



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **316745**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷

A 61 K 31/12, 9/10, 9/14

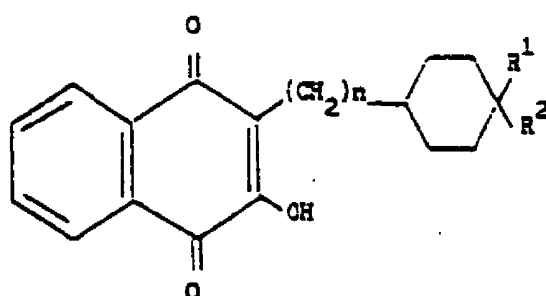
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19952522	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1993.12.23 PCT/GB93/02646
(22)	Inng.dag	1995.06.22	(85)	Videreføringsdag	1995.06.22
(24)	Løpedag	1993.12.23	(30)	Prioritet	1992.12.24, GB, 9226905
(41)	Alm.tilgj	1995.06.22			
(45)	Meddelt	2004.04.26			
(71)	Søker	The Wellcome Foundation Ltd , Unicorn House, 160 Euston Road, London NW1 2BP, England, GB			
(72)	Oppfinner	Alan Roy Dearn, Temple Hill, Dartford, Kent DA1 5AH, England, GB			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO			
(54)	Benevnelse	Mikrofluidiserte partikler av atovaquon, farmasøytisk preparat inneholdende slike partikler, fremgangsmåte for deres fremstilling og fremgangsmåte for fremstilling av preparatet			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9105550, WO 9104021, EP 362996			
(57)	Sammendrag				

Mikrofluidiserte partikler av atovaquon og en fremgangsmåte for fremstilling av slike. Mer spesielt beskrives et farmasøytisk preparat som inneholder mikrofluidiserte partikler av atovaquon som har forbedret biotilgjengelighet, og dets anvendelse i terapi.

Foreliggende oppfinnelse vedrører mikrofluidiserte partikler av atovaquon (2-[4-(4-klor-fenyl)cykloheksyl]-3-hydroksey-1,4-naftokinon), farmasøytisk preparat som inneholder slike mikrofluidiserte partikler som har anvendelse i terapi, fremgangsmåte for deres fremstilling, og fremgangsmåte for fremstilling av preparatet.

Atovaquon er tidligere beskrevet f.eks i EP-patent 0123238 og US patent 5.053.432 som angår 2-substituert-3-hydroksey-1,4-naftokinoner av formel (I):



(I)

hvor enten R^1 er hydrogen og R^2 er valgt fra C_{1-6} alkoksy, aralkoksy, C_{1-6} alkyl- C_{1-6} alkoksy, fenyl substituert med en eller to grupper valgt fra halogen og C_{1-6} alkyl, halogen og perhalogen- C_{1-6} alkyl eller R^1 og R^2 er begge C_{1-6} alkyl eller fenyl, og n er 0 eller 1, og fysiologisk akseptable salter derav. Forbindelsene angis å ha antiprotosoal aktivitet. Spesielt angis det at forbindelser av formel (I) hvor n er 0 er aktive mot den humane malariaparasitten *Plasmodium falciparum* og også mot *Eimeria*-arter slik som *E.tenella* og *E.acervulina*, som er kausative organismer til coccidiose og forbindelser av formel (I) hvor n er 1 angis å være aktive mot protozoer av slekten *Theileria*, spesielt *T.annulata* eller *T.parva*. Blant forbindelsene som spesielt er navngitt og eksemplifisert er forbindelsen av formel (I) hvor n er 0, R^1 er hydrogen og R^2 er 4-klorfenyl, dvs atovaquon.

EP 0362996 beskriver anvendelse av atovaquon i behandling og/eller profylaks av *Pneumocystis carinii pneumonia*.

Ytterligere anvendelser av atovaquon mot toxoplasmose og cryptosporidiose er beskrevet henholdsvis i EP-patentsøknader 0445141(WO 9104021) og 0496729 (WO 9105550).

Effektiviteten til atovaquon som et terapeutisk middel er begrenset av dets biotilgjengelighet. Det er følgelig et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe atovaquon i en mer biotilgjengelig form.

- 5 Det er nå funnet at biotilgjengeligheten av atovaquon kan økes ved å sikre at partikkelstørrelsen er innenfor et visst definert område for små partikler. Konvensjonelle metoder for redusering av partikkelstørrelsen til atovaquon ble funnet å være uten suksess med hensyn til å fremstille partikler av den størrelse som er nødvendig for å forbedre biotilgjengelighet.

10

Et mikrofluidiseringsapparat, betegnet Microfluidiser, har vært markedsført av Microfluidics Corporation siden 1985. Prinsippet ved driften av dette er basert på en neddykket jetteknologi. Den ble konstruert hovedsakelig som en homogeniserings-anordning for bruk i matvare- og farmasøytisk industri, for fremstilling av f.eks emulsjons- og liposomale systemer og har senere vært benyttet for cellebrytningsformål i bioteknologiske anvendelser.

20 Det er nå overraskende funnet at mikrofluidiserte partikler av atovaquon fremstilt ved bruk av en Microfluidiser har forbedret forbindelsens biotilgjengelighet. Det antas at dette skyldes de mikrofluidiserte atovaquonpartiklenes lille størrelse og snevre størrelsesområde.

Ved bruk av nevnte Microfluidiser blir tilførselsstrømmen pumpet inn i et spesielt konstruert kammer i hvilket fluidstrømmer samvirker ved meget høye hastigheter og trykk. Fikserte mikrokanaler i reaksjonskammeret tilveiebringer en ekstremt fokusert reaksjonssone med intens turbulens hvilket forårsaker frigjøring av energi blant kavitasjons- og skjærkrefter. Uten ønske om å være bundet av noen teori antas det at siden alt produkt passerer gjennom et dimensjonelt fastsatt areal med energifrigjøring blir større størrelsesdensitet og mindre størrelser oppnådd ved bruk av nevnte Microfluidiser enn ved konvensjonelle metoder for fremstilling av fine partikler.

35 Det er ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebragt atovaquon som er kjennetegnet ved at det er i form av partikler hvor minst 90 % av partiklene har en volumdiameter i området 0,1-3 μm . Det er foretrukket at minst 95 % av partiklene har en volumdiameter i området 0,1-2 μm .

Ifølge oppfinnelsen er det også tilveiebragt et farmasøytisk preparat som er kjennetegnet ved at det innbefatter mikrofluidiserte partikler av atovaquon. Det er foretrukket at

minst 90 % av de mikrofluidiserte partiklene av atovaquon i dette preparatet har en volumdiameter i området 0,1-3 μm .

Ytterligere foretrukne og fordelaktige trekk ved dette preparatet fremgår fra de medfølgende krav 4-8.

Bærerene må være akseptable i den forstand at de er kompatible med de andre bestanddelene i sammensetningen og ikke skadelige for mottakeren.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en fremgangsmåte for fremstilling av mikrofluidiserte partikler av atovaquon, og denne fremgangsmåten er kjennetegnet ved at den innbefatter blanding av atovaquon med en flytende vehikkel for oppnåelse av en blanding hvor konsentrasjonen av atovaquon er mindre enn 450 mg/ml og utsettelse av blandingen for minst 3 passasjer gjennom en Microfluidiser. Derved oppnås nevnte atovaquon i form av partikler hvor minst 90 % av partiklene har en volumdiameter i området 0,1-3 μm . Fortrinnsvis har minst 95 % av partiklene en volumdiameter i området 0,1-2 μm .

Ifølge et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat, og denne fremgangsmåten er kjennetegnet ved at den innbefatter trinnene:

- a) blanding av atovaquon med en flytende vehikkel for oppnåelse av en blanding hvor konsentrasjonen av atovaquon er mindre enn 450 mg/ml,
- b) utsettelse av blandingen for minst 3 passasjer gjennom en Microfluidiser for oppnåelse av et mikrofluidisert preparat hvor nevnte atovaquon er i form av partikler og minst 90 % av disse partiklene har en volumdiameter i området 0,1-3 μm ,
- c) blanding av det mikrofluidiserte preparatet med én eller flere farmasøytisk akseptable bærere for dette.

Foretrukne og fordelaktige trekk ved denne fremgangsmåten fremgår fra de medfølgende krav 11 til 13.

Blandingen utsettes hensiktsmessig for 10-50 passasjer gjennom Microfluidiser-apparatet, f.eks 25-30 passasjer. Blandingen utsettes fortrinnsvis for 15-25 passasjer gjennom nevnte Microfluidiser.

- 5 I en utførelse er den flytende vehikkelen et overflateaktivt middel. Den flytende vehikkelen er fortrinnsvis en oppløsning av overflateaktivt middel. I en spesielt foretrukken utførelse er det overflateaktive midlet Poloxamer 188-oppløsning. I en annen foretrukken utførelse innbefatter de farmasøytisk akseptable bærerene et suspensjonsmiddel. Egnede suspensjonsmidler inkluderer metylcellulose og xantan-
- 10 gummi. Suspensjonsmidlet er fortrinnsvis xantangummi.

- Farmasøytiske preparater inkluderer de som er egnet for oral og parenteral (inkludert subkutan, intradermal, intramuskulær og intravenøs) administrasjon samt administrasjon gjennom nese-maverør. Egnede preparater som omfattes av foreliggende oppfinnelse
- 15 inkluderer f.eks faste doseringsformer slik som tabletter og flytende doseringsformer slik som suspensjoner, som er foretrukne preparater. Preparatet kan når det passer, hensiktsmessig bli presentert som adskilte doseringsenheter og kan fremstilles fra de mikrofluidiserte partiklene ved bruk av metoder som er kjent innen farmasien.
- 20 Tester for måling av biotilgjengeligheten av atovaquon in vivo viser at preparater av mikrofluidisert atovaquon har forbedret biotilgjengelighet sammenlignet med tidligere kjente preparater. Foreliggende preparat som innbefatter mikrofluidisert atovaquon er således egnet for bruk i terapien, spesielt i behandling og profylaks av parasittiske protozoinfeksjoner, f.eks malaria og toksoplasmose, og infeksjoner forårsaket av
- 25 P.carinii.

Oppfinnelsen vil nå bli ytterligere illustrert ved følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

30

Fremstilling av mikrofluidiserte partikler av atovaquon

- Atovaquon ble fremstilt ved fremgangsmåter ifølge den tidligere teknikk, f.eks US patent nr 5.053.432. 600 ml av en blanding bestående av 2,5 % vekt/vol atovaquon i
- 35 0,25 % vekt/vol vandig Celacol M2500 ble tilberedt og 100 ml ble bibeholdt i en glassbeholder som en kontroll. En modell 120B Microfluidiser-apparat i laboratoriemålestokk ble forbundet med en 4279 kPa (90 psi) pneumatisk tilførsel og justert for frembringelse av et fluidtrykk på 713 MPa (15.000 psi). Maskinsokkelen, reaksjons-

kammeret og rørsystemet ble neddykket i et bad med kaldt vann. 500 ml av blandingen ble anbragt i Microfluidiser-apparatets massebeholder og ført gjennom Microfluidiser-apparatets reaksjonskammer før den ble returnert til massekammerets topp og side. Blandingene ble resirkulert kontinuerlig gjennom reaksjonskammeret og det ble tatt 5 prøver ved 10, 20, 30, 45 og 60 minutter. Antall passasjer som hver av disse prøvene hadde blitt utsatt for ble beregnet og er vist i nedenstående tabell 1.

TABELL 1

10

Prøve	Mikrofluidiseringstid (minutter)	Prøvevolum (ml)	Antall passasjer
Kontroll	0	100	0
1	10	105	8
2	20	105	9-19
3	30	110	31-35
4	45	105	65-77
5	60	35	142-244

Det ble foretatt mikroskopiske observasjoner av kontrollen og prøvene ved 40x forstørrelse og resultatene var som følger:

- 15 Kontroll - Varierte former, plater, staver og sferoider, omkring 5x5 µm generelt opptil 7,5 x 10 µm, løst aggregert.
- Prøve 1 - Mer avrundede mindre former, noen "store" krystaller, mange små fragmenter 2,5 x 2,5 µm, mer dispergert.
- 20 Prøve 2 - Mer avrundede, mindre former, fler fragmenter.
- Prøve 3 - Enda mer avrundede, mindre former, fler fragmenter.
- 25 Prøve 4 - Ytterligere mer avrundede, mindre former, fler fragmenter.
- Prøve 5 - Meget små partikler, alle under 2,5 µm, alle avrundet, monodisperse.

EKSEMPEL 2**Farmasøytisk preparat**

- 5 En oral suspensjonspreparat ble fremstilt ved blanding av følgende bestanddeler:

	Mikrofluidiserte partikler av atovaquon	150,0 mg
	Poloxamer 188	5,0 mg
	Benzylalkohol	10,0 mg
10	Xantangummi	7,5 mg
	Renset vann	for oppnåelse av 1,5 mg

EKSEMPEL 3

15 **Biologisk test**

- Ni friske frivillige menn som hadde fastet mottok enkeltdoser av 5 mg/ml suspensjoner inneholdende 250 mg atovaquon som en 3 μ m midlere partikkelstørrelse-suspensjon og 1 μ m mikrofluidisert suspensjon i et randomisert "crossover"-studium. Plasmaprøver ble tatt ved intervallet opp til 2 uker etter den siste dosen og analysert ved HPLC.
- 20 Resultatene er gitt i nedenstående tabell 2.

TABELL 2

25

	3 μ m suspensjon	1 μ m suspensjon
midlere (SD)AUC	95 (62) μ g/ml. time	247 (85) μ g/ml. time
midlere (SD) C_{maks}	1,2 (0,7) μ g/ml	5,0 (1,6) μ g/ml
median T_{maks}	5 timer	1 time

Den midlere (95 % CI) økning for AUC til 1 μ m-suspensjonen i forhold til 3 μ m-suspensjonen var 2,6-ganger (1,9-3,5) og for C_{maks} var den 4,1-ganger (2,5-6,6).

P a t e n t k r a v

1.

Atovaquon, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er i form av
5 partikler hvor minst 90 % av partiklene har en volumdiameter i området 0,1-3 μm .

2.

Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
innbefatter mikrofluidiserte partikler av atovaquon.

10

3.

Farmasøytisk preparat ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d at minst 90 % av de mikrofluidiserte partiklene av atovaquon har en
volumdiameter i området 0,1-3 μm .

15

4.

Farmasøytisk preparat ifølge krav 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det ytterligere innbefatter én eller flere farmasøytisk akseptable bærere for
dette.

20

5.

Farmasøytisk preparat ifølge krav 2 til 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det er i form av en suspensjon.

25

6.

Farmasøytisk preparat ifølge hvilket som helst av kravene 4 og 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at de farmasøytisk akseptable bærerene
inkluderer et suspensjonsmiddel.

30

7.

Farmasøytisk preparat ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t
v e d at suspensjonsmidlet er xantangummi.

8.

35 Farmasøytisk preparat ifølge hvilket som helst av kravene 2 til 7, for bruk i behandling
og/eller profylakse av parasittiske protozoinfeksjoner forårsaket av *P.carinii*.

9.

Fremgangsmåte for fremstilling av mikrofluidiserte partikler av atovaquon ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter blanding av atovaquon med en flytende vehikkel for oppnåelse av en blanding hvor konsentrasjonen av atovaquon er mindre enn 450 mg/ml, og utsettelse av blandingen for minst 3 passasjer gjennom en Microfluidiser.

10.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter trinnene:

- a) blanding av atovaquon med en flytende vehikkel for oppnåelse av en blanding hvor konsentrasjonen av atovaquon er mindre enn 450 mg/ml,
- 15 b) utsettelse av blandingen for minst 3 passasjer gjennom en Microfluidiser for oppnåelse av et mikrofluidisert preparat hvor nevnte atovaquon er i form av partikler og minst 90 % av disse partiklene har en volumdiameter i området 0,1 – 3 μm ,
- 20 c) blanding av det mikrofluidiserte preparatet med én eller flere farmasøytisk akseptable bærere for dette.

11.

Fremgangsmåte ifølge krav 9 eller 10, k a r a k t e r i s e r t

25 v e d at blandingen utsettes for 10 – 50 passasjer gjennom nevnte Microfluidiser.

12.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at blandingen utsettes for 15 – 25 passasjer gjennom nevnte Microfluidiser.

30

13.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 10 – 13,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den flytende vehikkelen er en oppløsning av overflateaktivt middel.

35

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at oppløsningen av det overflateaktive middelet er polyetylen (Poloxamer 188)-oppløsning.

5

15.

Fremgangsmåte ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at de farmasøytisk akseptable bærerne inkluderer et suspenderingsmiddel.

10 16.

Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at suspenderingsmidlet er xantangummi.

17.

15 Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er fremstilt ved en fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 10 – 16.