, for example, in Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991.

Hydrophobicity is generally defined with respect to the partition of an amino acid between a nonpolar solvent and water. Hydrophobic amino acids are those acids which show a preference for the nonpolar solvent. Relative hydrophobicity of amino acids can be expressed on a hydrophobicity scale on which glycine has the value 0.5. On such a scale, amino acids which have a preference for water have values below 0.5 and those that have a preference for nonpolar solvents have a value above 0.5. As used herein, the term hydrophobic amino acid refers to an amino acid that, on the hydrophobicity scale has a value greater or equal to 0.5, in other words, has a tendency to partition in the nonpolar acid which is at least equal to that of glycine.

Examples of amino acids which can be employed include, but are not limited to: glycine, proline, alanine, cysteine, methionine, valine, leucine, tyrosine, 20 isoleucine, phenylalanine, tryptophan. Preferred hydrophobic amino acids include leucine, isoleucine, alanine, valine, phenylalanine, glycine and tryptophan. Combinations of hydrophobic amino acids can also be employed. Furthermore, combinations of hydrophobic and hydrophilic (preferentially partitioning in water) amino acids, where the overall combination is hydrophobic, can also be employed.

25 Combinations of one or more amino acids can also be employed. The amino acid can be present in the particles of the invention in an amount from about 0% to about 60 weight %. Preferably, the amino acid can be present in the particles in an amount ranging from about 5 to about 30 weight %. The salt of a hydrophobic amino acid can be present in the particles of the invention in an amount 30 of from about 0% to about 60 weight %. Preferably, the amino acid salt is present in the particles in an amount ranging from about 5 to about 30 weight %. Methods of

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-20-

forming and delivering particles which include an amino acid are described in U.S. Patent Application No 09/382,959, filed on August 25, 1999, entitled Use of Simple Amino Acids to Form Porous Particles During Spray Drying the entire teaching of which is incorporated herein by reference.

5 In a further embodiment, the particles can also include other materials such as, for example, buffer salts, dextran, polysaccharides, lactose, trehalose, cyclodextrins, proteins, peptides, polypeptides, fatty acids, fatty acid esters, inorganic compounds, phosphates.

In one embodiment of the invention, the particles can further comprise
10 polymers. The use of polymers can further prolong release. Biocompatible or biodegradable polymers are preferred. Such polymers are described, for example, in U.S. Patent No. 5,874,064, issued on February 23, 1999 to Edwards *et al.*, the teachings of which are incorporated herein by reference in their entirety.

In yet another embodiment, the particles include a surfactant other than one
15 of the charged lipids described above. As used herein, the term "surfactant" refers to any agent which preferentially absorbs to an interface between two immiscible phases, such as the interface between water and an organic polymer solution, a water/air interface or organic solvent/air interface. Surfactants generally possess a hydrophilic moiety and a lipophilic moiety, such that, upon absorbing to
20 microparticles, they tend to present moieties to the external environment that do not attract similarly-coated particles, thus reducing particle agglomeration. Surfactants may also promote absorption of a therapeutic or diagnostic agent and increase bioavailability of the agent.

Suitable surfactants which can be employed in fabricating the particles of the
25 invention include but are not limited to hexadecanol; fatty alcohols such as polyethylene glycol (PEG); polyoxyethylene-9-lauryl ether; a surface active fatty acid, such as palmitic acid or oleic acid; glycocholate; surfactin; a poloxamer; a sorbitan fatty acid ester such as sorbitan trioleate (Span 85); and tyloxapol.

The surfactant can be present in the particles in an amount ranging from
30 about 0 to about 60 weight %. Preferably, it can be present in the particles in an amount ranging from about 5 to about 50 weight %.

It is understood that when the particles includes a carboxylic acid, a multivalent salt, an amino acid, a surfactant or any combination thereof that interaction between these components of the particle and the charged lipid can occur.

5 The particles, also referred to herein as powder, can be in the form of a dry powder suitable for inhalation. In a particular embodiment, the particles can have a tap density of less than about 0.4 g/cm³. Particles which have a tap density of less than about 0.4 g/cm³ are referred to herein as "aerodynamically light particles". More preferred are particles having a tap density less than about 0.1 g/cm³.

10 Aerodynamically light particles have a preferred size, e.g., a volume median geometric diameter (VMGD) of at least about 5 microns (μ m). In one embodiment, the VMGD is from about 5 μ m to about 30 μ m. In another embodiment of the invention, the particles have a VMGD ranging from about 9 μ m to about 30 μ m. In other embodiments, the particles have a median diameter, mass median diameter 15 (MMD), a mass median envelope diameter (MMED) or a mass median geometric diameter (MMGD) of at least 5 μ m, for example from about 5 μ m to about 30 μ m.

Aerodynamically light particles preferably have "mass median aerodynamic diameter" (MMAD), also referred to herein as "aerodynamic diameter", between about 1 μ m and about 5 μ m. In one embodiment of the invention, the MMAD is 20 between about 1 μ m and about 3 μ m. In another embodiment, the MMAD is between about 3 μ m and about 5 μ m.

In another embodiment of the invention, the particles have an envelope mass density, also referred to herein as "mass density" of less than about 0.4 g/cm³. The envelope mass density of an isotropic particle is defined as the mass of the particle 25 divided by the minimum sphere envelope volume within which it can be enclosed.

Tap density can be measured by using instruments known to those skilled in the art such as the Dual Platform Microprocessor Controlled Tap Density Tester (Vankel, NC) or a GeoPyc™ instrument (Micrometrics Instrument Corp., Norcross, GA 30093). Tap density is a standard measure of the envelope mass density. Tap 30 density can be determined using the method of USP Bulk Density and Tapped Density, United States Pharmacopéia convention, Rockville, MD, 10th Supplement,

4950-4951, 1999. Features which can contribute to low tap density include irregular surface texture and porous structure.

The diameter of the particles, for example, their VMGD, can be measured using an electrical zone sensing instrument such as a Multisizer IIe, (Coulter 5 Electronic, Luton, Beds, England), or a laser diffraction instrument (for example Helos, manufactured by Sympatec, Princeton, NJ). Other instruments for measuring particle diameter are well known in the art. The diameter of particles in a sample will range depending upon factors such as particle composition and methods of synthesis. The distribution of size of particles in a sample can be selected to permit 10 optimal deposition within targeted sites within the respiratory tract.

Experimentally, aerodynamic diameter can be determined by employing a gravitational settling method, whereby the time for an ensemble of particles to settle a certain distance is used to infer directly the aerodynamic diameter of the particles. An indirect method for measuring the mass median aerodynamic diameter (MMAD) 15 is the multi-stage liquid impinger (MSLI).

The aerodynamic diameter, d_{aer} , can be calculated from the equation:

$$d_{aer} = d_g \sqrt{\rho_{tap}}$$

where d_g is the geometric diameter, for example the MMGD and ρ is the powder density.

20 Particles which have a tap density less than about 0.4 g/cm³, median diameters of at least about 5 μ m, and an aerodynamic diameter of between about 1 μ m and about 5 μ m, preferably between about 1 μ m and about 3 μ m, are more capable of escaping inertial and gravitational deposition in the oropharyngeal region, and are targeted to the airways or the deep lung. The use of larger, more porous 25 particles is advantageous since they are able to aerosolize more efficiently than smaller, denser aerosol particles such as those currently used for inhalation therapies.

In comparison to smaller particles the larger aerodynamically light particles, preferably having a VMGD of at least about 5 μ m, also can potentially more successfully avoid phagocytic engulfment by alveolar macrophages and clearance

from the lungs, due to size exclusion of the particles from the phagocytes' cytosolic space. Phagocytosis of particles by alveolar macrophages diminishes precipitously as particle diameter increases beyond about 3 μm . Kawaguchi, H., *et al.*, *Biomaterials* 7: 61-66 (1986); Krenis, L.J. and Strauss, B., *Proc. Soc. Exp. Med.*, 5 107: 748-750 (1961); and Rudt, S. and Muller, R.H., *J. Contr. Rel.*, 22: 263-272 (1992). For particles of statistically isotropic shape, such as spheres with rough surfaces, the particle envelope volume is approximately equivalent to the volume of cytosolic space required within a macrophage for complete particle phagocytosis.

The particles may be fabricated with the appropriate material, surface 10 roughness, diameter and tap density for localized delivery to selected regions of the respiratory tract such as the deep lung or upper or central airways. For example, higher density or larger particles may be used for upper airway delivery, or a mixture of varying sized particles in a sample, provided with the same or different therapeutic agent may be administered to target different regions of the lung in one 15 administration. Particles having an aerodynamic diameter ranging from about 3 to about 5 μm are preferred for delivery to the central and upper airways. Particles having an aerodynamic diameter ranging from about 1 to about 3 μm are preferred for delivery to the deep lung.

Inertial impaction and gravitational settling of aerosols are predominant 20 deposition mechanisms in the airways and acini of the lungs during normal breathing conditions. Edwards, D.A., *J. Aerosol Sci.*, 26: 293-317 (1995). The importance of both deposition mechanisms increases in proportion to the mass of aerosols and not to particle (or envelope) volume. Since the site of aerosol deposition in the lungs is determined by the mass of the aerosol (at least for particles of mean aerodynamic 25 diameter greater than approximately 1 μm), diminishing the tap density by increasing particle surface irregularities and particle porosity permits the delivery of larger particle envelope volumes into the lungs, all other physical parameters being equal.

The low tap density particles have a small aerodynamic diameter in 30 comparison to the actual envelope sphere diameter. The aerodynamic diameter, d_{aer} , is related to the envelope sphere diameter, d (Gonda, I., "Physico-chemical

principles in aerosol delivery," in *Topics in Pharmaceutical Sciences 1991* (eds. D.J.A. Crommelin and K.K. Midha), pp. 95-117, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1992), by the formula:

$$d_{\text{aer}} = d\sqrt{\rho}$$

5 where the envelope mass ρ is in units of g/cm³. Maximal deposition of monodispersed aerosol particles in the alveolar region of the human lung (~60%) occurs for an aerodynamic diameter of approximately $d_{\text{aer}}=3 \mu\text{m}$. Heyder, J. *et al.*, *J. Aerosol Sci.*, 17: 811-825 (1986). Due to their small envelope mass density, the actual diameter d of aerodynamically light particles comprising a monodisperse 10 inhaled powder that will exhibit maximum deep-lung deposition is:

$$d = 3/\sqrt{\rho} \mu\text{m} \text{ (where } \rho < 1 \text{ g/cm}^3\text{);}$$

where d is always greater than 3 μm . For example, aerodynamically light particles that display an envelope mass density, $\rho = 0.1 \text{ g/cm}^3$, will exhibit a maximum 15 deposition for particles having envelope diameters as large as 9.5 μm . The increased particle size diminishes interparticle adhesion forces. Visser, J., *Powder Technology*, 58: 1-10. Thus, large particle size increases efficiency of aerosolization to the deep lung for particles of low envelope mass density, in addition to contributing to lower phagocytic losses.

20 The aerodynamic diameter can be calculated to provide for maximum deposition within the lungs, previously achieved by the use of very small particles of less than about five microns in diameter, preferably between about one and about three microns, which are then subject to phagocytosis. Selection of particles which have a larger diameter, but which are sufficiently light (hence the characterization 25 "aerodynamically light"), results in an equivalent delivery to the lungs, but the larger size particles are not phagocytosed. Improved delivery can be obtained by using particles with a rough or uneven surface relative to those with a smooth surface.

Suitable particles can be fabricated or separated, for example by filtration or centrifugation, to provide a particle sample with a preselected size distribution. For example, greater than about 30%, 50%, 70%, or 80% of the particles in a sample can have a diameter within a selected range of at least about 5 μm . The selected range

5 within which a certain percentage of the particles must fall may be for example, between about 5 and about 30 μm , or optimally between about 5 and about 15 μm . In one preferred embodiment, at least a portion of the particles have a diameter between about 9 and about 11 μm . Optionally, the particle sample also can be fabricated wherein at least about 90%, or optionally about 95% or about 99%, have a

10 diameter within the selected range. The presence of the higher proportion of the aerodynamically light, larger diameter particles in the particle sample enhances the delivery of therapeutic or diagnostic agents incorporated therein to the deep lung. Large diameter particles generally mean particles having a median geometric diameter of at least about 5 μm .

15 The particles can be prepared by spray drying. For example, a spray drying mixture, also referred to herein as "feed solution" or "feed mixture", which includes the bioactive agent and one or more charged lipids having a charge opposite to that of the active agent upon association are fed to a spray dryer.

For example, when employing a protein active agent, the agent may be

20 dissolved in a buffer system above or below the pI of the agent. Specifically, insulin for example may be dissolved in an aqueous buffer system (e.g., citrate, phosphate, acetate, etc.) or in 0.01 N HCl. The pH of the resultant solution then can be adjusted to a desired value using an appropriate base solution (e.g., 1 N NaOH). In one preferred embodiment, the pH may be adjusted to about pH 7.4. At this pH

25 insulin molecules have a net negative charge (pI = 5.5). In another embodiment, the pH may be adjusted to about pH 4.0. At this pH insulin molecules have a net positive charge (pI = 5.5). Typically the cationic phospholipid is dissolved in an organic solvent or combination of solvents. The two solutions are then mixed together and the resulting mixture is spray dried.

30 For a small molecule active agent, the agent may be dissolved in a buffer system above or below the pKa of the ionizable group(s). Specifically, albuterol

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-26-

sulfate or estrone sulfate, for example, can be dissolved in an aqueous buffer system (e.g., citrate, phosphate, acetate, etc.) or in sterile water for irrigation. The pH of the resultant solution then can be adjusted to a desired value using an appropriate acid or base solution. If the pH is adjusted to about pH 3 to about pH 8 range, estrone sulfate will possess one negative charge per molecule and albuterol sulfate will possess one positive charge per molecule. Therefore, charge interaction can be engineered by the choice of an appropriate phospholipid. Typically the negatively charged or the positively charged phospholipid is dissolved in an organic solvent or combination of solvents and the two solutions are then mixed together and the 10 resulting mixture is spray dried.

Suitable organic solvents that can be present in the mixture being spray dried include, but are not limited to, alcohols for example, ethanol, methanol, propanol, isopropanol, butanols, and others. Other organic solvents include, but are not limited to, perfluorocarbons, dichloromethane, chloroform, ether, ethyl acetate, 15 methyl tert-butyl ether and others. Aqueous solvents that can be present in the feed mixture include water and buffered solutions. Both organic and aqueous solvents can be present in the spray-drying mixture fed to the spray dryer. In one embodiment, an ethanol water solvent is preferred with the ethanol:water ratio ranging from about 50:50 to about 90:10. The mixture can have a , acidic or 20 alkaline pH. Optionally, a pH buffer can be included. Preferably, the pH can range from about 3 to about 10.

The total amount of solvent or solvents being employed in the mixture being spray dried generally is greater than 99 weight percent. The amount of solids (drug, charged lipid and other ingredients) present in the mixture being spray dried 25 generally is less than about 1.0 weight percent. Preferably, the amount of solids in the mixture being spray dried ranges from about 0.05% to about 0.5% by weight.

Using a mixture which includes an organic and an aqueous solvent in the spray drying process allows for the combination of hydrophilic and hydrophobic components, while not requiring the formation of liposomes or other structures or 30 complexes to facilitate solubilization of the combination of such components within the particles.

Suitable spray-drying techniques are described, for example, by K. Masters in "Spray Drying Handbook", John Wiley & Sons, New York, 1984. Generally, during spray-drying, heat from a hot gas such as heated air or nitrogen is used to evaporate the solvent from droplets formed by atomizing a continuous liquid feed.

5 Other spray-drying techniques are well known to those skilled in the art. In a preferred embodiment, a rotary atomizer is employed. An example of a suitable spray dryer using rotary atomization includes the Mobile Minor spray dryer, manufactured by Niro, Denmark. The hot gas can be, for example, air, nitrogen or argon.

10 Preferably, the particles of the invention are obtained by spray drying using an inlet temperature between about 100° C and about 400° C and an outlet temperature between about 50°C and about 130°C.

The spray dried particles can be fabricated with a rough surface texture to reduce particle agglomeration and improve flowability of the powder. The spray-dried particle can be fabricated with features which enhance aerosolization via dry powder inhaler devices, and lead to lower deposition in the mouth, throat and inhaler device.

15 The particles of the invention can be employed in compositions suitable for drug delivery via the pulmonary system. For example, such compositions can include the particles and a pharmaceutically acceptable carrier for administration to a patient, preferably for administration via inhalation. The particles can be co-delivered with larger carrier particles, not including a therapeutic agent, the latter possessing mass median diameters for example in the range between about 50 μm and about 100 μm . The particles can be administered alone or in any appropriate

20 25 pharmaceutically acceptable carrier, such as a liquid, for example saline, or a powder, for administration to the respiratory system.

Particles including a medicament, for example one or more of the drugs listed above, are administered to the respiratory tract of a patient in need of treatment, prophylaxis or diagnosis. Administration of particles to the respiratory system can be by means such as known in the art. For example, particles are delivered from an inhalation device. In a preferred embodiment, particles are

administered via a dry powder inhaler (DPI). Metered-dose-inhalers (MDI), nebulizers or instillation techniques also can be employed.

Various suitable devices and methods of inhalation which can be used to administer particles to a patient's respiratory tract are known in the art. For example, suitable inhalers are described in U.S. Patent No. 4,069,819, issued August 5, 1976 to Valentini, *et al.*, U.S. Patent No. 4,995,385 issued February 26, 1991 to Valentini, *et al.*, and U.S. Patent No. 5,997,848 issued December 7, 1999 to Patton, *et al.* Various suitable devices and methods of inhalation which can be used to administer particles to a patient's respiratory tract are known in the art. For 10 example, suitable inhalers are described in U.S. Patent Nos. 4,995,385, and 4,069,819 issued to Valentini, *et al.*, U.S. Patent No. 5,997,848 issued to Patton. Other examples include, but are not limited to, the Spinhaler® (Fisons, Loughborough, U.K.), Rotahaler® (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Technology Park, North Carolina), FlowCaps® (Hovione, Loures, Portugal), 15 Inhalator® (Boehringer-Ingelheim, Germany), and the Aerolizer® (Novartis, Switzerland), the diskhaler (Glaxo-Wellcome, RTP, NC) and others, such as known to those skilled in the art. Preferably, the particles are administered as a dry powder via a dry powder inhaler.

Preferably, particles administered to the respiratory tract travel through the 20 upper airways (oropharynx and larynx), the lower airways which include the trachea followed by bifurcations into the bronchi and bronchioli and through the terminal bronchioli which in turn divide into respiratory bronchioli leading then to the ultimate respiratory zone, the alveoli or the deep lung. In a preferred embodiment of the invention, most of the mass of particles deposits in the deep lung. In another 25 embodiment of the invention, delivery is primarily to the central airways. Delivery to the upper airways can also be obtained.

In one embodiment of the invention, delivery to the pulmonary system of particles is in a single, breath-actuated step, as described in U.S. Patent Application, High Efficient Delivery of a Large Therapeutic Mass Aerosol, Application No. 30 09/591,307, filed June 9, 2000, which is incorporated herein by reference in its entirety. In another embodiment of the invention, at least 50% of the mass of the

particles stored in the inhaler receptacle is delivered to a subject's respiratory system in a single, breath-activated step. In a further embodiment, at least 5 milligrams and preferably at least 10 milligrams of a medicament is delivered by administering, in a single breath, to a subject's respiratory tract particles enclosed in the receptacle.

5 Amounts as high as 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 50 milligrams can be delivered.

As used herein, the term "effective amount" means the amount needed to achieve the desired therapeutic or diagnostic effect or efficacy. The actual effective amounts of drug can vary according to the specific drug or combination thereof being utilized, the particular composition formulated, the mode of administration, 10 and the age, weight, condition of the patient, and severity of the symptoms or condition being treated. Dosages for a particular patient can be determined by one of ordinary skill in the art using conventional considerations, (e.g. by means of an appropriate, conventional pharmacological protocol). For example, effective amounts of albuterol sulfate range from about 100 micrograms (μ g) to about 10 15 milligrams (mg).

Aerosol dosage, formulations and delivery systems also may be selected for a particular therapeutic application, as described, for example, in Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6: 273-313, 1990; and in Moren, 20 "Aerosol dosage forms and formulations," in: *Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy*, Moren, et al., Eds, Elsevier, Amsterdam, 1985.

Drug release rates can be described in terms of release constants. The first order release constant can be expressed using the following equations:

$$M_{(t)} = M_{(\infty)} * (1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

25 Where k is the first order release constant. $M_{(\infty)}$ is the total mass of drug in the drug delivery system, e.g. the dry powder, and $M_{(t)}$ is the amount of drug mass released from dry powders at time t .

Equations (1) may be expressed either in amount (i.e., mass) of drug released or concentration of drug released in a specified volume of release medium.

For example, Equation (1) may be expressed as:

$$C_{(t)} = C_{(\infty)} * (1 - e^{-kt}) \quad \text{or} \quad \text{Release}_{(t)} = \text{Release}_{(\infty)} * (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

Where k is the first order release constant. $C_{(\infty)}$ is the maximum theoretical concentration of drug in the release medium, and $C_{(t)}$ is the concentration of drug being released from dry powders to the release medium at time t .

Drug release rates in terms of first order release constant can be calculated using the following equations:

$$k = -\ln (M_{(\infty)} - M_{(0)}) / M_{(\infty)} / t \quad (3)$$

The release constants presented in Tables 4 and 8 employ equation (2).

10 As used herein, the term "a" or "an" refers to one or more.

The term "nominal dose" as used herein, refers to the total mass of bioactive agent which is present in the mass of particles targeted for administration and represents the maximum amount of bioactive agent available for administration.

EXEMPLIFICATION

15 MATERIALS

Humulin L (human insulin zinc suspension) was obtained from Lilly (100U/mL)

MASS MEDIAN AERODYNAMIC DIAMETER-MMAD (μm)

The mass median aerodynamic diameter was determined using an Aerosizer/Aerodisperser (Amherst Process Instrument, Amherst, MA).

20 Approximately 2 mg of powder formulation was introduced into the Aerodisperser and the aerodynamic size was determined by time of flight measurements.

VOLUME MEDIAN GEOMETRIC DIAMETER-VMGD (μm)

The volume median geometric diameter was measured using a RODOS dry powder disperser (Sympatec, Princeton, NJ) in conjunction with a HELOS laser diffractometer (Sympatec). Powder was introduced into the RODOS inlet and

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-31-

aerosolized by shear forces generated by a compressed air stream regulated at 2 bar. The aerosol cloud was subsequently drawn into the measuring zone of the HELOS, where it scattered light from a laser beam and produced a fraunhofer diffraction pattern used to infer the particle size distribution and determine the median value.

5 Where noted, the volume median geometric diameter was determined using a Coulter Multisizer II. Approximately 5-10 mg powder formulation was added to 50 mL isoton II solution until the coincidence of particles was between 5 and 8%.

DETERMINATION OF PLASMA INSULIN LEVELS

Quantification of insulin in rat plasma was performed using a human insulin 10 specific RIA kit (Linco Research, Inc., St. Charles, MO, catalog #HII-14K). The assay shows less than 0.1% cross reactivity with rat insulin. The assay kit procedure was modified to accommodate the low plasma volumes obtained from rats, and had a sensitivity of approximately 5 μ U/mL.

DETERMINATION OF ESTRONE -SULFATE PLASMA LEVELS

15 Quantification of estrone-sulfate in rat plasma was performed using an estrone-sulfate RIA kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, catalog #DSL-C5400). The assay kit procedure was modified to accommodate the low plasma volumes obtained from rats and to correct for influence of the human serum standard matrix, and had a sensitivity of approximately 0.025ng/mL.

20 PREPARATION OF INSULIN FORMULATIONS

The powder formulations listed in Table 1 were prepared as follows. Pre-spray drying solutions were prepared by dissolving the lipid in ethanol and the insulin, leucine, and/or sodium citrate in water. The ethanol solution was then mixed with the water solution at a ratio of 60/40 ethanol water. Final total solute 25 concentration of the solution used for spray drying varied from 1 g/L to 3 g/L. As an example, the DPPC/citrate/insulin (60/10/30) spray drying solution was prepared by dissolving 600 mg DPPC in 600 mL of ethanol, dissolving 100 mg of sodium citrate and 300 mg of insulin in 400 mL of water and then mixing the two solutions to yield

one liter of cosolvent with a total solute concentration of 1 g/L (w/v). Higher solute concentrations of 3 g/L (w/v) were prepared by dissolving three times more of each solute in the same volumes of ethanol and water.

The solution was then used to produce dry powders. A Nitro Atomizer 5 Portable Spray Dryer (Niro, Inc., Columbus, MD) was used. Compressed air with variable pressure (1 to 5 bar) ran a rotary atomizer (2,000 to 30,000 rpm) located above the dryer. Liquid feed with varying rate (20 to 66 mL/min) was pumped continuously by an electronic metering pump (LMI, Model #A151-192s) to the atomizer. Both the inlet and outlet temperatures were measured. The inlet 10 temperature was controlled manually; it could be varied between 100°C and 400°C and was established at 100, 110, 150, 175 or 200°C, with a limit of control of 5°C. The outlet temperature was determined by the inlet temperature and such factors as the gas and liquid feed rates (it varied between 50°C and 130°C). A container was tightly attached to the cyclone for collecting the powder product.

15 TABLE 1

POWDER FORMULATION NUMBER	COMPOSITION (%)						
	DPePC	DSePC	DPPG	DPPC	Leucine	Citrate	Insulin
1†				70	10		20
2		70			20		10
3		70			10		20
4	50						50
5‡			40		10		50
6	70				10		20
7	50						50
8	54.5						45.5
9	50				10		40
10	70				10		2
11	70				8	2	20

-33-

POWDER FORMULATION NUMBER	COMPOSITION (%)						
	DPePC	DSePC	DPPG	DPPC	Leucine	Citrate	Insulin
12 †				40		10	50
13 †				60		10	30
13A †				60		10	30
14 †			70		20		
15 †				70	20		10

† Lots # 4-xxx-201002 (#1), 4-XXX-201 065 (#12), 04-00024 (#13), 4-xxx-114068C

(#13A) and 4-xxx-167113 (#15), which contain the lipid DPPC, serve as negative controls.

10 †Powder formulation #5 was spray dried at pH=4.0.

‡Powder formulation #14 was spray dried at pH=7.4.

The physical characteristic of the insulin containing powders is set forth in

Table 2. The MMAD and VMGD were determined as detailed above.

TABLE 2

Formulations	Compositions (% weight basis)	MMAD (μ m) §	VMGD (μ m) ¶	Density (g/cc) ‡
Humulin R	—	—	—	—
Humulin L	—	—	—	—
Humulin U	—	—	—	—
1	DPPC/Leu/Insulin (Sigma) = 70/10/20	2.6	13.4	0.038
20 2	DSePC (Avanti)/Leu/Insulin (Sigma) = 70/10/20	3.3	10.0	0.109
3	DSePC (Avanti)/Leu/Insulin (Sigma) = 70/10/20	3.4	13.6	0.063
4	DPePC (Avanti)/Insulin (Sigma) = 50/50	3.2	15.3	0.044
5	DPPG/Sodium Citrate/Insulin = 40/10/50	3.9	11.6	0.113
6	DPePC (Genzyme)/Leu/Insulin (BioBras) = 70/10/20	2.6	9.1	0.082
25 7	DPePC (Avanti)/Insulin (BioBras)=50/50	2.8	11.4	0.060
8	DPePC (Genzyme)/Insulin (BioBras) = 54.5/45.5	2.8	12.6	0.049

Formulations	Compositions (% weight basis)	MMAD (μ m) §	VMGD (μ m) ¶	Density (g/cc) ‡
9	DPePC (Genzyme)/Leu/Insulin (BioBras) = 50/10/40	2.2	8.4	0.069
10	DPePC (Avanti)/Leu/Insulin (BioBras) = 70/10/20	3.7	15.5	0.057
11	DPePC (Avanti)/Leu/Sodium Citrate/Insulin (BioBras) = 70/8/2/20	2.6	15.3	0.029
12	DPPC/Sodium Citrate/Insulin = 40/10/50	3.5	11.6	0.091
5 13	DPPC/Insulin/Sodium Citrate = 60/30/10	1.9	8.0	0.056

† Used as a control formulation for comparison in either *in vitro* or *in vivo* studies.

§ Mass median aerodynamic diameter

¶ Volumetric median geometric diameter at 2 bar pressure

‡ Determined using $d_{sr} = d_g \sqrt{\rho}$

10 The data presented in Table 2 showing the physical characteristics of the formulations comprising insulin are predictive of the respirability of the formulations. That is, as discussed above the large geometric diameters, small aerodynamic diameters and low densities possessed by the powder prepared as described herein render the particles respirable.

15 IN VIVO INSULIN EXPERIMENTS

The following experiment was performed to determine the rate and extent of insulin absorption into the blood stream of rats following pulmonary administration of dry powder formulations comprising insulin to rats.

10 The nominal insulin dose administered was 100 μ g per rat. To achieve the 20 nominal doses, the total weight of powder administered per rat ranged from 0.2 mg to 1 mg, depending on percent composition of each powder. Male Sprague-Dawley rats were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY). At the time of use, the animals weighed 386 g in average (\pm 5 g S.E.M.). The animals were allowed free access to food and water.

25 The powders were delivered to the lungs using an insufflator device for rats (PennCentury, Philadelphia, PA). The powder amount was transferred into the insufflator sample chamber. The delivery tube of the insufflator was then inserted through the mouth into the trachea and advanced until the tip of the tube was about a

centimeter from the carina (first bifurcation). The volume of air used to deliver the powder from the insufflator sample chamber was 3 mL, delivered from a 10 mL syringe. In order to maximize powder delivery to the rat, the syringe was recharged and discharged two more times for a total of three air discharges per powder dose.

5 The injectable insulin formulation Humulin L was administered via subcutaneous injection, with an injection volume of 7.2 μ L for a nominal dose of 25 μ g insulin. Catheters were placed into the jugular veins of the rats the day prior to dosing. At sampling times, blood samples were drawn from the jugular vein catheters and immediately transferred to EDTA coated tubes. Sampling times were
10 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 hrs. after powder administration. In some cases an additional sampling time (12 hrs.) was included, and/or the 24 hr. time point omitted. After centrifugation, plasma was collected from the blood samples. Plasma samples were stored at 4°C if analysis was performed within 24 hours or at -75°C if analysis would occur later than 24 hours after collection. The plasma
15 insulin concentration was determined as described above.

Table 3 contains the insulin plasma levels quantified using the assay described above.

TABLE 3

Time (hrs)	PLASMA INSULIN CONCENTRATION (μ U/mL) \pm S.E.M.									
	1	2	3	4	5	6	13A	14	Hum- lin L	15
0	5.0 \pm 0.0	5.2 \pm 0.2	5.0 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0	5.3 \pm 0.2	5.7 \pm 0.7	5.0 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0	\pm 5.0 \pm 0.0
0.25	1256.4 \pm 144.3	61.6 \pm 22.5	98.5 \pm 25.3	518.2 \pm 179.2	240.8 \pm 67.6	206.8 \pm 35.1	1097.7 \pm 247.5	933.9 \pm 259.7	269.1 \pm 82.8	1101.9 \pm 258.9
0.5	1335.8 \pm 81.9	85.2 \pm 21.7	136.7 \pm 37.6	516.8 \pm 190.9	326.2 \pm 166.9	177.3 \pm 7.8	893.5 \pm 177.0	544.9 \pm 221.1	459.9 \pm 91.6	1005.4 \pm 263.9
1	859.0 \pm 199.4	85.4 \pm 17.6	173.0 \pm 28.8	497.0 \pm 93.9	157.3 \pm 52.5	170.5 \pm 32.9	582.5 \pm 286.3	229.6 \pm 74.4	764.7 \pm 178.8	387.5 \pm 143.9

PLASMA INSULIN CONCENTRATION (μ U/mL) \pm S.E.M.										
Time (hrs)	1	2	3	4	5	6	13A	14	Hum- lin L	15
2	648.6 \pm 171.1	94.8 \pm 25.0	158.3 \pm 39.1	496.5 \pm 104.9	167.7 \pm 70.5	182.2 \pm 75.0	208.5 \pm 78.3	129.8 \pm 45.7	204.4 \pm 36.7	343.8 \pm 95.3
4	277.6 \pm 86.8	52.5 \pm 9.1	98.0 \pm 24.3	343.8 \pm 66.7	144.8 \pm 43.8	170.2 \pm 56.3	34.9 \pm 5.4	41.9 \pm 28.7	32.1 \pm 22.6	170.6 \pm 79.9
6	104.0 \pm 43.1	33.0 \pm 10.7	58.7 \pm 4.1	251.2 \pm 68.4	95.7 \pm 27.3	159.5 \pm 43.4	12.3 \pm 2.4	9.0 \pm 2.9	11.1 \pm 7.5	15.4 \pm 4.5
8	54.4 \pm 34.7	30.2 \pm 8.1	42.5 \pm 17.8	63.2 \pm 16.5	52.5 \pm 13.7	94.8 \pm 23.5	5.2 \pm 0.1	5.0 \pm 0.0	5.5 \pm 2.1	6.5 \pm 0.6
12				17.2 \pm 6.5						
24				5.0 \pm 0.0	5.5 \pm 0.3					
n	5	5	6	6	6	6			8	

The *in vivo* release data of Table 3 show that powder formulations comprising insulin and positively charged lipids (DPePC and DSePC) have significantly lower initial burst of insulin than that seen with powder formulations comprising insulin and the lipid DPPC (Formulations 1 and 13) and sustained elevated levels at 6 to 8 hours. Figure 1 sets forth the release profile for insulin from Formulations 2, 3, 6 and 15.

In addition, the use of charged lipids having a charge which is the same of the active at neutral pH, can also be employed provided that the preparation of the spray dried formulation is conducted at a pH where the lipid and active agent possess overall charges which are opposite and are therefore capable of charge interaction. See, for example, Formulations 5 which employs the negatively charged lipid DPPG. Formulation 5 was prepared and spray dried at a pH of about 4.0. At this pH, DPPG is negatively charged and insulin becomes positively charged ($pI=5.5$) thereby providing for a charge interaction to occur. However, when the

DPPG and insulin are prepared and spray dried at pH=7.4 where both the DPPG and insulin possess an overall negative charge. Formulation 14, the proper environment for charge interaction to occur is not provided. It is noted that Formulation 5 showed a significantly lower initial burst of insulin (240.8 ±67.6 µU/mL) as 5 compared to Formulation 14 (933.9 ±259.7 µU/mL) with higher sustained levels at 6 to 8 hours post treatment. Figure 2 shows a comparison of the *in vivo* release profile for Formulations 5, 14 and 13A (lipid, DPPC).

IN VITRO ANALYSIS OF INSULIN-CONTAINING FORMULATIONS

The *in vitro* release of insulin containing dry powder formulations was 10 performed as described by Gietz *et al.* in *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45:259-264 (1998), with several modifications. Briefly, in 20 mL screw-capped glass scintillation vials about 10 mg of each dry powder formulation was mixed with 4 mL of warm (37°C) 1% agarose solution using polystyrene stir bars. The resulting mixture was then distributed in 1 mL aliquots to a set of five fresh 20 mL glass 15 scintillation vials. The dispersion of dry powder in agarose was cooled in an ambient temperature dessicator box protected from light to allow gelling. Release studies were conducted on an orbital shaker at about 37°C. At predetermined time points, previous release medium (1.5 mL) was removed and fresh release medium (1.5 mL) was added to each vial. Typical time points for these studies were 5 20 minutes, 1, 2, 4, 6 and 24 hours. The release medium used consisted of 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), 138 mM NaCl, 0.5% Pluronic (Synperonic PE/F68; to prevent insulin fibrillation in the release medium); pH 7.4. A Pierce (Rockford, IL) protein assay kit (See *Anal Biochem*, 150:76-85 (1985)) using known concentrations of insulin standard was used to monitor insulin 25 concentrations in the release medium.

Table 4 summarizes the *in vitro* release data and first order release constants for powder formulations of Table 1 comprising insulin.

TABLE 4

Powder Formulation Number	Cumulative % Insulin Released at 6 hr	Cumulative % Insulin Released at 24 hr	Maximum \ddagger Release at 24 hr (Cumulative %)	First Order \ddagger Release Constants (hr^{-1})
5				
Humulin R	92.67 \pm 0.36	94.88 \pm 0.22	91.6 \pm 5.42	1.0105 \pm 0.2602
Humulin L	19.43 \pm 0.41	29.71 \pm 0.28	36.7 \pm 2.56	0.0924 \pm 0.0183
Humulin U	5.17 \pm 0.18	12.65 \pm 0.43	46.6 \pm 27.0	0.0158 \pm 0.0127
	31.50 \pm 0.33	47.52 \pm 0.43	48.22 \pm 0.46	0.1749 \pm 0.0038
2	26.34 \pm 0.71	37.49 \pm 0.27	38.08 \pm 0.72	0.1837 \pm 0.0079
3	24.66 \pm 0.20	31.58 \pm 0.33	31.51 \pm 1.14	0.2457 \pm 0.0214
10	4	29.75 \pm 0.17	35.28 \pm 0.19	33.66 \pm 2.48
	5	17.04 \pm 0.71	24.71 \pm 0.81	0.4130 \pm 0.0878
	6	13.53 \pm 0.19	19.12 \pm 0.40	0.1767 \pm 0.0083
	7	13.97 \pm 0.27	17.81 \pm 0.46	0.1788 \pm 0.0101
	8	17.47 \pm 0.38	22.17 \pm 0.22	0.2419 \pm 0.0178
15	9	25.96 \pm 0.31	34.94 \pm 0.31	0.2734 \pm 0.0196
	10	34.33 \pm 0.51	47.21 \pm 0.47	0.2051 \pm 0.0120
	11	61.78 \pm 0.33	68.56 \pm 0.23	0.1994 \pm 0.0082
	12	78.47 \pm 0.40	85.75 \pm 0.63	0.5759 \pm 0.0988
	13			0.5232 \pm 0.0861

20 \ddagger Release $_{(t)}$ = Release $_{(inf)}$ \ast $(1 - e^{-kt})$ \ddagger Used as a control formulation.

The data presented in Table 4 show that for insulin containing powder formulations employing the positively charged lipid DPePC (Formulations 4 and 6-11) and DSePC (Formulations 2 and 3), first order release constants similar to that
25 observed with the slow release injectable insulin formulation, Humulin L, can be

achieved. Further, the first order release constants of these same formulations is significantly lower than that observed with the fast release injectable insulin formulation, Humulin R. As such, sustained release dry powder insulin formulations having varying compositions of positively charged lipid can be 5 formulated.

PREPARATION OF ESTRONE SULFATE-CONTAINING POWDER FORMULATIONS

The estrone sulfate powder formulations listed in Table were prepared as 10 follows. Pre-spray drying solutions were prepared by dissolving the lipin in ethanol and estrone sulfate and leucine in water. The ethanol solution was then mixed with the water solution at a ration 70/30 ethanol/water. Final total solute concentration of the solution used for spray drying varied from 1 g/L to 3 g/L. As an example, the DPcPC/leucine/estrone sulfate (76/20/4) spray drying solution was prepared by 15 dissolving 760 mg of DPcPC in 700 mL of ethanol, dissolving 200 mg of leucine and 40 mg of estrone sulfate in 300 mL of water and then mixing the two solutions to yield one liter of cosolvent with a total solute concentration of 1 g/L (w/v). Higher solute concentrations of, for example, 3 g/L (w/v) were prepared by dissolving three times more of each solute in the same volumes of ethanol and water 20 25

The mixture was spray dried following the procedure described above for the insulin containing powder formulation. During spray drying, the feed rate was about 50 mL/min, the inlet temperature ranged from about 110°C to about 120°C, and the outlet temperature was about 52°C.

The physical characteristic of the estrone sulfate containing powders is set forth in Table 5. The MMAD and VMGD were determined as detailed above.

TABLE 5

POWDER FORMULATION NUMBER	COMPOSITIONS (% WEIGHT BASIS)	MMAD (μ m) §	VMGD (μ m) ¶	DENSITY (g/cc) ‡
5 16	DPePC (Avanti)/Leucine/ Estrone Sulfate (sodium salt) = 76/20/4	5.9	16.0	0.136
	DPPC/Leucine/ Estrone Sulfate (sodium salt) = 76/20/4	3.7	12.7 #	0.085

†Used as a control for comparison for *in vivo* studies

§Mass median aerodynamic diameter

¶Volumetric median geometric diameter at 2 bar pressure

10 #Measured using Coulter Multisizer

‡Determined using $d_{\text{ter}} = d_s \sqrt{\rho}$

The data presented in Table 5 showing the physical characteristics of the formulations comprising estrone sulfate are predictive of the respirability of the formulations. That is, as discussed above the large geometric diameters, small 15 aerodynamic diameters and low densities possessed by the powder prepared as described herein render the particles respirable.

IN VIVO EXPERIMENTS-ESTRONE SULFATE CONTAINING POWDERS

The following experiment was performed to determine the rate and extent of estrone sulfate absorption into the blood stream of rats following pulmonary 20 administration of dry powder formulations comprising estrone sulfate.

The nominal estrone-sulfate dose administered was 40 μ g per rat, in 1mg of powder. Male Sprague-Dawley rats were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY). At the time of use, the animals weighed an average of 415 g (\pm 10 g S.E.M.). The animals were allowed free access to food and water.

25 The powders were delivered to the lungs using an insufflator device for rats (PennCentury, Philadelphia, PA). The powder amount was transferred into the insufflator sample chamber. The delivery tube of the insufflator was then inserted

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-41-

through the mouth into the trachea and advanced until the tip of the tube was about a centimeter from the carina (first bifurcation). The volume of air used to deliver the powder from the insufflator sample chamber was 3 mL, delivered from a 10 mL syringe. In order to maximize powder delivery to the rat, the syringe was recharged 5 and discharged two more times for a total of three air discharges per powder dose.

Catheters were placed into the jugular veins of the rats the day prior to dosing. At sampling times, blood samples were drawn from the jugular vein catheters and immediately transferred to EDTA coated tubes. Sampling times were 10 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 6 hours after powder administration. After centrifugation, plasma was collected from the blood samples. Plasma samples were stored at 4°C if analysis was performed within 24 hours or at -75°C if analysis would occur later than 24 hours after collection.

Table 6 contains the estrone sulfate plasma levels quantified using the assay described above.

15 TABLE 6

PLASMA ESTRONE-SULFATE CONCENTRATION (ng/mL) ± S.E.M.		
TIME (HRS)	FORMULATION 16	FORMULATION 17
0	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.05
0.25	12.07 ± 1.96	22.26 ± 8.96
0.5	18.88 ± 2.21	23.39 ± 12.72
1	12.20 ± 3.31	10.59 ± 0.61
2	4.65 ± 0.77	3.45 ± 0.63
4	4.02 ± 1.42	0.86 ± 0.10
6	1.49 ± 0.48	0.33 ± 0.12
n	4	3

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-42-

The results presented in Table 6 and depicted graphically in Figure 3, show that the formulation comprising DPePC (overall positive charge) and estrone sulfate (negative charge) exhibited sustained release of estrone sulfate when compared to the formulation employing the lipid DPPC (no overall net charge) and 5 estrone sulfate. Specifically, at six hours post administration, the plasma level of estrone sulfate for the DPePC containing formulation was 1.49 ± 0.48 ng/mL as compared to 0.33 ± 0.12 ng/mL for the DPPC containing formulation.

PREPARATION OF ALBUTEROL-CONTAINING POWDER FORMULATIONS

The albuterol sulfate powder formulations listed in Table 7, were prepared as 10 follows. Pre-spray drying solutions were prepared by dissolving the lipid in ethanol and albuterol sulfate and leucine in water. The ethanol solution was then mixed with the water solution at a ratio of 70/30 ethanol/water. Final total solute concentration of the solution used for spray drying varied from 1 g/L to 3 g/L. As an example, the DPPC/leucine/albuterol sulfate (76/16/8) spray drying solution was 15 prepared by dissolving 760 mg of DPPC in 700 mL of ethanol, dissolving 160 mg leucine and 870 mg of albuterol sulfate in 300 mL water and then mixing the two solutions to yield one liter of cosolvent with a total solute concentration of 1 g/L (w/v). Higher solute concentrations of 3 g/L (w/v) were prepared by dissolving three times more of each solute in the same volumes of ethanol and water. The solution 20 was spray-dried as described above for the insulin containing formulation. Specifically, the inlet temperature was from about 110°C to about 140°C, and the outlet temperature ranged from about 45-57°C.

The physical characteristics of the albuterol sulfate containing powders is set forth in Table 7. The MMAD and VMGD were determined as detailed above.

TABLE 7

POWDER FORMULATION NUMBER	COMPOSITIONS (% WEIGHT BASIS)	MMAD (μ m) §	VMGD (μ m) ¶	DENSITY (g/cc) ‡
5	18 DSPC/Leucine/ Albuterol Sulfate = 76/16/8	3.3	6.1	0.293
	19 DSPG/Leucine/ Albuterol Sulfate = 76/16/8	4.1	6.4	0.410
	20 DPPC/Leucine/ Albuterol Sulfate = 76/23/1	2.8	12.0	0.054
	21 DPPG/Leucine/ Albuterol Sulfate = 76/16/8	3.3	7.1	0.216

10 †Used as a control for comparison in either *in vitro* or *in vivo* studies

§Mass median aerodynamic diameter

¶Volumetric median geometric diameter at 2 bar pressure

‡Determined using $d_{air} = d_g \sqrt{\rho}$

15 The data presented in Table 7 showing the physical characteristics of the formulations comprising albuterol sulfate are predictive of the respirability of the formulations. That is, as discussed above the large geometric diameters, small aerodynamic diameters and low densities possessed by the formulations prepared as described herein render the formulations respirable.

IN VIVO TESTING OF ALBUTEROL SULFATE FORMULATIONS

20 A whole-body plethysmography method for evaluating pulmonary function in guinea pigs was used to assess the sustained effects of the albuterol sulfate formulations listed in Table 7.

The system used was the BUXCO whole-body unrestrained plethysmograph

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-44-

system with BUXCO XA pulmonary function software (BUXCO Electronics, Inc., Sharon, CT). The method was conducted as described by Silbaugh S.A. and Mauderly, J.L., in American Physiological Society, Vol. 84:1666-1669 (1984) and Chang, B.T., *et al* in Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol. 39(3):163-168 (1998). This method allows individual animals to be challenged repeatedly over time with methacholine given by nebulization. A calculated measurement of airway resistance based on flow parameters, the enhanced pause PenH was used as a marker for protection from methacholine-induced bronchoconstriction. Baseline pulmonary function (airway hyperresponsiveness) values were measured prior to any experimental treatment. Airway hyperresponsiveness was then assessed in response to saline and methacholine at various timepoints (2-3, 16 and 24 hours) following administration of albuterol-sulfate formulations. Average PenH is calculated from data collected between 4 and 9 minutes following challenge with saline or methacholine. The percent of baseline PenH at each timepoint is calculated for each experimental animal. Values from animals that received the same albuterol sulfate formulation were subsequently averaged to determine the mean group response (\pm standard error) at each timepoint.

The nominal dose of albuterol-sulfate administered was 50 μ g for the DPPG-based formulation (#21) and 25 μ g for the DPPC-based formulation (#20). To achieve those nominal doses, the total weights of powder administered were 0.625 mg and 2.5 mg, respectively.

Male Hartley guinea pigs were obtained from Elm Hill Breeding Labs (Chelmsford, MA). At the time of use, the animals weighed an average of 363 g (\pm 5 g S.E.M.). The animals were allowed free access to food and water. The powder amount was transferred into the insufflator sample chamber (insufflation device for guinea pigs, Penn Century, Philadelphia, PA). The delivery tube of the insufflator was inserted through the mouth into the trachea and advanced until the tip of the tube was about a centimeter from the carina (first bifurcation). The volume of the air used to deliver the powder from the insufflator sample chamber was 3 mL, delivered from a 10 mL syringe. In order to maximize powder delivery to the guinea pig, the syringe was recharged and discharged two more times for a total of three air

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-45-

discharges per powder dose. Methacholine challenges were performed at time points 2-3, 16 and 24 hours after administration.

Figure 4 shows that the formulation comprising DPPG (overall negative charge) and albuterol sulfate (overall positive charge) provided sustained protection 5 against methacholine-induced bronchoconstriction when compared to the formulation comprising DPPC (no overall net charge) and albuterol sulfate for at least 24 hours following administration.

In another experiment, as much as 200 µg of albuterol sulfate in a DPPC-based formulation did not provide prolonged protection against induced 10 bronchoconstriction.

IN VITRO RELEASE STUDIES-ALBUTEROL SULFATE

Controlled Release Studies of Albuterol Sulfate were conducted using the COSTART™ Brand Transwell Inserts, With Plates, Sterile. The plates were equipped 15 with 6 wells having an area of 4.7cm². The insert size was 24 mm, the pore size was 3.0 µm. A predetermined amount of the powder to be tested (approximately 10-15 mg) was placed into a HPMC Size #2 capsule. The capsule was then placed inside an inhaler and the powder was sprayed on the Transwell insert using an in-house vacuum system. Formulations were run in triplicate.

20 After spraying, the insert was placed inside the Transwell plate containing a volume of 1.8 mL of Phosphate Buffered Saline (pH = 7.4) which had previously been equilibrated at 37°C for 30 minutes. The Transwell plate was hermetically sealed in order to prevent evaporation of the buffer during the experiment.

The Transwell Experiment was carried out in an incubator at 37°C on an 25 orbital shaker at a speed of 100 min⁻¹. At specified time-points throughout the experiment, 1.8 mL of phosphate buffered saline was removed from the Transwell plate. The inserts were then placed into a new Transwell plate containing 1.8 mL of fresh phosphate buffered saline. Typical Transwell experiments are conducted for 4 hours. Samples are withdrawn after 5 min., 15, min., 30, min., 1 h, 1.5 h, 2 h, 3 h, 30 and 4 h.

The amount of albuterol sulfate in the PBS buffer sampled at predetermined *in vitro* release time points was quantitated using a RP-HPLC method with Phenomenex Luna 5 μ , C8(2), 250 x 4.6 mm column (Torrance, CA) and UV detection at 275 nm.

5 Table 8 summarizes the *in vitro* release data and first order release constants for the powder formulations of Table 7 comprising albuterol sulfate. The first order release constants for the powder formulation comprising DSPG (negatively charged) and albuterol sulfate is about 4 time slower compared to the powder formulation comprising DSPC (no net overall charge) and albuterol sulfate
10 (positive).

TABLE 8

Powder Formulation Number	Compositions (% weight basis)	Cumulative % Insulin Released at 4 hr	Maximum Release at 4 hr (Cumulative %)‡	First Order Release Constants (hr ⁻¹)‡
15 18	DSPC/Leucine/Albuterol Sulfate (sodium salt) = 76/16/8	106.21 ± 1.73	105.64 ± 0.20	29.7360 ± 0.7504
	DSPG/Leucine/Albuterol Sulfate (sodium salt) = 76/16/8	97.44 ± 0.68	95.13 ± 1.39	7.9334 ± 0.6877

‡ Release₍₀₎ = Release_(inf) * (1 - e^{-kt})

† Used as a control formulation.

While this invention has been particularly shown and described with
20 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 scope of the invention encompassed by the appended claims.

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-47-

CLAIMS

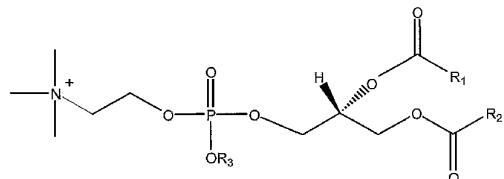
What is claimed is:

1. A method for delivery via the pulmonary system comprising:
 1. administering to the respiratory tract of a patient in need of treatment, prophylaxis or diagnosis an effective amount of particles comprising:
 1. a bioactive agent in association with a charged lipid wherein the charged lipid has an overall net positive charge, the agent has an overall net negative charge upon association and wherein release of the agent is sustained.
- 10 2. The method of Claim 1, wherein association of the agent and charged lipid comprises an ionic complexation.
3. The method of Claim 2, wherein association of the lipid and agent further comprises hydrogen bonding.
4. The method of Claim 1, wherein the charge ratio of lipid to bioactive agent is from about 0.25:1 to about 1:0.25.
- 15 5. The method of Claim 4, wherein the charge ratio of lipid to bioactive agent is from about 0.5:1 to about 1:0.5.
6. The method of Claim 5, wherein the charge ratio of lipid to bioactive agent is about 1:1.
- 20 7. The method of Claim 1, wherein the bioactive agent is a protein.
8. The method of Claim 7, wherein the protein is insulin.

9. The method of Claim 8, wherein the sustained release is at least about 6 hours post administration.

10. The method of Claim 1, wherein the lipid is a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphocholine or a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphoalkanolamine.

5 11. The method of Claim 10 wherein the 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphocholine lipid is represented by Formula III:



wherein,

10 R₁ and R₂ are independently an aliphatic group having from about 3 to about 24 carbons; and

R₃ is an aliphatic group having from about 1 to about 24 carbons.

12. The method of Claim 10, wherein the 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphocholine is 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DPePC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DMePC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DSePC), 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (DLcPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine(DOePC) or any combination thereof.

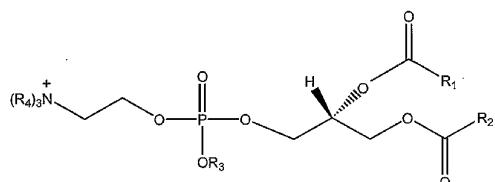
15 20

WO 02/053190

PCT/US01/48956

-49-

13. The method of Claim 10, wherein the 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphoalkanolamine is represented by Formula IV:



5 wherein,
R₁ and R₂ are independently an aliphatic group having from about 3 to
about 24 carbons;
R₃ is an aliphatic group having from about 1 to about 24 carbons; and
R₄ is independently hydrogen or an aliphatic group having from about
10 1 to about 6 carbons.

14. The method of Claim 10, wherein the 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphoalkanolamine is 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethylethanolamine(DPePE), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphoethanolamine(DMePE), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphoethanolamine(DSePE), 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphoethanolamine (DLePE), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphoethanolamine(DOePE) or any combination thereof.

15. The method of Claim 1 wherein the particles have a tap density less about 0.4 g/cm³.

-50-

16. The method of Claim 15, wherein the particles have a tap density less than about 0.1 g/cm³.
17. The method of Claim 1, wherein the particles have a median geometric diameter of from about 5 micrometers and about 30 micrometers.
- 5 18. The method of Claim 1, wherein the particles have an aerodynamic diameter of from about 1 to about 5 microns.
19. The method of Claim 18, wherein the particles have an aerodynamic diameter of from about 1 to about 3 microns.
20. The method of Claim 18, wherein the particles have an aerodynamic diameter of from about 3 to about 5 microns.
- 10 21. The method of Claim 1, wherein delivery to the pulmonary system includes delivery to the deep lung.
22. The method of Claim 1, wherein delivery to the pulmonary system includes delivery to the central airways.
- 15 23. The method of Claim 1, wherein delivery to the pulmonary system includes delivery to the upper airways.
24. The method of Claim 1, wherein the particles further comprise a lipid having no overall net charge.
25. The method of Claim 1 wherein the particles further comprise a carboxylic acid or salt thereof.
- 20

26. The method of Claim 25, wherein the carboxylic acid includes at least two carboxyl groups.
27. The method of Claim 1, wherein the particles further comprise a multivalent metal salt or ionic components thereof.
- 5 28. The method of Claim 27, wherein the multivalent salt is a salt of an alkaline earth metal.
29. The method of Claim 1, wherein the particles further comprise an amino acid.
30. The method of Claim 29, wherein the amino acid is hydrophobic.
- 10 31. The method of Claim 30, wherein the hydrophobic amino acid is leucine, isoleucine, alanine, valine, phenylalanine or any combination thereof.
- 15 32. A method for delivery via the pulmonary system comprising:
administering to the respiratory tract of a patient in need of treatment an effective amount of particles comprising:
insulin in association with a charged lipid wherein the charged lipid has an overall net positive charge which is opposite to the overall net negative charge of the insulin upon association and wherein release of the insulin is sustained.
33. The method of Claim 32, wherein the lipid is a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphocholine or a 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphoalkanolamine.
- 20 34. The method of Claim 33, wherein the 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-alkylphosphocholine is 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-

5 ethylphosphocholine(DPePC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphocholine(DMePC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphocholine(DSePC), 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphocholine (DLePC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphocholine(DOePC) or any combination thereof.

10 35. The method of Claim 33, wherein the 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-
 alkylphosphoalkanolamine is 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-
 ethylethanolamine(DPePE), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphoethanolamine(DMePE), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphoethanolamine(DSePE), 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphoethanolamine (DLePE), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-
 ethylphosphoethanolamine(DOePE) or any combination thereof.

15 36. The method of Claim 32, wherein association of the agent and charged lipid
 comprises an ionic complexation.

20 37. The method of Claim 36, wherein association of the lipid and agent further
 comprises hydrogen bonding.

25 38. The method of Claim 32, wherein the charge ratio of lipid to bioactive agent
 is from about 0.25:1 to about 1:0.25.

30 39. The method of Claim 38, wherein the charge ratio of lipid to bioactive agent
 is from about 0.5:1 to about 1:0.5.

35 40. The method of Claim 39, wherein the charge ratio of lipid to bioactive agent
 is about 1:1.

40 41. The method of Claim 32, wherein the particles further comprise a carboxylic
 acid.

42. The method of Claim 32, wherein the particles further comprise an amino acid.
43. The method of Claim 32, wherein the particles further comprise a lipid with no overall net charge.
- 5 44. The method of Claim 32, wherein the particles further comprise a multivalent metal salt or ionic components thereof.
45. The method of Claim 32, wherein delivery to the pulmonary system includes delivery to the deep lung.
- 10 46. The method of Claim 32, wherein delivery to the pulmonary system includes delivery to the central airways.
47. The method of Claim 32, wherein delivery to the pulmonary system includes delivery to the upper airways.

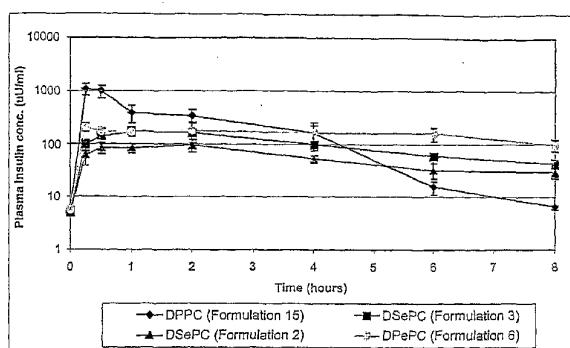


FIG. 1

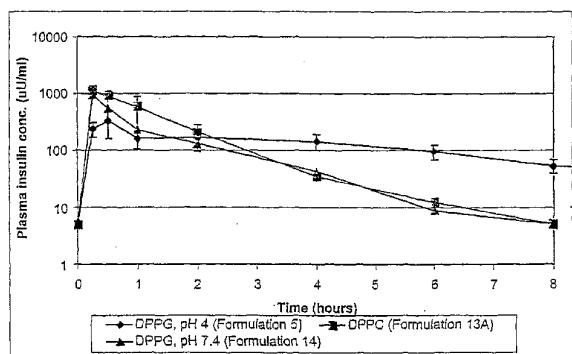


FIG. 2

WO 02/053190

PCT/US01/48956

2/2

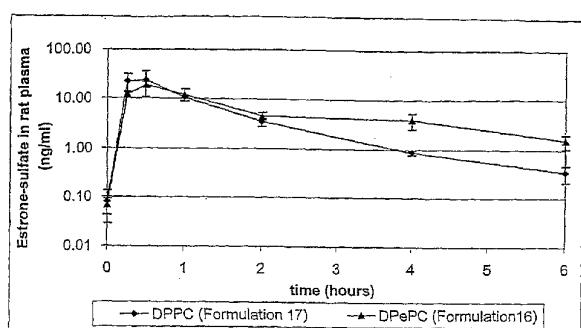


FIG. 3

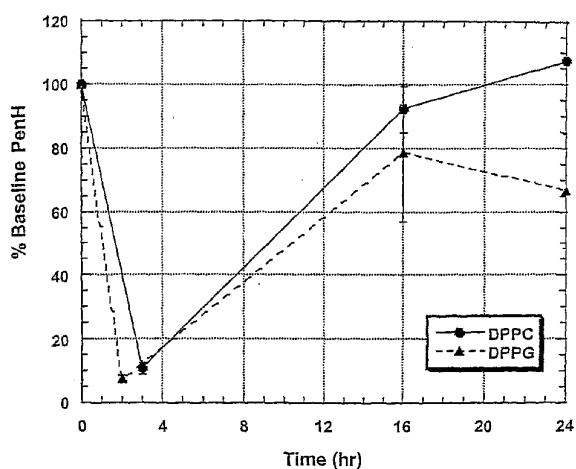


FIG. 4

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053190 A3(51) International Patent Classification⁵: A61K 47/48, 38/30, 9/16, 31/137, 31/566

(21) International Application Number: PCT/US01/48956

(22) International Filing Date:
18 December 2001 (18.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/752,109 29 December 2000 (29.12.2000) US

(71) Applicant: ADVANCED INHALATION RESEARCH, INC. [US/US]; 840 Memorial Drive, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors: BASU, Sujit, K.; 1 Sterns Street, Unit 1, Cambridge, MA 02138 (US); HRKACH, Jeffrey, S.; 24 Cambridge Terrace, Unit 2, Cambridge, MA 02140 (US); LIPP, Michael; 11 Salvi Drive, Framingham, MA 01701 (US); ELBERT, Katharina; 1 Sterns Street, Unit 1, Cambridge, MA 02138 (US); EDWARDS, David, A.; 171 Commonwealth Avenue, Unit 3, Cambridge, MA 02116 (US).

(74) Agents: ELMORE, Carolyn, S. et al.; Hamilton, Brook, Smith & Reynolds, P.C., 530 Virginia Road, P.O. Box 9133, Concord, MA 01742-9133 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, 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, KU, 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, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TU, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
27 March 2003

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



WO 02/053190 A3

(54) Title: PARTICLES FOR INHALATION HAVING SUSTAINED RELEASE PROPERTIES

(57) Abstract: The invention generally relates to a method for pulmonary delivery of therapeutic, prophylactic and diagnostic agents to a patient wherein the agent is released in a sustained fashion, and to particles suitable for use in the method. In particular, the invention relates to a method for the pulmonary delivery of a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent comprising administering to the respiratory tract of a patient in need of treatment, prophylaxis or diagnosis an effective amount of particles comprising a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent or any combination thereof in association with a charged lipid, wherein the charged lipid has an overall net charge which is opposite to that of the agent upon association with the agent. Release of the agent from the administered particles occurs in a sustained fashion.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/48956
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48 A61K38/30 A61K9/16 A61K31/137 A61K31/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 31346 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY ;PENN STATE RES FOUND (US)) 23 July 1998 (1998-07-23) page 5, line 29 -page 6, line 23 page 21, line 10 - line 14 page 42 -page 43; example 10 Claim 1 ----	1-9, 15-24, 32, 36-40, 45-47
X	WO 98 51278 A (INEX PHARMACEUTICALS CORP) 19 November 1998 (1998-11-19) page 4, line 15 -page 5, line 2 page 26; line 12 -page 27, line 2 page 28, line 4 - line 10 page 32, line 23 - line 26 ----	1-7, 9, 15-24 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *D* document which may have earlier or priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 4 November 2002		Date of mailing of the International search report 12/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5813 Patentam 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Muller, S

Form PCT/ISA/210 (second edition) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/48956

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 41873 A (UNIV CALIFORNIA) 27 December 1996 (1996-12-27) page 2, line 5 - line 22 page 10, line 22 -page 11, line 7	10-14
X	WO 96 40963 A (GORMAN CORI M ;MEGABIOS CORP (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) page 2, line 2 -page 3, line 29	10-14
E	US 2002/052310 A1 (VANBEVER RITA ET AL) 2 May 2002 (2002-05-02) the whole document	1-47

Form PCT/ISA/210 (or continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/48956
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 1-47 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition. 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 		
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/48956

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9831346	A 23-07-1998	US 5855913 A EP 0954282 A1 JP 2001526634 T WO 9831346 A1 US RE37053 E1 US 5985309 A US 2002052310 A1	05-01-1999 10-11-1999 18-12-2001 23-07-1998 13-02-2001 16-11-1999 02-05-2002
WO 9851278	A 19-11-1998	AU 733310 B2 AU 7422198 A WO 9851278 A2 EP 1027033 A2 JP 2002501511 T US 6287591 B1	10-05-2001 08-12-1998 19-11-1998 16-08-2000 15-01-2002 11-09-2001
WO 9641873	A 27-12-1996	US 5811406 A AU 708179 B2 AU 5938296 A CA 2224156 A1 EP 0836645 A1 JP 11507322 T WO 9641873 A1	22-09-1998 29-07-1999 09-01-1997 27-12-1996 22-04-1998 13-07-1999 27-12-1996
WO 9640963	A 19-12-1996	US 5932241 A AU 699162 B2 AU 6381396 A CA 2223928 A1 EP 0832727 A1 JP 11507365 T WO 9640963 A1	03-08-1999 26-11-1998 30-12-1996 19-12-1996 01-04-1998 29-06-1999 19-12-1996
US 2002052310	A1 02-05-2002	US 5985309 A EP 0954282 A1 JP 2001526634 T WO 9831346 A1	16-11-1999 10-11-1999 18-12-2001 23-07-1998

Form PCT/ISA/010 (patent family entries) 6/1/97 (98)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/18	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 K 37/26	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,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,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フルカック , ジエフリー , エス .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0 ケンブリッジ , ユニット 2 , ケンブリッジ
テラス 2 4

(72)発明者 リップ ,マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 0 1 フレイミンガム , サルヴィ ドライブ 1 1

(72)発明者 エルバート , カタリーナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 ケンブリッジ , ユニット 1 , スターンズ ス
トリート 1

(72)発明者 エドワーズ , デービッド , エイ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 1 6 ケンブリッジ , ユニット 3 , コモンウェルス
アベニュー 1 7 1

F ターム(参考) 4C076 AA29 AA31 BB03 BB22 BB27 CC21 CC30 EE59A FF63 FF68
4C084 AA02 BA44 CA62 DB34 MA05 MA41 MA43 MA57 NA03 NA11
ZC032 ZC352