

(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2004-524368

(P2004-524368A)

(43) 公表日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/10	A 6 1 K 47/10	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/12	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/26	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/32	A 6 1 K 47/32	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-578922 (P2002-578922)	(71) 出願人	503352947
(86) (22) 出願日	平成14年3月26日 (2002.3.26)		フェアーズ ファーマシューティカル リ
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月26日 (2003.9.26)		サーチ エヌ. ヴェー.
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/003371		オランダ国 アンティレス諸島 クラカオ
(87) 国際公開番号	W02002/080883		, ビー. オー. ボックス3889,
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002.10.17)		ジョン ビー ゴルシラヴェク 14
(31) 優先権主張番号	01 302 841.0	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成13年3月27日 (2001.3.27)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低い水溶性を有する生物学的に活性な化合物を可溶化するための方法および組成物

(57) 【要約】

親油性化合物との分子会合体を形成するための組成物、および親油性の生物学的に活性な化合物を、予め形成された、脂質粒子の水性懸濁物中に装填する改善された方法。バイアルまたは他の適切なコンテナ中に、直径が1000nm未満の脂質粒子を含む、注射目的での好ましい実施形態が、記載される。この方法は、第1のコンテナ中の、溶液中またはアモルファスとして、好ましくは、凍結乾燥された粉末として、親油性組成物を、第2のコンテナ中に含まれた脂質粒子の水性懸濁物と混合して、分子会合体を形成する工程を包含する。最小の攪拌のみが必要とされる。この手順全体は、病室において、または寝台のそばでの、使用の直前に、インサイチュで即座に、密封された滅菌ユニット中で実施され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分子会合体を処方するための組成物であって、以下：

a) 低い水溶性を有する、生物学的に活性な化合物であって、生理学的に受容可能な親水性溶媒中に溶解しているか、または粉末形態であり、必要に応じて他の賦形剤と共に、第 1 のコンテナ中に保持されている、生物学的に活性な化合物；

b) 脂質粒子の水性懸濁物であって、少なくとも 1 種の膜脂質を主成分として含有し、必要に応じて他の賦形剤と共に、第 2 のコンテナ中に保持されている、水性懸濁物；および

c) 必要に応じて、他の生理学的に受容可能な賦形剤、
を含有する、組成物。

10

【請求項 2】

前記水性脂質懸濁物が、1000nm未満、好ましくは、300nm未満のサイズを有し、そして低い多分散性指数を有する、脂質粒子を含有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記水性脂質懸濁物が、1ミクロンより大きな平均粒子サイズを有する脂質粒子を含有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記膜脂質が、非極性脂質を実質的に含まない、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記膜脂質が、リン脂質、糖脂質、スフィンゴリピド、セラミド、gangliosid、およびセレブロシドからなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 6】

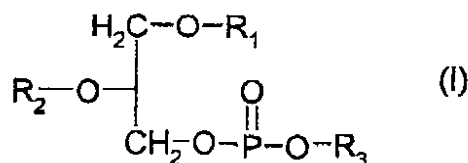
前記膜脂質が、モノアシルホスファチジルコリンもしくはジアシルホスファチジルコリン、またはその混合物であり、該ジアシルホスファチジルコリンが、好ましくは、ダイズ PC、卵 PC、POPC、およびOOPCからなる群より選択され、そして該モノアシルホスファチジルコリンが、好ましくは、酵素（ホスホリパーゼ A2）で改変されたダイズ PC、卵 PC、1-パルミトイル PC、1-オレオイル PC、および 1-ステアロイル PC からなる群より選択される、請求項 5 に記載の組成物。

30

【請求項 7】

前記膜脂質が、以下の式：

【化 1】



の膜脂質、またはこのような化合物の塩であり、ここで、

40

R₁ は、C₁₀ ~ C₂₀ アシルを表し；

R₂ は、水素または C₁₀ ~ C₂₀ アシルを表し；そして

R₃ は、水素、2-トリメチルアミノ-1-エチル、2-アミノ-1-エチル、C₁ ~ C₄ アルキル、カルボキシで置換された C₁ ~ C₅ アルキル、カルボキシおよびヒドロキシで置換された C₂ ~ C₅ アルキル、カルボキシおよびアミノで置換された C₂ ~ C₅ アルキル、イノシトール基またはグリセリル基を表す、

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記第 2 のコンテナ中の前記脂質粒子が、主成分として存在する少なくとも 1 種の膜脂質を含有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

50

【請求項 9】

低い水溶性を有する生物学的に活性な化合物との、分子会合体を形成する方法であって、該方法は、生理学的に受容可能な親水性溶媒中に溶解しているかまたは粉末形態である、低い水溶性を有する生物学的に活性な化合物を含有する、第 1 のコンテナの内容物を、少なくとも 1 種の膜脂質を主成分として含有する脂質粒子の懸濁物を含有する、第 2 のコンテナの内容物、および必要に応じて、他の生理学的に受容可能な賦形剤と混合する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

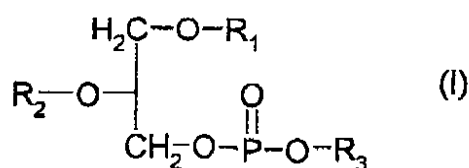
前記第 2 のコンテナの内容物が、必要に応じて溶媒、および胆汁酸塩のような界面活性剤を含有する、等張性の、等水素イオン濃度の水性媒体中に懸濁した、0.5% w/w ~ 25% w/w の間、好ましくは、20% w/w 未満、最も好ましくは、5% w/w ~ 15% w/w の間の、少なくとも 1 種の膜脂質、好ましくは、リン脂質を含有する、脂質粒子の分散物を含む、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記膜脂質が、以下の式：

【化 2】



20

またはこのような化合物の塩であり、ここで、

R₁ は、C₁₀ ~ C₂₀ アシルを表し；

R₂ は、水素または C₁₀ ~ C₂₀ アシルを表し；そして

R₃ は、水素、2-トリメチルアミノ-1-エチル、2-アミノ-1-エチル、C₁ ~ C₄ アルキル、カルボキシで置換された C₁ ~ C₅ アルキル、カルボキシおよびヒドロキシで置換された C₂ ~ C₅ アルキル、カルボキシおよびアミノで置換された C₂ ~ C₅ アルキル、イノシトール基またはグリセリル基を表す、

請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記水性脂質分散物が、高圧の均質化および高圧ホモジナイザーでの抽出に供されて、300 nm 未満、好ましくは 100 nm より小さな粒子サイズを与える、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 2 のコンテナ中の前記脂質粒子が、小胞性、非小胞性、または組合せである、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 2 のコンテナ中の前記脂質粒子が、660 nm の波長または適切な極大において、1 cm のセル中で測定される場合に、入射光の少なくとも 40% の透過を可能にする、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記第 1 のコンテナの前記内容物が、溶媒中の親油性化合物の溶液から、沈澱および/または凍結乾燥によって調製された、アモルファス粉末である、請求項 9 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記装填される脂質懸濁物が乾燥される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、低い水溶性を有する生物学的に活性な化合物を可溶化するための、組成物および方法に関する。

【0002】

本明細書中において、以下の定義が適用される：

「脂質」とは、リン脂質、糖脂質、セラミド、ガングリオシドおよびセレブロシドが挙げられる、膜脂質をいう。この用語は、本明細書中において使用される場合、1つの単一の型のみ脂質、およびその混合物（酵素で改変されたバージョンを含む）をいう。

【0003】

「脂質懸濁物」とは、少なくとも1種の膜脂質を主成分 (major component) または主成分 (major constituent) として含有する、分散した脂質粒子の水性分散物をいう。

10

【0004】

「化合物」とは、生存生物において生理学および/または薬理学的な効果を有する、生物学的に活性な物質である。

【0005】

「コンテナ」とは、ゴムの栓およびキャップを備えるアンブルまたはコンテナ、単一または二重のチャンバの注射器、非経口投与に適切な、ポリマー材料またはガラスから作製される注入用のバッグまたは瓶を意味する。この用語はまた、液体を保持するための任意の容器を含む。

【0006】

「低い水溶性」とは、1部の化合物を溶解するために10部より多い水を必要とする、任意の化合物を意味する。この用語は、USP 24に定義されるような、わずかに可溶性 (10~30) から非常にわずかに可溶性 (1000~10,000) の間の定義にまたがる。この記載は、親油性化合物および疎水性化合物を含む。

20

【0007】

「分子会合体」とは、化合物および脂質から形成される複合体であり、これによって、この分子は、脂質中に均一に分散するか、または可溶化される。

【0008】

化合物と脂質分子との間の「分子会合体」は、試験材料を含有する脂質混合物を蒸留水で濾過した後に、会合していない試験材料の20%以下が、200nmのポリカーボネート膜フィルタ上に残る場合に、達成される。

30

【0009】

「装填する」とは、化合物を脂質粒子中に組み込むかまたは移動させて、分子会合体を形成することを意味する。

【背景技術】

【0010】

生物学的に活性な化合物を送達する際の主要な問題は、その化合物の乏しい水溶性を懸念する。この問題は、特に、非経口注入または静脈内注入によって投与される親油性化合物に対して適用される。その低い溶解度に起因して、この化合物は、iv注射または注入の前または後に沈澱し得、そして毛細管の閉鎖を引き起こし得る。沈澱および集合の結果として、標的のレセプターおよび器官に移送されるためのリポタンパク質への結合のために、十分な濃度の薬物が利用可能ではないかもしれない。従って、必要とされる治療効果を引き起こすために、親油性化合物を可溶化することが必要である。

40

【0011】

先行技術において、Cremophor EL (登録商標) またはポリソルベート80のような界面活性剤エタノール溶液および水性溶液が、親油性化合物を可溶化するために、通常使用されている。あるいは、これらの化合物は、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンと複合体化され得るか、または油/水エマルジョン系に溶解され得る。しかし、有機溶媒の希釈の際の薬物の沈澱は、問題であり、そしてCremophore ELとの注射の後のアナフィラキシーは、未知の問題ではない。水中油エマルジョンは、十分

50

な油溶性を有する化合物に制限される。さらに、この化合物は、水中油エマルジョンの物理的不安定性に関連し得、そしていくつかは、加熱滅菌または貯蔵に耐えるほど安定ではないかもしれない。リン脂質小胞を含有するリポソームは、アンホテリシンのような、水に難溶性の化合物を送達するために、時々使用される。リン脂質の低い毒性および高い許容性により、リポソームは、親油性化合物を送達するための魅力的なビヒクルとなる。しかし、親油性薬物を含有する脂質粒子の、より広い市場での使用は、親油性薬物を脂質に会合させるための、問題の多い高価な製造手順を必要とする。このような手順の例としては、高いせん断および/または高圧の均質化、制御された有機溶媒希釈、薬物を含有する水性リポソーム懸濁物を製造するための、クロスフロー濾過が挙げられる(例えば、I s e l e , U . ; V a n H o o g e n v e s t , P . ; H i l f i k e r , R . ; C a p r a r o , H - G . ; S c h i e w e c k , K . および L e u e n b e r g e r , H . , L a r g e - S c a l e P r o d u c t i o n o f L i p o s o m e s C o n t a i n i n g M o n o m e r i c Z i n c P h t h a l o c y a n i n e b y C o n t r o l l e d D i l u t i o n o f O r g a n i c S o l v e n t s , J . P h a r m . S c i . (1 9 9 4) , 8 3 , 1 6 0 8 - 1 6 1 6 を参照のこと)。製造の問題が克服され得る場合でさえ、大部分の薬物およびリン脂質は、溶解状態において、水中で化学的または生理学的に不安定であり、そして貯蔵のために、凍結乾燥される必要がある。ここでの問題は、凍結乾燥されたリポソームが、再構成の際に生理学的安定性を維持するために、高い相転移温度を有する、高価な合成脂質または半合成脂質を必要とし得ることであり、これは、すでに高い費用をさらに追加する。

10

20

【0012】

多数の先行技術文献において、低い水溶性を有する化合物を可溶化するためのリン脂質の使用が、記載されている：

W O 9 8 / 5 8 6 2 9 は、少なくとも1種のモノアシル脂質(例えば、モノアシルリン脂質およびモノアシルリン脂質とジアシルリン脂質との混合物)を含有する、脂質組成物を記載する。この組成物は、親油性化合物を分子形態で保持する際に効果的である。この組成物は、硬質または軟質のゼラチンカプセルに充填するために適切な、蠟質の固体、ペースト様の材料、または粘性流体であり得る。注射可能な薬物処方物の即座の調製は言及されていない。

【0013】

水に難溶性の薬物溶媒和物の溶解挙動を増加させるための、ジアシルリン脂質を使用する脂質-薬物共沈澱の調製、および少量(0.05%未満)のポリビニルピロリドンを組み込むことによる、このような分散物からの薬物放出の改変の可能性が、J . P h a r m . S c i . 8 1 , 2 8 3 - 2 8 6 (1 9 9 2) に記載されている。この組成物は、本質的に、共沈澱によって調製され、そして溶媒中の結晶構造への脂質の組み込みを生じる。溶媒和結晶にトラップされた残余の溶媒は、水に難溶性の化合物の改善された溶解度の可能な理由と考えられる。注射可能な薬物処方物のインサイチュ調製は、記載されていない。

30

【0014】

W O 8 6 / 0 5 6 9 4 は、エステル化されていない脂肪酸およびモノグリセリドを、少量のモノアシル脂質(リゾホスファチジルコリン)と共に使用して、種々の親油性化合物に対して改善された経口吸収を示す固体粒子を形成することを記載する。改善された経口吸収は、この混合物の独特の特性に起因すると説明されている。注射可能な薬物処方物のインサイチュ調製は、記載されていない。

40

【0015】

米国特許第5,091,188号は、注射可能な組成物、および不溶性または難溶性の粉末をより安定にするための方法を開示する。この方法は、外側表面を1層以上のリン脂質で安定化させて、貯蔵の間に薬物粒子が集合することを防止することによる。この薬物は、分子の分散物ではなく、そして注射可能な処方物のインサイチュでの調製は、記載されていない。

【0016】

50

W O 9 9 / 4 9 8 4 6 は、組成物、ならびにリン脂質、荷電表面改変剤およびブロックコポリマー（表面に接着して粒子が懸濁物中で粒子成長、集合または凝集することを防止する）と一緒にした、水に不溶性の薬物の、ミクロン未満およびミクロンのサイズの安定な粒子を得る手順を開示する。この粒子は、脂質分子との分子分散物ではない。マイクロフルイダイザーを複数回通すことによる高せん断の混合が、薬物粒子のサイズを減少させるために必要である。注射可能な薬物処方物の即座の調製は言及されていない。

【 0 0 1 7 】

W O 9 9 / 6 5 4 6 9 は、液化ガス中の化合物および界面改変剤の圧縮溶液から水性媒体に急速に膨張させることにより、界面改変剤分子（例えば、リン脂質）で薬物のマイクロ粒子懸濁物を安定化させることによって、同時に調製された、水に不溶性の薬物のミクロン未満の粒子を開示する。薬物の粒子は、懸濁物中で表面を安定化され、そして集合を防ぐ。この粒子は、分子分散物ではなく、そして注射可能な薬物処方物のインサイチュでの調製は言及されていない。

10

【 0 0 1 8 】

欧州特許出願公開第 0 7 9 5 5 8 5 号は、生理学的に適合性の乳化剤の存在下で水性媒体と混合された揮発性の有機溶媒中の、粒子状レチノイドまたはカレチノイド（*carotenoid*）の、微際に分割された懸濁物を調製するためのプロセスを開示する。使用される種々の乳化剤の例は、加水分解されたレクチン（*Emulfluid E*）であり、これは、かなりの量の非極性油および遊離脂肪酸（すなわち、45%未満）を含有する。レチノイドまたはカレチノイドは、分子分散物ではない、記載される組成物は、非経口用途のために適切ではない。

20

【 0 0 1 9 】

欧州特許第 0 2 5 6 0 9 0 号は、小さな単層小胞（*SUV*）懸濁物中で疎水性物質を可溶化するための、特定のモノアシル脂質（すなわち、リソ-ホスファチジル-エタノールアミン）の、単独でかまたは他のジアシルリン脂質と組み合わせての使用を記載する。注射可能な薬物処方物のインサイチュでの調製は言及されていない。

【 0 0 2 0 】

欧州特許第 0 1 5 8 4 4 1 号は、組成物に水性流体を添加することによって脂質小胞を作製する方法のための、膜脂質に基づくプロリポソーム（*pro-liposome*）組成物、および小胞の水性分散物に関する。この組成物は、水溶性または油溶性の、生物学的に活性な化合物を含有する。これらはまた、注射の目的に適切な有機溶媒（例えば、エタノール）を含有し得る。注射可能な薬物処方物のインサイチュでの調製は、記載されていない。

30

【 0 0 2 1 】

W O 9 7 / 2 5 9 7 7 は、シクロスポリン、ラパマイシンまたはアスコルマイシン、あるいはその誘導体を含有する、水中油の脂肪エマルジョン組成物の即時の調製のためのプロセスを開示する。このプロセスは、プラシーボの脂肪エマルジョンに、活性な安定化剤（例えば、リン脂質）および有機溶媒を含有する濃縮物を混合する工程を包含する。主成分が難溶性化合物を含有するリン脂質である脂質粒子を含有する、注射可能な組成物の、インサイチュでの調製の言及はなく、そしてこの特許は明らかに、シクロスポリン、ラパマイシン、およびアスコルマイシン、ならびにこれらの誘導体のみに関する。

40

【 0 0 2 2 】

米国特許第 5, 7 4 7, 0 6 6 号および米国特許第 4, 1 5 8, 7 0 7 号は、改善された貯蔵特性を有する溶液を得るために、水にほんのわずかに可溶性であるかまたは不溶性の活性物質の、水への可溶化のための混合されたミセルを記載する。このミセルは、ホスファチドおよび胆汁酸塩からなる。注射可能な薬物処方物のインサイチュでの調製は言及されていない。

【 0 0 2 3 】

米国特許第 5, 1 9 2, 5 4 9 号は、pH 勾配によって両親媒性薬物をリポソームに装填する方法を開示し、一方で米国特許第 5, 3 1 6, 7 7 1 号は、アンモニウムイオン勾配

50

による両親媒性薬物のリポソームへの装填を記載する。米国特許第5,380,531号もまた、アミノ酸およびペプチドをリポソームに蓄積させるための方法を記載する。これら3つの例は、水溶性でありプロトン化され得る塩基性機能を保有する化合物での、予め形成されたりリポソームの装填に制限される。

【0024】

米国特許第5,616,341において、リポソーム抗腫瘍剤の高薬物：脂質処方物が、提供される。リポソームは、膜貫通イオン勾配、好ましくは膜貫通pH勾配を使用する活性機構によって薬物を負荷するプロセスによって作製され得る。この技術を使用して、捕捉効率は、100%に達し、そしてリポソームは、使用の直前に薬物と共に負荷され得、リポソーム中の薬物の保持に関連する安定性の問題を排除する。用いられる薬物：脂質の比は、従来のリポソーム調製物より約3~80倍高く、そしてリポソームからの薬物の放出速度は、低下される。リポソーム調製物中の遊離抗腫瘍剤を決定するためのアッセイ方法もまた、開示される。この開示される方法は、イオン化可能抗腫瘍剤の負荷に制限され、そしてこのアプローチの治療的使用が、明らかに意図される。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0025】

親油性薬物を脂質粒子に結合するための有効な方法の実際的な必要性があることが、理解される。本発明の目的は、分子が脂質粒子（主成分が少なくとも1つの膜脂質を構成している）に結合する場合に、疎水性化合物を可溶化するための改良された方法を提供することであるが、単に非経口用途のみを特別には意図しない。安定性の問題および貯蔵の問題を回避するために、使用直前にインサイチュで調製され得る滅菌組成物を提供することが、本発明の目的である。再現性があり、商業的に実行可能であり、費用効果があり、そして実用的であり、検査され得る方法を提供することが、本発明のさらなる目的である。使用される成分が、安全であり、容易に入手可能であり、そして滅菌され得ることもまた、目的である。本発明が、医用用途、臨床研究および前臨床スクリーニング用途（例えば、インビトロにおける細胞の効力/毒性研究またはインビボにおける動物の効力/毒性研究）において、および内的適用および外的適用のためにさらに処理され得る脂質キャリア中の化合物を可溶化するために使用され得ることもまた、なおさらなる目的である。

20

【0026】

本発明は、製造および安定性の問題を回避する、費用効果のある簡単な組成物および方法を提供することにおいて、上記の局面に取り組む。さらに、本発明は、高価な合成または半合成の脂質を使用する必要なく、信頼性があり、費用効果のあるリン脂質を使用することを可能にする。予想外なことに、本発明は、水性媒体中で低い溶解度を有する化合物が、一緒に混合された場合に、別個の粒子（ここで主成分は少なくとも1つの膜脂質である）を含有する膜脂質懸濁液と自発的かつ瞬時に分子会合物を形成し得ることが見出された。さらに、本発明により、2つの成分は、混合時まで、別個のコンテナ中で分かれたままであり得る。難溶性化合物は、親水性媒体に溶解され得るか、または乾燥粉末形態で存在し得る。好ましくは、この脂質懸濁液は、透明であり、そして脂質会合物を含有する得られる組成物は、非経口用途に特に適切であるが、生きた生物への経口投与、肺投与および局所投与のためにもまた用いられ得る。

30

40

【0027】

この脂質懸濁液および化合物は、別個の組成物として調製され、そして2つの別個のコンテナ中に保持される。第1のコンテナ中の親油性化合物は、好ましくは、親水性媒体に溶解されるか、または粉末もしくは凍結乾燥物として存在する。第2のコンテナ中の脂質懸濁液は、長期の貯蔵に適切であり、そして標準的な高圧ホモジナイザーおよび/またはエクストルーダーを使用して製造され得る。これは、滅菌濾過され得、そしていくつかの場合において、さらに加熱滅菌される。投与の直前に、一方のコンテナの内容物が、他方のコンテナに加えられる。この化合物の親油性および別個の脂質粒子により示される広い表面積に起因して、この化合物は、優先的に脂質に分割され、そして分子会合物を形成する

50

。従って、分割および分子会合によって負荷が即時に行われるので、このプロセスは、即時分割負荷 (Instant Partition Loading (IPL)) と記載され得る。

【0028】

驚くべきことに、細かく分割された脂質粒子 (すなわち、主成分 (component または constituent) として少なくとも1つの膜脂質を含有する予備形成された粒子) の水性懸濁液は、この化合物がすでに形成された脂質粒子に添加され、かつこの粒子の形成の間に脂質溶液に溶解されない場合 (これは通常、従来技術の場合である) に、親油性化合物を可溶化するはるかに高い能力を有することが見出された。従って、本発明は分子会合物を可溶化または形成するための組成物を包含し、これはさらに、2つのコンテナの内容物が混合されるまで、薬学的に受容可能な親水性媒体 (例えば、エタノール) 中の溶液としてか、または粉末もしくは凍結乾燥物としてのいずれかで、第1のコンテナ中に収容される、低い水溶性を有する化合物、ならびに第2のコンテナ中に収容される少なくとも1つの膜脂質粒子の別個の懸濁液を含む。脂質粒子はさらに、主成分として少なくとも1つの膜脂質を含む。必要に応じて、薬学的に受容可能な賦形剤および成分 (例えば、安定化剤および保存剤) が、1つまたは両方のコンテナ中に存在し得るか、またはさらなるコンテナ中に存在し得る。本発明の別の局面において、この親油性化合物をこの別個の脂質粒子の予備形成された懸濁液中に負荷する方法が、提供され、この方法は、2つのコンテナの内容物を混合して、分子会合物を形成する工程を包含する。分子会合物を含有する得られる組成物は、注射に特に適切であるが、他の用途にも使用され得る。本発明に従う方法は、高い負荷効率および実用性によって特徴付けられる。親油性組成物をリボソーム中に懸濁する従来の方法と比較して、分割および分子会合による負荷は、簡単である。調製および外部材料を除去するために実施される操作の間に、pHを変更する必要性はない。この方法は、特に、pHの考慮および条件から独立して水性媒体に対して難溶性である化合物の分子会合を可能にする。本発明に従う方法によって、安定性および貯蔵の問題は、回避され得る。

10

20

【0029】

親油性化合物は、親水性溶媒中の溶液として、または粉末としてのいずれかで、調製される。非常に親油性であるかまたは不安定な化合物について、結晶形態を、より容易に溶解し得るアモルファス形態に変換することが、好ましくあり得る。これは、安定化剤を用いてかまたは用いずに、沈殿および/もしくは凍結乾燥、または任意の他の方法 (例えば、ミリング) によって、実施され得る。親油性化合物は、適切な親水性媒体中に溶解してか、または凍結乾燥粉末としてのいずれかで (両方とも、必要に応じて他の賦形剤を含む)、バイアルまたは他のタイプの容器に収容される。

30

【0030】

(方法)

代表的には、別個の脂質粒子の水性懸濁液は、大量調製される。この脂質分散物は、0.5% w/w ~ 25% w/w の間、好ましくは20% w/w 未満、最も好ましくは5% w/w ~ 15% w/w の間の、少なくとも1つの膜脂質、好ましくはリン脂質を含み、これは水性媒体に懸濁され、必要に応じて、溶媒および界面活性剤 (例えば、胆汁酸塩) を含む。50 μm までの平均粒径を有する脂質懸濁液を生じる任意の生成方法が、用いられ得る。特に好ましい実施形態において、水性脂質懸濁液を、高圧ホモジナイズまたは高圧ホモジナイザーでの押し出しに供して、1000 nm 未満、好ましくは300 nm 未満、最も好ましくは100 nm 未満のサイズを有し、透明であるかまたは光学的に透明な懸濁液を生成する低い多分散指数を有する粒子を得る。このサイズは、光子相関分光法を使用して、光子Z平均直径を示す。光学的に透明な懸濁液は、2つのコンテナの内容物が、適用 (例えば、注射) の直前に、インサイチュで一緒に混合される適用において望まれる特徴である。従って、光学的に透明な脂質懸濁液が、非常に望ましいが、他の適用 (例えば、経口用途) のための親油性化合物を会合する目的のための本発明の必須の特徴ではない。本発明の重要な特徴は、透明性とも層状性とも関係なく、脂質粒子の予備形成された懸濁液へ

40

50

の親油性化合物の最大の負荷を得ることである。この懸濁液は、大量生成され得、そして大量生成のために適切な第2のコンテナ (container) または容器 (vessel) 中に収容され、そしてバイアルのような個々の単位コンテナに移される。この懸濁液は、特定の投与経路、用いられる脂質の型、および低い水溶性を有する化合物の割合に依存して、小胞、非小胞またはその組み合わせであり得る。この組成物は、濾過により滅菌され得、そして適切なゴム栓を備えた個々の滅菌バイアルに無菌的に充填され得る。あるいは、これらのバイアルおよび内容物は、最後に滅菌され得る。

【0031】

バイアルまたはコンテナの1つの内容物は、必要に応じて、使用直前にインサイチュで分子会合物を形成するために、他のコンテナに加えられ、そして混合され得る。あるいは、より安定な化合物について、調製されたかまたは十分に負荷された脂質懸濁液は、長期間の貯蔵のためのより小さなコンテナに移され得る。あるいは、この脂質懸濁液は、任意の適切な方法 (例えば、流動床乾燥またはスプレー乾燥) によって、凍結乾燥または乾燥され得る。この負荷方法は、迅速かつ実用的であり、そして80% w/w以上、好ましくは90% w/w以上、最も好ましくは99% w/w以上の会合効率を達成し得る。脂質粒子または凍結乾燥物質の懸濁液は、これ自体、ボラス用量としての注射に特に適切であるか、またはこれは、注射流体に濃縮物として添加され得る。これはまた、他の目的 (例えば、吸入のためのネブライザーにおいて、および局所適用のため) に使用され得る。第2のコンテナ中の脂質懸濁液が、光学的に透明である場合、任意の会合していない組成物は、拒絶され得る。小さな粒径によって、分子会合物は、非経口投与前に安全フィルターを通過し得る。

10

20

【0032】

(光学的に透明)

バイアル中の懸濁液が透明であるか、または光学的に透明、すなわち、入射光の透過を可能にすることが、特に非経口用途のための本発明の所望される特徴である。これは、透明性および濁りについての目視検査によって、判断され得る。透明性は、最初に、脂質濃度に依存して、例えば、660nm、または最も適切な波長で、1cmの透過セルを使用して、決定される。第2の決定は、負荷プロセス (IPL) の後に行われ、透過値の差異は負荷効率を示す。これは、分子的に分散していない任意の会合していない化合物が、より大きな粒子として沈殿し、そして初期の懸濁液の濁りを増加させるという事実に基づく。一般に、第2のコンテナ中の脂質粒子の初期の懸濁液は、少なくとも40%、好ましくは60%、最も好ましくは80%より多くの光を透過させるのに十分透明でなければならない。これらの初期値を基準値として使用して、沈殿物も会合していない薬物も実質的に含まない同じ脂質粒子の負荷懸濁液は、透過を、25%以下、好ましくは10%以下、最も好ましくは5%以下減少してはならない。この方法は、負荷懸濁液が使用時に作製される必要がある場合に、本発明の負荷効率を評価するための速くかつ信頼性のある手段を与える。

30

【0033】

投与前の注射用組成物のインサイチュの調製について、沈殿した薬物粒子についての目視検査を可能にするために、光学的に透明な脂質懸濁液が好ましい。ほとんどの他の適用 (例えば、経口投与) について、光学透明性は必須の特徴でなくてもよい。

40

【0034】

薬物との分子会合物に変換される脂質粒子の懸濁液は、特定の型の脂質粒子に制限されないことが、明確に理解されるべきである。しかし、静脈内用途について、小胞構造が好ましくあり得る。得られる脂質粒子の型は、ジアシル~モノアシルの膜脂質成分の組み合わせに依存し、そしてW098/58629 (PCT / GB 98 / 01803) (これは本明細書中で参考として援用される) に記載されている。

【0035】

(親油性化合物)

本発明は、難水溶性化合物を可溶化するために特に適切であり、この化合物は、約10m

50

g より多い単回用量で投与され、そして周囲温度において、脱イオン水に対して 10 mg / 100 ml 未満の溶解度を有する。本発明は、1 mg / 100 ml 未満の水溶解度を有する化合物、およびリポタンパク質上に結合する親油性化合物に特に適切である。難水溶性を有する生物学的に活性な親油性化合物の代表的な例としては、中性環状ペプチド（例えば、シクロスポリン A、タクロリムスまたはマクロライド（例えば、ラパマイシン））のような疎水性免疫抑制剤が挙げられる。

【0036】

第1のコンテナ中の親油性化合物は、この化合物に適合性であり、かつ脂質の負荷を促進する他の賦形剤を含み得ることがさらに理解されるべきである。必要に応じて、この賦形剤は、共沈殿物として溶液中にか、または凍結乾燥粉末としてのいずれかで、組成物の微量成分として含まれる、バルク剤、膜脂質、好ましくは荷電した脂質、胆汁酸塩または脂肪酸の塩であり得る。

10

【0037】

(脂質)

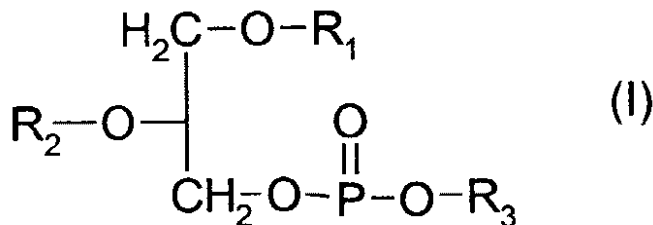
薬物対脂質の比は、代表的には、重量部で、1 : 2 ~ 1 : 200 の間、好ましくは、1 : 5 ~ 1 : 100 の間、最も好ましくは、1 : 5 ~ 1 : 50 の間である。

【0038】

この脂質は、少なくとも1つの膜脂質を含み、好ましくは、以下の式の少なくとも1つのリン脂質、またはこのような化合物の塩を含む：

【0039】

【化3】



20

ここで、

R₁ は、C₁₀ ~ C₂₀ アシルを表し；

R₂ は、水素または C₁₀ ~ C₂₀ アシルを表し；

R₃ は、水素、2 - トリメチルアミノ - 1 - エチル、2 - アミノ - 1 - エチル、C₁ ~ C₄ アルキル、カルボキシで置換された C₁ ~ C₅ アルキル、カルボキシおよびヒドロキシで置換された C₂ ~ C₅ アルキル、カルボキシおよびアミノで置換された C₂ ~ C₅ アルキル、イノシトール基またはグリセリル基を表す。

【0040】

このリン脂質は、中性であり得るか、または荷電され得る。このリン脂質は、二重鎖または一本鎖で、両親媒性であり得る。二重鎖を有する中性のリン脂質の例は、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) およびスフィンゴミエリンである。荷電したリン脂質の例は、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) およびホスファチジルグリセロール (PG) である。炭化水素鎖は、不飽和または飽和のいずれかであり得、そして 10 ~ 24 の間、好ましくは 14 ~ 18 の間の炭素原子を有し得る。

30

40

【0041】

一本鎖脂質は、中性または荷電したリン脂質のモノアセチル誘導体であるが、これはまた、糖脂質およびスフィンゴリピドのモノアセチル誘導体であり得る。脱アセチル化は、ホスホリパーゼ A2 酵素加水分解または化学的手段によって、行われ得る。この炭化水素鎖は、不飽和または飽和のいずれかであり得、そして 10 ~ 24 の間、好ましくは 14 ~ 1

50

8の間の炭素原子を有し得る。この脂質は、天然の植物供給源、または動物供給源もしくは微生物供給源（合成されたかまたは部分的に合成されている）由来であり、ポリエチレングリコール（PEG）由来のモノアセチルリン脂質（例えば、ペグ化モノアセチルホスファチジルエタノールアミン）が挙げられる。

【0042】

他の膜脂質（例えば、糖脂質、セラミド、ガングリオシドおよびセレブロシド）を、リン脂質の代わりに、またはリン脂質の部分的置換として使用し得る。好ましい膜脂質は、ホスファチジルコリン（PC）である。最も好ましいジアシルホスファチジルコリンは、大豆PCであり、次いで、卵PC、POPC、およびOOPCである。最も好ましいモノアセチル対応物は、酵素改変（ホスホリパーゼA2）大豆PC、次いで、卵PC、1-パルミトイルPC、1-オレイルPC、1-ステアロイルPCである。

10

【0043】

脂質粒子は、ジアシル脂質またはモノアシル脂質全体を単独で含むか、またはこの脂質粒子は、モノアシル成分およびジアシル成分の混合物を、最終用途に依存して、酵素加水分解によって得られる任意の組み合わせで含む得る。

【0044】

（親水性溶媒）

水混和性の薬学的に受容可能な溶媒の例は、以下である：エタノール、96% エタノール、無水グリセロール、プロピレングリコール、乳酸エチル、プロピレングリコール300、ポリエチレングリコール400、1,3-ブタンジオール、コハク酸ジエチルエステル、クエン酸トリエチル、セバシン酸ジブチル、ジメチルアセトアミド、DMSO、グリセリンホルマル、グリコフロール（glycofuro1）（テトラグリコール）、イソプロパノール、乳酸ブチルエステル、N-メチルピロリドン、ソルケトール（solketol）、炭酸プロピレン、二酢酸プロピレングリコール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、トリアセチン。この親水性溶媒は、必要に応じて水を含み得る。好ましくは、この組成物は、非経口用途または静脈内用途のために、2つのコンテナの内容物の混合の後に、最終製品中の溶媒の15% w/wより多くを含むべきである。

20

【0045】

（他の薬学的に受容可能な賦形剤）

任意の他の薬学的に受容可能な賦形剤が、安定剤または保存剤のいずれかとして存在し得る。これらは、脂質懸濁液を含む第2のコンテナ中、または溶液または凍結乾燥粉末としての活性化化合物を含む第1のコンテナ中に含まれ得る。安定剤の例は、等張剤および緩衝剤（例えば、糖および塩）、または酸化防止剤（例えば、酢酸トコフェロール、パルミチン酸アスコルビル）である。保存剤の例は、抗菌剤（例えば、メチルパラベンおよびブチルパラベン）である。第1のバイアルはまた、賦形剤を含み得、この賦形剤は、ポリエチレングリコール3000およびポリエチレングリコール4000、糖（例えば、マンニトールおよびラクトースおよびサッカロース）のように、凍結乾燥の際にケーキを形成し得る。さらに、この第1のバイアルは、脂質の溶解度および負荷を改善する他の賦形剤（例えば、モノアシル膜脂質およびジアシル膜脂質（例えば、卵PC、大豆PC、大豆PG、脂肪酸およびそれらの塩）、ポリソルベート80のような界面活性剤、ポロキシマーおよびCremophor EL）を含み得る。

30

40

【0046】

以下の実施例は、限定するためではなく、本発明およびその有用性を例示するために示される。本発明は、例示される化合物にも実施例に代表的に示される製造規模にも限定されることを意図しない。

【実施例】

【0047】

（実施例1）

10mgのミコナゾールおよび1mgのPOPGを、0.25gのエタノールに溶解し、

50

そしてバイアル中に維持する。2.5 gの10%リン脂質(98%大豆ホスファチジルコリンおよび2%卵PG)の混合物を得、そして10 mlの蒸留水中で水和する。この脂質分散物を、高圧ホモジナイザー(Emulsiflex C5, Avestin)に通して、光学的に透明な懸濁液を得る。この脂質粒子は、100 nmより小さい。第1のバイアルの内容物を、第2のバイアル中のこの透明な脂質分散物に添加し、そして振盪する。この得られた分子会合物の分散物は、透明であり、光透過の減少はない。ミコナゾールの90%以上が、この脂質粒子に移り、そして分析的濾過およびHPLC分析によって、確認し得る。この脂質分散物を、ネブライザーを使用する吸入により投与し得るか、またはこれを、局所的に適用し得る。

【0048】

10

(実施例2)

10 mgのトリクラベンダゾール(triclabendazole)および5 mgのオレイン酸ナトリウムを、50 mgのラクトースを含有する5 mlの脱イオン水を含む第1のコンテナ中で、0.5 mlのエタノールに溶解する。オレイン酸ナトリウムの代わりに、胆汁酸塩または荷電した膜脂質を使用し得る。得られる分散物を、直ちに凍結し、そして凍結乾燥して、ケーキを得る。このケーキに、高圧ホモジナイザーにより生成した2.5 gの10%リン脂質分散物(98%卵PC)を添加する。この分散物の外観は、このケーキに添加した後、透明なままである。光透過の減少は、10%未満である。

【0049】

20

(実施例3)

低い水溶解度(0.00008 g/l)および179 °Cの融点を有する抗ウイルス性活性化合物C₂₉H₂₁N₅SFを、以下のようにして脂質粒子に結合する：

25 mgの抗ウイルス性化合物を、PGを含むPEG400/エタノール(1:1 v/v)(2.5 mg/ml、975 mg)に溶解し、そして第1のバイアル中に維持する。

【0050】

12% w/wのリン脂質懸濁液を、実施例1のようにして、2.5% w/wグリセロールを室温で分散させ、続いてAvestin高圧ホモジナイザーに通すことによって調整する。光子相関分光法により測定される場合、この脂質粒子の平均粒径は、約40 nmである。これを、第2のバイアル中に維持する。

【0051】

30

本発明に従う抗ウイルス性化合物の即時分配負荷を、バイアルを穏やかに振盪しながら、第1のバイアル中の有機薬物溶液0.4 mlを第2のバイアル中の脂質粒子10 mlに添加することによって、無菌条件下で予め形成する。この得られる脂質懸濁液は、54 nmの粒径を有し、そして沈殿した薬物粒子を含まず、そして直接注射され得るか、または静脈内使用のために滅菌5% w/wグルコースで希釈した後に、注射され得る。この実施例における脂質粒子は、電子顕微鏡により決定されるように、単層小胞構造である。脂質の異なる組み合わせを使用して、形成された会合物は、非小胞構造または混合ミセル構造であり得る。この得られる分散物は、24時間より長い間、物理的に安定である。この薬物と結合した脂質粒子はまた、経口投与に適切である。

【0052】

40

(実施例4)

この実施例において、第1のコンテナは、96%エタノール中の10% w/wのシクロスポリンAおよび1%の卵ホスファチジルグリセロールの溶液を含むバイアルである。

【0053】

第2のバイアルは、実施例3で調整された10% w/wリン脂質を含む脂質粒子の懸濁液を含む。

【0054】

脂質粒子のシクロスポリンAでの即時負荷を、バイアルを穏やかに振盪しながら、第1のバイアルからの薬物溶液0.06 mlを第2のバイアル中の脂質懸濁液3 mlを注入することにより、無菌条件下で行う。この脂質懸濁液は、38 nmの粒径を有し、そして沈殿

50

した薬物物質を含まない。この得られた懸濁液は、24時間より長い間物理的に安定である。これを、直接か、または静脈内投与のための滅菌5% w/w グルコースで希釈した後注射する。あるいは、これを、経口的に与え得るか、または局所的に適用し得る。

【0055】

(実施例5)

1gのシクロスポリンAおよび0.1gの卵ホスファチジルグリセロールを、3.0mlのtert-ブタノールに溶解し、0.2μmのフィルターを通して滅菌濾過し、そして凍結乾燥によって溶媒を除去して、長期の安定性を有する乾燥投薬形態を得る。これを第1のコンテナ中に維持する。使用(投与)の直前に、10mlのエタノール96%をこのコンテナに添加し、その後、この内容物を、実施例4に記載されるように、脂質懸濁液を含む第2のコンテナと混合する。この方法は、エタノール性溶液中でさえ乏しい貯蔵安定性を有する化合物に特に適切である。

10

【0056】

(実施例6)

この実施例において、5mgのパクリタキセル(SIGMA, 97%純粋)および5mgの卵ホスファチジルグリセロール/mlを、無水エタノールに溶解し、そして第1のコンテナ中に維持する。この第1のコンテナの200μlのパクリタキセル溶液を、2mlの脂質懸濁液(上記の実施例におけるようなホスファチジルコリンおよびPGの5% w/w リン脂質分散物、および1.25% w/w グリセロールおよび2.5% w/w グルコースを含む)を含む第2のコンテナに添加する。パクリタキセルを含む得られる脂質分散物は、沈殿した薬物結晶を含まず、そして静脈内投与または経口投与に適切である。経口投与について、脂質ブレンドは、50% w/wまでのモノアシルホスファチジルコリンを含み得る。光透過の減少は、5%未満である。得られた分散物は、24時間より長い間、物理的に安定である。比較すると、第1のコンテナの200μlのパクリタキセル溶液を脂質粒子を含まない5%グルコースを含む第2のコンテナに添加する場合、粗沈殿物が形成され、これは投与のために適切ではない。

20

【0057】

パクリタキセルの代わりに、他のタキサンを使用して、モノアシル誘導体を含む脂質成分の種々の組み合わせを使用して、代替のタイプの脂質粒子との脂質会合物を形成し得る。代替の脂質粒子および脂質混合物を使用する理由は、薬物分子と脂質成分との分子会合物を得るためである。

30

【0058】

(実施例7)

低い水溶解度(2mg/ml)および2.5mg/ml未満のプロピレングリコールに対する溶解度、および2.5mg/ml未満のPEG400に対する溶解度を有する抗癌化合物C₁₀H₇N₅SBrを、以下のようにして脂質粒子に結合する。

【0059】

100gの抗癌化合物を、1.0lのDMSOに溶解し、そして第1のコンテナ中に維持する。この溶液を、20mlあたり125mgの薬物物質の濃度になるまで、さらに希釈する。

40

【0060】

1% w/w リン脂質懸濁液を、脂質を50mM Na₂HPO₄(pH7.0)に室温で分散させることによって調製する。脂質粒子は、1.0~12μmのサイズ範囲内の多層小胞である。これを、第2のバイアル中に維持する。

【0061】

本発明に従う抗癌化合物の負荷を、バイアルを穏やかに振盪しながら、第1のバイアル中の有機薬物溶液20mlを第2のバイアル中の脂質粒子懸濁物250mlに添加することによって、行う。この得られた脂質懸濁液は、沈殿した薬物粒子を含まない。0.22μmのフィルターを通す濾過/押出しおよびHPLCによる測定の後、薬物の100%がこのフィルターを通過し得ることが見出される。リン酸緩衝液中の脂質と比較すると、薬物

50

物質の 98% が、このフィルター上に保持される。

【0062】

(実施例 8)

第 1 および第 2 のコンテナの内容物を混合するための代替の手順。親油性薬物を脂質分散物に負荷するために、第 1 のバイアル中の内容物は、第 2 のバイアルの内容物と混合されなければならない。

【0063】

【表 1】

第1のコンテナ	第2のコンテナ
水混和性溶媒中の親油性薬物	脂質粒子の水性分散物
有機溶媒の凍結乾燥から得られる乾燥形態の親油性薬物	脂質粒子の水性分散物
水性懸濁液の凍結乾燥から得られる乾燥形態の親油性薬物	脂質粒子の水性分散物

10

(要旨)

本発明は、親油性化合物との分子会合物を形成するための組成物、および難溶性化合物を予め形成された脂質粒子の水性懸濁液に負荷する改善された方法に関する。非経口用途のための好ましい実施形態は、第 1 のコンテナ中に維持される透明な脂質懸濁液を含み、ここで、平均脂質粒子サイズは、1000 nm 未満であり、好ましくは、300 nm 未満である。これは、第 1 のコンテナ中の溶液または凍結乾燥物としていずれかの親油性化合物を、第 2 のコンテナ中に含まれる脂質粒子の水性懸濁液と混合して、分子会合物を形成する工程を包含する。このプロセスは、即時分配負荷 (IPL) として記載され得る。最小の撹拌のみが必要とされる。この手順は、延長した貯蔵のための負荷懸濁液の生成のために使用され得るか、または病棟においてまたは病床における使用の直前に、インサイチュで密閉滅菌ユニット内で即時に実施され得る。

20

【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
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/080883 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 9/127, 9/107 (74) Agents: SCHREIBER, Wolfgang, F. et al.; Riederer Hasler & Partner, Patentanwälte AG, Bleisstrasse 8, CH-7510 Bad Ragaz (CH).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/05371 (81) Designated States (national): AI, 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, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 26 March 2002 (26.03.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, 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).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01 302 841.0 27 March 2001 (27.03.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARES PHARMACEUTICAL RESEARCH N.V. [NL/NL]; 14 John B Gorslaweg, P.O. Box 3889, Curacao (AN).
- (72) Inventors: and (75) Inventors/Applicants (for US only): LEIGH, Steven [GB/CH]; Phares Drug Delivery AG, P.O. Box, Kriegackerstrasse 30, 4132 Muttenz (CH); LEIGH, Matthew, Louis, Steven [GB/CH]; Phares Drug Delivery AG, P.O. Box, Kriegackerstrasse 30, 4132 Muttenz (CH); VAN HOOGEVEST, Peter [NL/CH]; Bnsitenstrasse 3, CH-4416 Bubendorf (CH); TIEMESSEN, Henricus [NL/DE]; Dinkelbergstrasse 2, 79576 Weil am Rhein (DE).
- 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 02/080883 A2

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR SOLUBILISING A BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND WITH LOW WATER SOLUBILITY

(57) Abstract: Compositions for forming molecular associates with lipophilic compounds and an improved method of loading lipophilic biologically active compounds into previously formed, aqueous suspensions of lipid particles. A preferred embodiment for injection purposes comprise lipid particles having sizes below 1000 nm in diameter, in a vial or other suitable container are described. The method involves mixing a lipophilic compound either in solution or as an amorphous, preferably lyophilised powder in a first container with an aqueous suspension of lipid particles contained in a second container to form molecular associates. Only minimum agitation is required. The entire procedure may be carried out instantly in situ, in sealed sterile units just prior to use in the hospital ward or by the bedside.

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

**Method and composition for solubilising a biologically active compound
with low water solubility**

The present invention relates to a composition and a method for solubilising a biologically active compound with low water solubility.

In this specification, the following definitions apply:

"Lipid" refers to membrane lipids which include phospholipids, glycolipids, ceramides, gangliosides and cerebroside. The term as used herein refers to lipids of one single type only as well as to mixtures thereof, including enzyme modified versions.

"Lipid suspension" refers to an aqueous dispersion of discrete lipid particles comprising at least one membrane lipid as the major component or constituent.

"Compounds" are biologically active substances that have a physiological and/or pharmacological effect in a living organism.

"Container" means an ampoule or vial with rubber stopper and cap, single or double chamber syringe, infusion bag or bottle made from polymeric materials or glass, suitable for parenteral administration. It also includes any vessel for holding liquids.

"Low water solubility" means any compound that requires more than 10 parts of water to dissolve 1 part of the compound. It spans the definitions between sparingly soluble (from 10 to 30) to very slightly soluble (from 1000 to 10'000) as defined in USP 24. The description includes lipophilic and hydrophobic compounds.

"Molecular associates" are complexes formed with the compound and the lipids whereby the molecules are homogeneously dispersed or solubilised in the lipid.

"Molecular association" between compound and lipid molecules is achieved if not more than 20% of un-associated test material is retained on a 200 nm polycarbonate membrane filter after filtration of the lipid mixture containing the test material with distilled water.

CONFIRMATION COPY

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

2

"Loading" means incorporating or transferring compounds into lipid particles to form molecular associates.

A major problem in delivering biologically active compounds concerns poor aqueous solubility of the compounds. The problem applies in particular to lipophilic compounds that are administered by parenteral or intravenous injection. Because of its low solubility, the compound may precipitate before or after an iv injection or infusion and cause capillary blockage. As a result of precipitation and aggregation, sufficient concentrations of the drug may not be available to bind on to lipoproteins in order to be transported to target receptors and organs. Therefore, it is necessary to solubilise lipophilic compounds to elicit the required therapeutic effects.

In the prior art, ethanol and aqueous solutions of detergents like Cremophor EL® or polysorbate 80 are commonly used to solubilise lipophilic compounds. Alternatively, they may be complexed with hydroxypropyl-beta-cyclodextrins or dissolved in an oil/water emulsion system. However, precipitation of the drug on dilution of the organic solvent is a problem and anaphylaxis following injection with Cremophore EL is not an unknown problem. Oil-in-water emulsions are restricted to compounds with sufficient oil solubility. Furthermore, the compounds may accelerate physical instability of oil-in-water emulsions and some may not be stable to withstand heat sterilisation or storage. Liposomes comprising phospholipid vesicles are sometimes used to deliver poorly water soluble compounds such as amphotericin. The low toxicity and high tolerability of phospholipids make liposomes an attractive vehicle for delivering lipophilic compounds. However, a wider commercial use of lipid particles containing lipophilic drugs requires problematic and expensive manufacturing procedures to associate the lipophilic drug with the lipids. Examples of such procedures include high shear and/or high pressure homogenisation, controlled organic solvent dilution, cross flow filtration to produce aqueous liposomal suspensions containing the drug (see e.g. Isele, U.; Van Hoogevest, P.; Hilfiker, R.; Capraro, H-G.; Schieweck, K. and Leuenberger, H., Large-Scale Production of Liposomes Containing Monomeric Zinc Phthalocyanine by Controlled Dilution of Organic Solvents, *J. Pharm. Sci.* (1994), 83, 1608-1616.). Even if production problems can be overcome, the majority of drugs and phospholipid are chemically or physically unstable in water in the solubilised state and will need to be lyophilised for storage. The problem here is that lyo-

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

3

philised liposomes may require expensive synthetic or semi-synthetic lipids with high phase transition temperatures to maintain physical stability on reconstitution, further adding to already high costs.

- 5 In numerous prior art references the use of phospholipids to solubilise compounds with low water solubility is described:

WO 98/58629 describes lipid compositions comprising at least one monoacyl lipid, e.g. monoacyl phospholipid and mixtures of mono acyl and diacyl phospholipids that are effective in carrying lipophilic compounds in molecular form. The compositions may be a
10 waxy solid, a paste-like material or a viscous fluid suitable for filling into hard or soft gelatine capsules. There is no mention of an extemporaneous preparation of an injectable drug formulation.

The preparation of lipid-drug co-precipitates using diacyl phospholipids to increase the
15 dissolution behaviour of poorly water soluble drug solvates, and the possibility of modifying drug release from such dispersions by incorporating small amounts (<0.05%) of polyvinyl pyrrolidone is described in J. Pharm. Sci. 81, 283-286 (1992). The compositions are prepared essentially by co-precipitation and result in the incorporation of lipid in the crystalline structure of the solvate. The residual solvent trapped in the solvate crystals is
20 given as a possible reason for the improved solubility of the poorly water soluble compound. An in situ preparation of an injectable drug formulation is not described.

WO 86/05694 describes the use of non-esterified fatty acids and monoglycerides together
25 with minor amounts of a monoacyl lipid (lyso phosphatidylcholine) to form solid particles which show improved oral absorption for various lipophilic compounds. Improved oral absorption is explained to be due to the unique properties of the mixture. An in situ preparation of an injectable drug formulation is not described.

US-A-5,091,188 discloses injectable compositions and methods for rendering insoluble or
30 poorly soluble powders more stable, by stabilising the external surfaces with one or more layers of phospholipids to prevent the particles of drug from agglomeration during stora-

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

4

ge. The drug is not in molecular dispersion and an in situ preparation of an injectable formulation is not described.

5 WO 99/49846 discloses compositions and procedures that yield sub-micron and micron size stable particles of water-insoluble drugs together with phospholipids, a charged surface modifier and a block copolymer adhered to the surfaces to prevent the particles from particle growth, aggregation or flocculation in suspension. The particles are not in molecular dispersion with the lipid molecules. High shear mixing by means of multiple passes through a micro fluidiser is necessary to reduce the size of the drug particles. There is no
10 mention of an extemporaneous preparation of an injectable drug formulation.

WO 99/65469 discloses submicron particles of water-insoluble drugs, prepared simultaneously by stabilising microparticulate suspensions of the drug with surface modifier molecules eg a phospholipid, by rapid expansion into an aqueous medium from a compressed solution of the compound and surface modifiers in a liquified gas. The particles of
15 the drug are surface stabilised in the suspension and prevented from agglomerating. The particles are not in molecular dispersion and there is no mention of an in situ preparation of an injectable drug formulation.

20 EP-A-0 795 585 discloses a process for preparing finely divided suspensions of a particulate retinoid or caretinoid in a volatile, organic solvent mixed with aqueous medium in the presence of a physiologically compatible emulsifying agent. An example of the various emulsifying agents used is a hydrolysed lecithin (Emulfluid E) which contains a substantial amount of non polar oils and free fatty acids ie < 45%. The retinoid or caretinoid is not in molecular dispersion. The described compositions are not suitable for parenteral use.
25

EP-B-0 256 090 describes the use of a specific monoacyl lipid, i.e. lyso-phosphatidyl-ethanolamine, alone or in combination with other diacyl phospholipids to solubilise hydrophobic materials inside small unilamellar vesicle (SUV) suspensions. There is no
30 mention of an in situ preparation of an injectable drug formulation.

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

5

EP-B-0 158 441 relates to pro-liposome compositions based on membrane lipids, to a method of making lipid vesicles by the addition of aqueous fluid to these compositions, and to aqueous dispersions of vesicles. The compositions contain water soluble, or oil-soluble biologically active compounds. They may also contain an organic solvent suitable
5 for injection purposes, such as ethanol. An in situ preparation of an injectable drug formulation is not described.

WO 97/25977 discloses a process for extemporaneous preparation of an oil-in-water fat emulsion composition comprising a cyclosporin, a rapamycin or an ascomycin or a derivative thereof, which comprises the step of admixing to a placebo fat emulsion a concentrate comprising the active, a stabiliser (e.g. phospholipid) and an organic solvent. There is no mention of an in situ preparation of an injectable composition comprising lipid particles wherein the major component is a phospholipid containing a poorly soluble compound and the patent is explicitly on cyclosporins, rapamycins and ascomycins and their
15 derivatives only.

US-A-5,747,066 and US-A-4,158,707 describe mixed micelles for the aqueous solubilisation of active substances which are only poorly soluble or insoluble in water to obtain a solution with improved storage properties which consist of a phosphatide and a bile salt. There
20 is no mention of an in situ preparation of an injectable drug formulation.

US-A-5,192,549 discloses a method of amphipatic drug loading into liposomes by pH gradient, whilst US-A-5,316,771 describes amphipatic drug loading into liposomes by ammonium ion gradient. US-A-5,380,531 also describes a method for an accumulation of amino acids and peptides into liposomes. These three examples are restricted to loading of pre-formed liposomes with compounds which are water soluble and possess a basic function which can be protonated.
25

In US-A-5,616,341, high drug:lipid formulations of liposomal antineoplastic agents are provided. Liposomes may be made by a process that loads the drug by an active mechanism using a transmembrane ion gradient, preferably a transmembrane pH gradient.
30 Using this technique, trapping efficiencies approach 100%, and liposomes may be loaded

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

6

with drug immediately prior to use, eliminating stability problems related to drug retention in the liposomes. Drug:lipid ratios employed are about 3-80 fold higher than for traditional liposome preparations, and the release rate of the drug from the liposomes is reduced. An assay method to determine free antineoplastic agents in a liposome preparation is also disclosed. The disclosed method is restricted to loading of ionizable antineoplastic agents and the therapeutic use of this approach is clearly intended.

It is apparent that there exists a practical need for an efficient method to associate lipophilic drugs with lipid particles. An object of the present invention is to provide an improved method to solubilise hydrophobic compounds as molecular associates in lipid particles wherein the major component comprises at least one membrane lipid, particularly but not exclusively intended for parenteral use. It is an aim of the invention to provide sterile compositions that may be prepared in situ, just prior to use, to avoid stability and storage problems. It is a further object of the invention to provide a method that is reproducible, commercially viable and cost effective, practical and can be validated. It is also an object that the components used are safe, readily available and can be rendered sterile. It is yet a further object that the invention may be used in medical applications, clinical research and pre-clinical screening applications, such as, i.e., in-vitro cell or in-vivo animal efficacy/toxicity studies, and for solubilising compounds in lipid carriers that may be processed further for internal and external applications.

20

The present invention addresses the aforementioned aspects in providing cost effective, simple compositions and a method which avoids production and stability problems. Furthermore, it allows the use of reliable and cost effective phospholipids without the need to use expensive synthetic or semi-synthetic lipids. Unexpectedly, it has been found that the present invention allows compounds which have low solubility in aqueous media to form molecular associates spontaneously and instantaneously with membrane lipid suspensions comprising discrete particles wherein the major constituent is at least one membrane lipid, when they are mixed together. Furthermore the invention allows the two components to be kept apart in separate containers until the moment of mixing. The poorly soluble compound may be dissolved in a hydrophilic medium or it may be present in a dry powder form. Preferably, the lipid suspension is transparent and the resulting

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

7

composition comprising lipid associates is particularly suitable for parenteral use but may also be applied for oral, pulmonary and topical administrations to a living organism.

5 The lipid suspension and the compound are prepared as separate compositions and held in two separate containers. The lipophilic compound in the first container is preferably dissolved in a hydrophilic medium or presented as a powder or lyophilisate. The lipid suspension in the second container is suitable for long term storage and can be manufactured using standard high pressure homogenisers and/or extruders. It may be sterile filtered and in some cases even heat sterilised. Shortly before administration the contents of one container is added to the other. Because of the lipophilicity of the compound and the extensive surface area presented by the discrete lipid particles, the compound partitions preferentially into the lipid and forms molecular associates. Therefore, as loading is effected instantly by means of partition and molecular association, the process may be described as Instant Partition Loading (IPL).

15

Surprisingly it has been found that an aqueous suspension of finely divided lipid particles, i.e. preformed particles comprising at least one membrane lipid as the major component or constituent has a much higher capacity for solubilising lipophilic compounds if the compound is added to already formed lipid particles and not dissolved in a lipid solution during formation of the particles, which is usually the case in the prior art. Thus, the invention comprises a composition for solubilising or forming molecular associates which further comprises a compound with low water solubility held in a first container either as a solution in a physiologically acceptable hydrophilic medium, e.g. ethanol, or as a powder or a lyophilisate, and a discrete suspension of at least one membrane lipid particles held in a second container, until the contents of the two containers are admixed. The lipid particles further comprise at least one membrane lipid as the major component. Optionally physiologically acceptable excipients and components such as stabilisers and preservatives may be present in one or both containers or in still a further container. In another aspect of the invention, a method of loading said lipophilic compounds into a preformed suspension of said discrete lipid particles is provided which involves mixing the contents of the two containers to form molecular associates. The resulting composition comprising molecular associates is particularly suitable for injection but may also be used for other applications. The method according to the invention is characterised by a high

20

25

30

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

8

loading efficiency and practicality. Compared to prior art methods of sequestering lipophilic compounds in liposomes, the loading by means of partitioning and molecular association is straightforward. There is no need for pH alterations during preparation or other manipulations to be carried out to remove extraneous material. The method particularly allows the molecular association of compounds which are poorly soluble in aqueous media independent of pH consideration and condition. By the method in accordance with the invention stability and storage problems may be avoided.

The lipophilic compound is prepared either as a solution in a hydrophilic solvent or as a powder. For highly lipophilic or unstable compounds, it may be preferable to convert the crystal form to an amorphous form that is more readily soluble. This may be carried out by precipitation and/or lyophilisation or any other methods such as milling, with or without stabilisers. The lipophilic compound is held in a vial or other types of vessel either dissolved in a suitable hydrophilic medium or as a lyophilised powder, both containing optionally other excipients.

Method

Typically, an aqueous suspension of discrete lipid particles is prepared in bulk. The lipid dispersion comprises between 0.5% w/w to 25% w/w, preferably below 20% w/w, most preferably between 5% w/w to 15% w/w, of at least one membrane lipid, preferably a phospholipid, suspended in an aqueous medium, optionally containing solvents and surfactants such as bile salts. Any production method that results in a lipid suspension with an average particle size up to 50 μm may be employed. In particularly preferred embodiments, the aqueous lipid suspension is subjected to high pressure homogenisation or extrusion in a high pressure homogenizer to obtain particles having a size of less than 1000 nm, preferably less than 300 nm, most preferably below 100 nm, with a low polydispersity index to produce a transparent or optically clear suspension. The size refers to the Z average diameter using photon correlation spectroscopy. An optically clear suspension is a desired feature in those applications where the contents of the two containers are mixed together in situ just before application e.g. injection. Therefore optically clear lipid sus-

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

9

pensions are a highly desirable but not an essential feature of the invention for the purpose of associating lipophilic compounds for other applications, e.g. oral use. The important feature of the invention is to obtain maximum loading of lipophilic compounds into pre-formed suspensions of lipid particles regardless of clarity or lamellarity. The suspension may be produced in volume and held in a second container or vessel suitable for volume production and transferred into individual unit containers such as a vial. The suspension may be vesicular, non-vesicular or combinations depending on the particular route of administration, the type of lipid employed and the properties of the compound with low water solubility. The composition may be sterilised by filtration and aseptically filled into individual sterile vials fitted with suitable rubber closures. Alternatively, the vials and contents may be terminally sterilised.

The content of one of the vials or containers may be added to the other as appropriate and mixed to form molecular associates in situ, just prior to use. Alternatively for those compounds that are more stable, the prepared or fully loaded lipid suspension may be transferred to smaller containers for long term storage. Alternatively, the lipid suspension may be lyophilised or dried by any suitable method such as fluidised bed drying or spray drying. The method of loading is rapid and practical and capable of achieving association efficiency of 80%w/w or more, preferably 90%w/w or more, most preferably 99%w/w or more. The suspension of lipid particles or the lyophilised material is particularly suitable for injection as a bolus dose as such or it may be added as a concentrate to infusion fluids. It may also be used for other purposes, e.g. in a nebuliser for inhalation and for topical applications. In cases where the lipid suspension in the second container is optically clear, any unassociated material can be seen clearly in the transparent suspension in the vial and the imperfect composition can be rejected. The small particle size allows the molecular associates to pass a safety filter prior to parenteral administration.

Optical clarity

It is a desirable feature of the invention, particularly for parenteral use, that the suspension in the vial is transparent or optically clear i.e. allows the transmission of incident light. This may be judged by visual inspection for transparency and turbidity. Preferably, the

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

10

- clarity is determined initially at e.g. 660 nm or the most appropriate wave length depending on the lipid concentration, using a 1cm transmission cell or cuvette. If a second determination is carried out after the loading process (IPL), the difference in the transmitted value reflects the loading efficiency. It is based on the premise that any unassociated compound that is not molecularly dispersed will precipitate out as larger particles and increase the turbidity of the initial suspension. Generally the initial suspension of lipid particles in the second container should be sufficiently clear to allow at least 40%, preferably 60%, most preferably more than 80%, of light to be transmitted. Using these initial values as benchmarks, a loaded suspension of the same lipid particles substantially free from precipitates or unassociated drug should not decrease transmission by more than 25%, preferably not more than 10%, most preferably not more than 5%. The method gives a fast and reliable means to assess the loading efficiency of the invention when the loaded suspension is required to be made up at the point of use.
- 15 For in situ preparation of injectable compositions before administration, an optically clear lipid suspension is preferred to allow visual inspection for precipitated drug particles. For most other applications such as in oral administration, optical transparency may not be an essential feature.
- 20 It is to be clearly understood that the suspension of lipid particles that are converted to molecular associates with the drug are not limited to a particular type of lipid particle. However, for intravenous use, vesicular structures may be preferred. The type of lipid particle obtained depends on the combination of diacyl to monoacyl membrane lipid component and has been described in WO 98/58629 (PCT/CB98/01803) which is hereby incorporated by reference.
- 25

Lipophilic Compound

The invention is particularly suitable for solubilising poorly water soluble compounds that are administered in single doses above about 10mg and have solubilities of less than

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

11

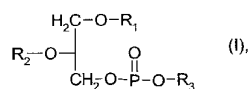
10 mg/100 ml in deionised water at ambient temperature. It is particularly suitable for compounds that have water solubilities of less than 1 mg/100 ml and lipophilic compounds that bind onto lipoproteins. Typical examples of biologically active lipophilic compounds that have poor water solubility, include hydrophobic immunosuppressants
 5 like neutral cyclic peptides eg. cyclosporin A, tacrolimus or a macrolide, e.g. a rapamycin.

It is to be understood further that the lipophilic compound in the first container may include other excipients which are compatible with the compound and facilitate the loading of the lipids. Optionally, the excipients may be bulking agents, membrane lipids, preferably charged lipids, bile salts or salts of fatty acids included as minor components in
 10 the composition either in solution, as a co-precipitate or as a lyophilised powder.

Lipid

The ratio of drug to lipid is typically between 1:2 to 1:200, preferably 1.5 to 1:100, most preferably 1.5 to 1:50 parts by weight.

The lipid contains at least one membrane lipid, preferably at least one phospholipid of the formula



20 wherein

R₁ represents C₁₀-C₂₀acyl;

R₂ represents hydrogen or C₁₀-C₂₀acyl;

R₃ represents hydrogen, 2-trimethylamino-1-ethyl, 2-amino-1-ethyl, C₁-C₅alkyl, C₁-C₅alkyl substituted by carboxy, C₂-C₅alkyl substituted by carboxy and hydroxy, C₂-C₅alkyl substituted by carboxy and amino, an inositol group or a glyceryl group or a salt of such
 25 compound.

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

12

The phospholipid may be neutral or it may be charged. It may be a double chain or a single chain amphiphath. Examples of neutral phospholipids with double chains are, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and sphingomyelin. Examples of charged phospholipids are phosphatidic acid (PA), phosphatidyl inositol (PI) and phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG). The hydrocarbon chain can either be unsaturated or saturated and can have between 10 to 24, preferably 14 to 18 carbon atoms.

The single chain lipid is the monoacyl derivative of a neutral or charged phospholipid, but it can also be the monoacyl derivative(s) of glycolipids and sphingolipids. Deacylation may be carried out by phospholipase A2 enzyme hydrolysis or by chemical means. The hydrocarbon chain can either be unsaturated or saturated and can have between 10 to 24, preferably 14 to 18 carbon atoms. The lipids may be derived from natural plant, or animal or microbiological sources, synthesised or partially synthesised, including polyethyleneglycol (PEG) derived monoacyl phospholipids, eg. pegylated monoacyl phosphatidyl ethanolamine.

Other membrane lipids, such as glycolipids, ceramides, gangliosides and cerebroside can be used in place of, or in partial replacement of phospholipids. The preferred membrane lipid is phosphatidylcholine (PC). Most preferred diacyl phosphatidylcholine is soy PC, followed by Egg PC, POPC, and OOPC. Most preferred monoacyl counterpart is enzyme modified (Phospholipase A2) soy PC, followed by Egg PC, 1-palmitoyl PC, 1 oleoyl PC, 1-stearoyl PC.

The lipid particles may comprise entirely of a diacyl lipid or a monoacyl lipid on its own or it may contain mixtures of the monoacyl and diacyl components in any combination obtained by enzyme hydrolysis, depending on the end use.

Hydrophilic solvent

Examples of water miscible, pharmaceutically acceptable solvents are: ethanol, 96% ethanol, absolute glycerol, propylene glycol, ethyl lactate, polyethylene glycol 300, polyethy-

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

13

- lene glycol 400, 1,3 butandiol, succinic acid diethyl ester, triethyl citrate, dibutyl sebacate, dimethyl acetamide, DMSO, glycerineformal, glycofurol (tetraglycol), isopropanol, lactic acid butyl ester, N-methylpyrrolidone, solketal, propylene carbonate, propylene glycol diacetate, tetrahydrofurfuryl alcohol, diethylene glycol mono ethyl ether, triacetin. The
- 5 hydrophilic solvent may optionally include water. Preferably the composition should not contain more than 15% w/w of solvent in the final product after mixing the contents of the two containers, for parenteral or iv use.

Other pharmaceutically acceptable excipients

- 10 Optionally other pharmaceutically acceptable excipients may be present, either as stabilisers or preservatives. They may be included in the second container holding the lipid suspension or in the first container holding the active compound in solution or as a lyophilised powder. Examples of stabilisers are isotonic and buffer agents, e.g. sugars and salts, or anti-oxidants, e.g. alpha tocopherol acetate, ascorbyl palmitate. Examples of preservatives
- 15 are anti-microbials, e.g. methyl paraben and butyl paraben. The first vial may also contain excipients which are able to form a cake upon lyophilisation, like polyethylene glycol 3000 and polyethylene glycol 4000, sugars such as mannitol and lactose and saccharose. Furthermore, the first vial may contain other excipients which improve solubility and the loading of the lipids, e.g. mono- and diacyl membrane lipids such as egg PC, soy
- 20 PC, soy PG, fatty acids and salts thereof, surfactants like polysorbate 80, poloxamer and Cremophor EL.

- The following examples are given to illustrate the invention and its utility and not by way of limitation. The invention is not limited to the compounds exemplified or the scale of
- 25 the production typically shown in the examples.

Example 1

10 mg of miconazole and 1 mg of POPG are dissolved in 0.25 g of ethanol and held in a vial. 2.5 g of a 10% phospholipid (98% soya phosphatidylcholine and 2% egg PC) mixture

is obtained and hydrated in 10 ml distilled water. The lipid dispersion is passed through a high pressure homogeniser (Emulsiflex C5, Avestin) to obtain an optically clear suspension. The lipid particles are smaller than 100 nm. The content of the first vial is added to the clear lipid dispersion in the second vial and shaken. The resulting dispersion of molecular associates is clear and there is no decrease in the light transmission. Over 90% of the miconazole is transferred to the lipid particles and may be confirmed by analytical filtration and HPLC analysis. The lipid suspension may be administered by inhalation using a nebuliser or it may be applied topically.

10 Example 2

10 mg of triclabendazole and 5 mg of sodium oleate are dissolved in 0.5 ml ethanol in a first container with 5 ml of deionised water containing 50 mg of lactose. In place of sodium oleate a bile salt or a charged membrane lipid may be used. The resultant dispersion is immediately frozen and lyophilised to produce a cake. To this cake 2.5 g of a 10% phospholipid dispersion (98% egg PC) produced by high pressure homogenisation is added. The appearance of the dispersion remains clear after the addition to the cake. The decrease in light transmission is less than 10%.

Example 3

20 An antiviral compound $C_{22}H_{21}N_5SF$ active with low water solubility (0.00008 g/l), melting point 179°C is associated with lipid particles as follows:

25 mg of the antiviral compound is dissolved in 975 mg of PEG400/ethanol (1:1 v/v) containing PG (2.5 mg/ml) and held in a first vial.

25 A 12%w/w phospholipid suspension as in Example 1 is prepared by dispersing the lipid in 2.5%w/w glycerol at room temperature, followed by passage through an Avestin high pressure homogeniser. The mean particle size of the lipid particles as measured by photon correlation spectroscopy is ca. 40 nm. This is held in a second vial.

Instantant partition loading of the antiviral compound according to the invention is performed under aseptic conditions by adding 0.4 ml of the organic drug solution in the first vial to 10 ml of lipid particles in the second vial while gently swirling the vial. The resulting lipid suspension has a particle size of 54 nm and is free from precipitated drug particles and may be injected directly or after dilution with sterile 5%w/w glucose for intravenous use. The lipid particles in this example are unilamellar vesicular structures as determined by electron microscopy. Employing different combinations of lipid, the associations formed may be non vesicular or mixed micellar structures. The resulting dispersion is physically stable for more than 24 hours. The lipid particles associated with the drug are also suitable for oral administration.

Example 4

In this example, the first container is a vial which contains a solution of 10% w/w of cyclosporin A and 1% of egg-phosphatidylglycerol in 96 % ethanol.

A second vial contains a suspension of lipid particles comprising 10% w/w phospholipid prepared as in example 3.

The instantaneous loading of the lipid particles with cyclosporine A is performed under aseptic conditions by injecting 0.06 ml of the drug solution from the first vial into 3 ml of lipid suspension in the second vial, while gently swirling the vial. The lipid suspension has a particle size of 38 nm and does not contain precipitated drug substance. The resulting dispersion is physically stable for more than 24 hours. It may be injected either directly or after dilution with sterile 5% w/w glucose for intravenous administration. Alternatively, it may be given orally or applied topically.

Example 5

1 g cyclosporin A and 0.1 g egg-phosphatidyl glycerol are dissolved in 3.0 ml tert-butanol, sterile, filtered through a 0.2 µm filter and the solvent removed by lyophilisation to obtain a dry dosage form with long term stability. This is held in the first container. Shortly before use (administration) 10 ml ethanol 96 % is added to the container before the contents

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

16

are admixed with a second container containing a lipid suspension, as described in Example 4. This method is particularly suitable for compounds that have poor storage stability even in ethanolic solution.

5 Example 6

In this example, 5 mg paclitaxel (SIGMA, 97 % pure) and 5 mg Egg phosphatidylglycerol/ml are dissolved in absolute ethanol and held in a first container. 200 μ l of the paclitaxel solution from the first container is added to a second container containing 2 ml of a lipid suspension comprising 5 %w/w phospholipid dispersion of phosphatidylcholine and PG as in the previous examples, and 1.25 %w/w glycerol and 2.5 % w/w glucose. The resulting lipid dispersion containing paclitaxel is free of precipitated drug crystals and suitable for intravenous or oral administration. For oral administration, the lipid blend may contain up to 50%w/w of monoacyl phosphatidylcholine. The decrease in light transmission is less than 5%. The resulting dispersion is physically stable for more than 24 hours. By comparison, when 200 μ l of the paclitaxel solution from the first container is added to a second container containing 5% glucose without lipid particles, a coarse precipitate is formed which is not suitable for administration.

In place of paclitaxel, other taxanes may be used to form lipid associates with alternative types of lipid particles using various combinations of lipid components including monoacyl derivatives. The reason in using alternative lipid particles and lipid mixtures is to obtain molecular association of the drug molecules with the lipid components.

Example 7

An anticancer compound $C_{10}H_7N_5SBr$ with low water solubility (2 mg/ml), and solubility in propylene glycol < 2.5 mg/ml, in PEG 400 < 2.5 mg/ml is associated with lipid particles as follows.

100 g of the anti-cancer compound is dissolved in 1.0 l of DMSO and held in a first vessel. This solution is further diluted to a concentration of 125 mg drug substance per 20 ml.

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

17

A 1 % w/w phospholipid suspension is prepared by dispersing the lipid in 50 mM Na_2HPO_4 pH 7.0 at room temperature. The lipid particles are multilamellar vesicles within the size range of 1.0 to 12 μm . This is held in a second vial.

- The loading of the anticancer compound according to the invention is carried out by adding 20 ml of the organic drug solution in the first vial to 250 ml of the lipid particles suspension in the second vial while gently swirling the vial. The resulting lipid suspension is free from precipitated drug particles. After filtration/extrusion through a 0.22 μm filter and measurement by means of HPLC it is found that 100 % of the drug is able to pass the filter. By comparison without lipid in the phosphate buffer, 98 % of the drug substance is retained on the filter.

Example 8

Alternative procedures for mixing the contents of the first and second containers.

- 15 To load the lipophilic drug into the lipid dispersion, the contents of the first vial should be mixed with the contents of the second vial (or vice versa).

First container	Second container
Lipophilic drug in water miscible solvent	Aqueous dispersion of lipid particles
Lipophilic drug in dry form obtained from lyophilisation of an organic solvent	Aqueous dispersion of lipid particles
Lipophilic drug in dry form obtained from lyophilisation of an aqueous suspension	Aqueous dispersion of lipid particles

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

18

Summary

The present invention is concerned with compositions for forming molecular associates with lipophilic compounds and an improved method of loading poorly soluble compounds into previously formed, aqueous suspensions of lipid particles. The preferred embodiment for parenteral use comprises a clear lipid suspension held in a second container where the average lipid particle size is below 1000 nm, preferably below 300 nm. It involves mixing a lipophilic compound either in solution or as a lyophilisate in a first container with an aqueous suspension of lipid particles contained in a second container to form molecular associates. The process may be described as Instant Partition Loading (IPL). Only minimum agitation is required. The procedure may be used for production of loaded suspensions for extended storage or carried out instantly in situ, in sealed sterile units just prior to use in the hospital ward or by the bedside.

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

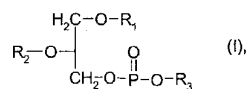
19

Claims:

1. A composition for forming molecular associates comprising:
 - 5 a) a biologically active compound having low water solubility dissolved in a physiologically acceptable hydrophilic solvent or in powder form held in a first container with optionally other excipients
 - b) an aqueous suspension of lipid particles comprising at least one membrane lipid present as the major component held in a second container with optionally
10 other excipients and
 - c) optionally containing other physiologically acceptable excipients.
2. The composition of claim 1, wherein the the aqueous lipid suspension comprises
15 lipid particles having a size of less than 1000 nm, preferably below 300nm, and having a low polydispersity index.
3. The composition of claim 1, wherein the the aqueous lipid suspension comprises lipid particles having an average particle size above 1 micron.
- 20 4. The composition of any one of the preceeding claims, wherein the membrane lipid is substantially free from non-polar lipids.
5. The composition of any one of the preceeding claims, wherein the membrane lipid
25 is selected from the group consisting of phospholipids, glycolipids, sphingolipids, ceramides, gangliosides and cerebrosides.

6. The composition of claim 5, wherein the membrane lipid is monoacyl or diacyl phosphatidylcholine or a mixture thereof, the diacyl phosphatidylcholine preferably being selected from the group comprising soy PC, Egg PC, POPC, and OOPC, and the monoacyl phosphatidylcholine preferably being selected from the group comprising enzyme modified (Phospholipase A2) soy PC, Egg PC, 1-palmitoyl PC, 1-oleoyl PC, and 1-stearoyl PC.

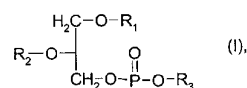
7. The composition according to any one of the preceding claims, wherein the membrane lipid is of the formula



wherein

- R_1 represents C_{10} - C_{20} acyl;
 R_2 represents hydrogen or C_{10} - C_{20} acyl; and
 R_3 represents hydrogen, 2-trimethylamino-1-ethyl, 2-amino-1-ethyl, C_1 - C_4 alkyl, C_1 - C_5 alkyl substituted by carboxy, C_2 - C_5 alkyl substituted by carboxy and hydroxy, C_2 - C_5 alkyl substituted by carboxy and amino, an inositol group or a glyceryl group or a salt of such compound.
8. The composition of any one of the preceding claims wherein the lipid particles in the second container comprises at least one membrane lipid present as the major component.

9. A method of forming molecular associates with a biologically active compound having low water solubility which involves mixing the contents of a first container containing a biologically active compound with low water solubility dissolved in a physiologically acceptable hydrophilic solvent or in powder form with the contents of a second container containing a suspension of lipid particles comprising at least one membrane lipid present as the major component and, optionally other physiologically acceptable excipients.
10. The method of claim 9, wherein the contents of the second container includes a dispersion of lipid particles comprising between 0.5% w/w to 25% w/w, preferably below 20% w/w, most preferably between 5% w/w to 15% w/w of at least one membrane lipid, preferably a phospholipid, suspended in an isotonic, isohydric aqueous medium, optionally containing solvents and surfactants such as bile salts.
11. The method of claim 10, wherein the membrane lipid is of the formula



wherein

R₁ represents C₁₀-C₂₀acyl;

R₂ represents hydrogen or C₁₀-C₂₀acyl; and

R₃ represents hydrogen, 2-trimethylamino-1-ethyl, 2-amino-1-ethyl, C₁-C₃alkyl, C₁-C₃alkyl substituted by carboxy, C₂-C₃alkyl substituted by carboxy and hydroxy, C₂-C₃alkyl substituted by carboxy and amino, an inositol group or a glyceryl group or a salt of such compound.

12. The method according to any of claims 9 to 11, wherein the aqueous lipid dispersion is subjected to high pressure homogenisation and extrusion in a high pressure homogenizer to obtain particle sizes below 300 nm, preferably smaller than 100 nm.

WO 02/080883

PCT/EP02/03371

22

13. The method according to any one of claims 9 to 12 where the lipid particles in the second container are vesicular, non vesicular or combinations.
- 5 14. The method of any one of claims 9 to 13 where the lipid particles in the second container allows transmission of at least 40% of incident light when measured at a wave length of 660 nm or an appropriate maxima in a 1 cm cell.
- 10 15. The method according to any one of claims 9 to 14, wherein the contents of the first container is an amorphous powder which is prepared by precipitation and/or lyophilisation from a solution of a lipophilic compound in a solvent.
- 15 16. The method of any one of the preceding claims, wherein the loaded lipid suspension is dried.

【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
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/080883 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 9/127, 9/107 (74) Agents: SCHREIBER, Wolfgang, F. et al.; Riederer Hasler & Partner, Patentanwälte AG, Flestastrasse 8, CH-7510 Bad Ragaz (CH).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/03371 (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 26 March 2002 (26.03.2002) (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, TJ, 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).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01 302 841.0 27 March 2001 (27.03.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARES PHARMACEUTICAL RESEARCH N.V. [NL/NL]; 14 John B Gorslaweg, P.O. Box 3889, Curaçao (AN).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): LEIGH, Steven [GB/CH]; Phares Drug Delivery AG, P.O. Box, Kriegackerstrasse 30, 4132 Muttenz (CH). LEIGH, Mathew, Louis, Steven [GB/CH]; Phares Drug Delivery AG, P.O. Box, Kriegackerstrasse 30, 4132 Muttenz (CH). VAN HOOGEVEST, Peter [NL/CH]; Bnsitenstrasse 3, CH-4416 Bubendorf (CH). TIEMESSEN, Henricus [NL/DE]; Dinkelbergstrasse 2, 79576 Weil am Rhein (DE).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 11 December 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 02/080883 A3

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR SOLUBILISING A BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND WITH LOW WATER SOLUBILITY

(57) Abstract: Compositions for forming molecular associates with lipophilic compounds and an improved method of loading lipophilic biologically active compounds into previously formed, aqueous suspensions of lipid particles. A preferred embodiment for injection purposes comprise lipid particles having sizes below 1000 nm in diameter, in a vial or other suitable container are described. The method involves mixing a lipophilic compound either in solution or as an amorphous, preferably lyophilised powder in a first container with an aqueous suspension of lipid particles contained in a second container to form molecular associates. Only minimum agitation is required. The entire procedure may be carried out instantly in situ, in sealed sterile units just prior to use in the hospital ward or by the bedside.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal application No PCT/EP 02/03371
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/127 A61K9/107		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 974 364 A (YOSHITOMI PHARMACEUTICAL) 26 January 2000 (2000-01-26) paragraphs '0009!'-'0011! paragraph '0021! paragraphs '0023!', '0024! examples 1,13 claim 25	1-14
X	WO 88 06442 A (LIPOSOME CO INC) 7 September 1988 (1988-09-07) page 10, line 14 -page 11, line 31 page 28, line 20 -page 29, line 30 page 32, line 34 -page 35, line 26 example 1 claim 32 & US 5 616 341 A 1 April 1997 (1997-04-01) cited in the application -/--	1-16
<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 *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2003	Date of mailing of the international search report 05/02/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Epskamp, S	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: application No
PCT/EP U2/03371

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 331 755 A (TEIJIN LTD) 13 September 1989 (1989-09-13) page 4, line 49 -page 5, line 6 page 7, line 40 - line 51 examples 1,5 claims	1-15
X	WO 00 16770 A (DIETL HANS) 30 March 2000 (2000-03-30) page 7, paragraph 3 example 1	1-14

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internet application No
PCT/EP 02/03371

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 0974364	A	26-01-2000	EP 0974364 A1 WO 9818492 A1	26-01-2000 07-05-1998
WO 8806442	A	07-09-1988	AT 137670 T AU 620545 B2 AU 1481688 A AU 635435 B2 AU 8141791 A AU 645332 B2 AU 8141891 A BR 1100687 A3 CA 1338702 A1 DE 3855265 D1 DE 3855265 T2 DK 98189 A EP 0290296 A2 EP 0719546 A1 ES 2088385 T3 GR 3020725 T3 HK 1007500 A1 IE 75713 B1 IE 960340 L IL 85608 A JP 2502458 T JP 2882607 B2 KR 9613703 B1 LU 90717 A9 MX 9203808 A1 US 6083530 A WO 8806442 A1 US 5616341 A US 5744158 A US 5795589 A	15-05-1996 20-02-1992 26-09-1988 18-03-1993 07-11-1991 13-01-1994 10-10-1991 08-02-2000 12-11-1996 13-06-1996 12-12-1996 01-03-1989 09-11-1988 03-07-1996 16-08-1996 30-11-1996 16-04-1999 24-09-1997 05-09-1988 15-07-1992 09-08-1990 12-04-1999 10-10-1996 15-03-2001 01-07-1992 04-07-2000 07-09-1988 01-04-1997 28-04-1998 18-08-1998
EP 0331755	A	13-09-1989	DE 3883206 D1 DE 3883206 T2 EP 0331755 A1 WO 8902265 A1 JP 2688235 B2 US 5229422 A	16-09-1993 03-02-1994 13-09-1989 23-03-1989 08-12-1997 20-07-1993
WO 0016770	A	30-03-2000	DE 19843968 A1 AU 6194899 A WO 0016770 A1	13-04-2000 10-04-2000 30-03-2000

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 47/44	A 6 1 K 47/44	
// A 6 1 K 31/4174	A 6 1 K 31/4174	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10	

(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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 リー, スティーブン

スイス国 4 1 3 2 ムッテンツ, クリーガッカーシュトラーセ 3 0, ピー.オー. ボックス, フェアーズ ドラッグ デリバリー アーゲー

(72) 発明者 リー, マシュー ルイス スティーブン

スイス国 4 1 3 2 ムッテンツ, クリーガッカーシュトラーセ 3 0, ピー.オー. ボックス, フェアーズ ドラッグ デリバリー アーゲー

(72) 発明者 ヴァン フーゲヴェスト, ピーター

スイス国 ツェーハー - 4 4 1 6 ブベンドルフ, ブライテンシュトラーセ 3

(72) 発明者 ティーメッセン, ヘンリカス

ドイツ国 7 9 5 7 6 ヴァイル アム ライム, ディンケルベルクシュトラーセ 2

F ターム(参考) 4C076 AA19 DD15E DD37E DD41E DD67E DD69E EE23E FF15

4C086 AA01 BC38 NA12 ZB32