

(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2006-504636

(P2006-504636A)

(43) 公表日 平成18年2月9日(2006.2.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 9/48 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/48	4 C O 7 6
<b>A 6 1 K 47/10 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/10	
<b>A 6 1 K 47/26 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/26	
<b>A 6 1 K 47/32 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/32	
<b>A 6 1 K 47/34 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/34	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-508943 (P2004-508943)	(71) 出願人	504433607
(86) (22) 出願日	平成15年6月3日 (2003.6.3)		ジン, ツオ
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月24日 (2005.1.24)		中国 ティアンジン 300070, ナン
(86) 国際出願番号	PCT/CN2003/000431		カイ ディストリクト, クジャンタイ ロ
(87) 国際公開番号	W02003/101600		ード, ナンバー 406
(87) 国際公開日	平成15年12月11日 (2003.12.11)	(74) 代理人	100083932
(31) 優先権主張番号	60/384, 971		弁理士 廣江 武典
(32) 優先日	平成14年6月3日 (2002.6.3)	(74) 代理人	100121429
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 宇野 健一
(31) 優先権主張番号	60/418, 100	(74) 代理人	100129698
(32) 優先日	平成14年10月11日 (2002.10.11)		弁理士 武川 隆宣
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100129676
(31) 優先権主張番号	10/291, 327		弁理士 ▲高▼荒 新一
(32) 優先日	平成14年11月8日 (2002.11.8)	(74) 代理人	100130074
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 繁元
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 構造的に脆弱な薬剤のための無障害のマイクロカプセル化、及び安定水性－水性乳剤の応用

## (57) 【要約】

本発明は、タンパク質及びペプチド等の構造的に脆弱な作用物質の徐放送給のための方法を提供する。独自の乳剤系（安定高分子水性－水性乳剤）を使用することで、タンパク質及びペプチドは、有機溶媒、強い界面張力、強い剪断、高温、多量の界面活性剤、及び架橋剤といった何らかの化学的又は物理的障害の存在しない条件下で、多糖ガラス質粒子においてマイクロカプセル化できる。こうしたガラス質粒子に充填されたタンパク質は、分解性高分子マイクロスフェアに更に充填される時、有機溶媒に対する強い耐性と、水和状態での長期に渡る活性と、パースト及び不完全放出が最小限である優れた徐放性プロフィールとを示した。したがって、本発明は、タンパク質の徐放送給において生じる全ての技術的課題に対処する単純かつ効果的なアプローチを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水性 - 水性乳化を介して作用物質を粒子においてカプセル化する方法であって、

a . 作用物質を多糖分散相においてカプセル化することが可能な安定高分子水性 - 水性乳剤を提供するために、多糖類を水性 - 水性乳化の前記分散相として選択し、水性高分子を連続相として選択し、水性 - 水性乳化のための安定剤及びその濃度を選択するステップと、

b . 少なくとも一つの作用物質を提供するステップと、

c . 前記作用物質充填多糖粒子のサイズ及び形状を適切なサイズ範囲に制御するステップと、

d . 前記乳剤を乾燥させるステップと、

e . 前記乾燥分散相に浸透せず、前記充填済みの脆弱な作用物質（群）に影響を与えない溶媒（群）により前記試料を洗浄することで乾燥させた後、前記連続相を除去するステップと、を備える方法。

10

## 【請求項 2】

安定水性 - 水性乳剤を形成することが可能な、水性分散相と、水性連続相と、水性表面改質剤とを含む、請求項 1 記載の方法において使用された組成物。

## 【請求項 3】

前記水性 - 水性乳剤の前記分散相を形成可能であり、カプセル化された作用物質を保護可能である十分な量の多糖類又はその誘導体を含む、請求項 2 の組成物。

20

## 【請求項 4】

前記多糖類は、デキストランと、澱粉と、セルロースと及びその誘導体と、アガロース及び同様の構成を有する全てのタイプの多糖又はオリゴ糖とによって構成されたグループから選択される、請求項 3 の組成物。

## 【請求項 5】

前記多糖類の平均分子量は、2,000乃至2,000,000の範囲である、請求項 4 の組成物。

## 【請求項 6】

前記作用物質は、生物活性のある作用物質である、請求項 3 の組成物。

## 【請求項 7】

前記組成物質は、蛋白質と、ペプチドと、DNA/RNAと、リボソームと、生ウイルスとによって構成されたグループから選択される、請求項 6 の組成物。

30

## 【請求項 8】

前記蛋白質又はペプチドは、エリスロポエチン（EPO）と、顆粒求コロニー刺激因子（G-CSF）と、顆粒求マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）と、インタフェロン及び、成長ホルモンと、カルシトニンと、組織型プラスミノゲン活性化因子（TPA）と、第VII因子と、第IX因子と、ヒルジンと、dornabeと、その他の治療用タンパク質又はペプチドによって構成されたグループから選択される、請求項 7 の組成物。

## 【請求項 9】

更に、連続するステップ中の前記多糖分散相におけるカプセル化した作用物質の優れた保護のための補完的作用物質として、小分子の糖を含む、請求項 3 記載の組成物。

40

## 【請求項 10】

前記小分子の糖は、トレハロース、マンニトール、スクロース、ラクトース、又はグリセリンである、請求項 9 記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記水性 - 水性乳剤の前記連続相を形成するために、前記多糖類と不混和性である水性高分子を含む、請求項 2 記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記連続相内の前記水性高分子は、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレン

50

オキシド ( P E O )、ポリビニルピロリドン ( P V P )、又はポリビニルアルコール ( P V A ) である、請求項 1 1 記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記高分子の平均分子量は、2,000乃至2,000,000の範囲である、請求項 1 2 の組成物。

【請求項 1 4】

前記分散相の前記表面改質剤として、水性高分子を含む、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記高分子表面改質剤は、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸塩、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルデキストラン、硫酸デキストラン、及びその他のデキストラン又は澱粉誘導体、又は負に荷電したバックボーン及び正に荷電した対イオンを保有するその他の高分子から選択される、請求項 1 4 記載の組成物。 10

【請求項 1 6】

前記乳剤は、凍結乾燥、噴霧乾燥、又は従来の乾燥プロセスによって乾燥させ、前記作用物質カプセル化多糖分散相を固化する、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 1 7】

吸入用及び二重マイクロカプセル化用に1乃至5 µm、その他の用途のために1乃至50 µmの平均直径を有する、請求項 1 6 記載の方法によって作成した乾燥多糖分散相。

【請求項 1 8】

生物活性作用物質 ( 群 ) の制御放出のために、乾燥多糖分散相を生分解性高分子マイクロスフェアにおいてカプセル化する方法であって、 20

a) 前記乾燥多糖分散相を固相として、solid-in-oil-in-water ( S - O - W ) 又はsolid-in-oil-in-oil ( S - O - O ) 乳化プロセスを利用するステップと、

b) 生分解性高分子を選択し、前記高分子を有機溶媒に溶解し、前記乾燥多糖分散相を前記高分子溶液に懸濁させるステップと、

c) 小分子の塩の水溶液において前記生分解性高分子の前記溶液を分散させるために高分子界面活性剤 ( 群 ) を選択するステップと、

d) 前記塩溶液の濃度が0.5%乃至50%の範囲であるステップと、

e) 抽出又は蒸発により前記有機溶媒を除去するステップと、を備える方法。 30

【請求項 1 9】

前記生分解性高分子は、PLGA、ポリ疑似CBZセリン、又はその他のポリマーである、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

乾燥多糖分散相は、マトリクス内に分布する、請求項 1 8 記載の方法を使用して作成された分解性高分子の粒子。

【請求項 2 1】

前記生分解高分子に対する乾燥多糖分散相の比は、1:2乃至1:40の範囲内である、請求項 2 0 記載の粒子。

【請求項 2 2】 40

製薬用の、或いは製薬の用途で許容可能な、請求項 2 乃至 1 5 のいずれかの組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、製剤プロセス、保存、及び投与中に、蛋白質、ペプチド、DNA、リボソーム、生ウイルスの構造/活性を効果的に維持する新規な粒子ガラス質系を調製するための新規な方法を実証する。

関連出願

本願は、出典を明示することによりその開示内容全体を本願明細書の一部とする2002年6月3日提出の米国出願第60/384,971号及び2002年10月11日提出 50

の米国出願第 60 / 418 , 100 号に基く優先権を主張する。本願の全体では、様々な参考文献を参照する。こうした刊行物の開示は、本発明に関連する最新技術をより完全に説明するために、その全体を参照により本願に組み込むものとする。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

不浸透性と短い半減期とから、殆どの蛋白質治療法では、頻繁な注射が必要となる。注射の頻度を減らすために、徐放性投薬形態は、1970年代以降、長年に渡って研究の焦点となってきた(1)。広範な研究努力にもかかわらず(2)、現在に至るまで、徐放製剤技術は、一つの蛋白質薬物、即ち、組み換えヒト成長ホルモン(rhGH)のみでしか成功を収めていない。大きな障害となっているのは、常に、製剤プロセス及び放出部位における蛋白質の不安定性(3、4)と、初期バースト及び不完全放出とである。

10

##### 【0003】

過去30年間には、マイクロカプセル化において蛋白質安定性を改良するための様々な戦略が報告されている(3、5、6)。しかしながら、こうしたアプローチの多くは、一つ又は一部の問題に対処しているに過ぎず、他の未解決問題が残されており、或いは、新たな問題すら生み出されている。一部の方法は、特定の蛋白質のみで実行可能であり、一部の報告は、研究者の焦点が異なることから、互いに矛盾している。例えば、唯一市販されている有用な長期活性蛋白質である徐放性rhGHでは、蛋白質は、天然hGHが分泌顆粒において亜鉛と錯体を形成することに基づいて(8)、亜鉛イオンとの錯体を形成することで安定化された(7)。亜鉛が別の蛋白質、例えばエリスロポエチン(EPO)と共にカプセル化された時には、放出された蛋白質の40%までが凝集し、不要な免疫原性を発生させる場合があった。マイクロカプセル化において使用される有機溶媒から蛋白質を守るために、solid-in-oil-water(S-O-W)乳化プロセスによって蛋白質を分解性高分子マイクロスフェアへとマイクロカプセル化する前に、糖、無機塩類、又はその他の考えられる賦形剤を使用して、蛋白質を固体粒子へと予備的に製剤する(7、9、10)。こうした賦形剤は、その高い溶解性(11)と急速な溶解(12)とによって形成される強い浸透圧のため、多大なバースト放出を発生させる場合が多かった。高溶解性の硫酸アンモニアを使用して、EPOをマイクロカプセル化において安定させた時には、バースト放出は、全薬物の55%までを占めた(9)。

20

##### 【0004】

Clelland及びJonesは、water-in-oil-in-water(W-O-W)及びS-O-Wカプセル化プロセスにおけるrhGH及びインタフェロン(IFN-)に対する様々な賦形剤の影響を研究し、マイクロカプセル化プロセス中に蛋白質の凝集を防止するのに、マンニトール又はトレハロースが最良であることを発見した(6)。Sanchezらは、別の蛋白質、破傷風トキソイドに対する同様の賦形剤の保護効果を調査し、Clelland及びJonesの報告ではrhGH及びIFN-の回収に対して効果がなかったデキストランが水和条件下での放出相において(ELISAに基づいて)最良の保護を示すことを発見した(10)。小さな糖は脱水ステップ(乾燥)において優れた保護を提供するように見える一方で、多糖類は、水和ステップ(放出)において、より効果的である(13)。Sanchezらが調製したデキストラン含有PLGAマイクロスフェアでは、総充填量の60%のバースト放出が観察された。このバースト放出は、共に凍結乾燥させた蛋白質賦形剤粒子の粒子サイズが原因であり得る(14、15)。

30

40

##### 【0005】

予備形成された蛋白質粒子のサイズは、S-O-Wプロセスにおいて重要な役割を果たす。Moritaらは、固体蛋白質粒子の平均径が5µmから20µmに増加すると、初期放出がほぼ二倍となり、カプセル化効率が80%から20%に低下することを実証した(15)。Clellandらは、S-O-Wプロセス用に蛋白質粒子を低減するための様々なアプローチについて説明している(6)。凍結乾燥させた蛋白質賦形剤粉末を有機溶媒中で均質化しても、直径10µmを超える粒子が生成できるに過ぎず、一方、粉末をよ

50

り小さなサイズにミルで製粉すると、発生する剪断及び熱により、蛋白質を変性させ得る(6)。噴霧乾燥は、望ましいサイズで蛋白質粒子を生産し得るが、噴霧化時の剪断及び熱と、空気液体界面とにより、変性が生じ得る(6、16)。更に、噴霧乾燥及び噴霧凍結乾燥では、蛋白質とジクロロメタン(マイクロカプセル化において最も頻繁に使用される溶媒)との接触を促進する界面活性剤を使用する必要がある(6)。M a aらは、噴霧乾燥前のr h G Hの亜鉛との錯体化により、蛋白質の凝集を効果的に防止できることを報告した(16)。ここでも、亜鉛錯体化は、r h G H以外の蛋白質を変性させる可能性がある(9)。M o r i t aらは、蛋白質とP E Gとの共溶解による凍結誘導型沈殿で微細蛋白質粒子を調製した(15、17)。しかしながら、蛋白質粒子は、マイクロカプセル化中に、依然として、有機溶媒に直接的に晒す必要がある。保護されていない蛋白質がP L G Aに直接的に接触すると、高分子マトリクスの内部表面での蛋白質の強い吸着により、不完全な放出が生じる(18)。親水性-疎水性界面を回避するために、多糖粒子の調製には水性二相系が使用される(19、20)。しかしながら、分散相は、蛋白質変性の別の原因となる可能性がある共有又はイオン架橋によって安定化する必要がある。

10

#### 【0006】

脆弱な蛋白質の徐放のためには、こうした全ての重要な問題に対処できるアプローチが強く望まれる。上で説明した長年に渡る困難から、この課題を既存のアプローチで達成できる可能性は低いと思われる。新しい科学的概念に基づいたマイクロカプセル化戦略が必要となる。

#### 【0007】

20

我々の以前の特許出願の一つでは、独自のマイクロカプセル化系である安定高分子水性-水性乳剤を(我々の知る限りにおいて初めて)報告した(24)。この系は、分散相及び連続相の両方が水性である点において、従来の乳剤とは異なる。この系は、連続混合のない状態で二つの遮断相を形成する、いわゆる高分子水性二相系とも異なる。この乳剤は、何らかの(共有又はイオン)架橋処理なしで、一週間まで安定している。こうした独自の特徴のため、蛋白質、リボソーム、又は生ウイルスといった脆弱な治療物を、有機溶媒、濃縮塩類、極端なpH、架橋剤、高剪断応力、高界面張力、及び高圧といった化学的又は物理的障害のない条件下で、この乳剤の小滴に充填できる。凍結乾燥又はその他の乾燥法により、乳剤の分散相は、様々な送給の目的(吸入又は徐放)で、定められた形状及び均一なサイズのガラス質粒子を形成できる。我々の以前の作業では、蛋白質充填、乾燥、保存、及び放出といった蛋白質マイクロカプセル化において発生するあらゆる安定化の問題(3)に、この独自の系を使用して対処できる原理の証明を確立した。加えて、使用した原料は、全て人間への注射に関して検証済みのものである。

30

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

本願では、蛋白質薬物の送給において、この安定水性-水性乳剤系の応用を更に実証する。蛋白質は、水性-水性乳剤系の分散相へ充填し、その後の乾燥凍結によりガラス質粒子を形成できる。調製プロセスの全体では、いかなる化学的物理的障害も存在しない。蛋白質活性は、この調製プロセス中に十分に維持される。この乳剤系によって調製されるガラス質粒子(以降、アクアスフェア(A q u e S p h e r e)(群)と呼ばれる)に充填された蛋白質は、有機溶媒に対する強い耐性と、37での水和状態における長期的な活性とを示し、更に、分解性高分子マイクロスフェアに更に充填された時、最小限のバースト及び不完全放出を有する直線的放出プロフィールを示す。

40

#### 【0009】

本発明の目的は、蛋白質治療物の徐放のための高分子マイクロスフェアを調製する方法を提供することである。方法とは、我々の以前の特許出願(24)において説明した、安定高分子水性-水性乳剤という材料系と、アクアスフェア(A q u e S p h e r e、乳剤系の固化によって調製された多糖ガラス質粒子)との応用である。方法は、1)安定水性-水性乳剤系の小滴に蛋白質を充填することと、2)吸入蛋白質送給用の1乃至5ミクロ

50

ンの範囲の直径を有するアクアスフェアの調製と、3) PLGA及びその他の分解性高分子マイクロスフェア及び注射可能移植体でのアクアスフェアのカプセル化と、4) 吸入、鼻内噴霧、及びその他の治療的使用のための、蛋白質以外の構造的に脆弱な物質(リポソーム及び生ウイルス等)を充填したアクアスフェアの調製と、を備える。

#### 【0010】

徐放性又は非侵襲性蛋白質製剤の開発を遅らせた大きな難点は、蛋白質が製剤プロセス中に変性することである。蛋白質の変性を防止するために、製剤プロセスには、上で説明した化学的・物理的障害が存在してはならない(或いは蛋白質が保護されなくてはならない)。しかしながら、この目的の達成においては、粒子サイズ及び形状、放出プロフィール、充填効率、放出部位での長期的活性、及びその他といった、最終生産物の特性及び機能を低下させるべきではない。更に、製造プロセスを、容易で、再現可能で、環境に優しいものにできることが好ましい。

10

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明では、こうした上の全ての目的のための単純な解決策を実証している。

#### 【0012】

第一に、蛋白質のような壊れやすい生物剤は、何らかの化学的又は物理的障害のない条件下で安定高分子水性-水性乳剤系(24)の分散相に充填できる。小滴の均一なサイズ分布は、従来の乳化プロセスにより、(水性-水性の性質のため)適切な剪断応力及び低界面張力の下で達成できる。その後、この系を凍結乾燥し、乾燥粉末にすることが可能であり、高分子小滴は、均一なサイズ(直径1乃至5  $\mu\text{m}$ )のガラス質粒子へと転換される。ガラス質粒子が形成されると、充填物の構造は、維持及び保護される。その親水性及び高いガラス転移温度のため、この系は、有機溶媒に対する強い耐性を提供すると共に、(蛋白質活性保持に関して)周囲温度及び湿度に対する耐性を提供する。生物剤充填アクアスフェアは、したがって、(そのサイズ範囲に基づいて)吸入薬物送給に使用可能であり、或いは、徐放のための生分解性の疎水性高分子による更なる製剤プロセスを施すことができる。

20

#### 【0013】

徐放性マイクロスフェアの調製のために、アクアスフェアは、従来の solid-in-oil-in-water (S-O-W) 又は solid-in-oil-in-oil (S-O-O) 乳化法によって、PLGA(又はその他の分解性高分子)マイクロスフェアに充填できる。PLGAマイクロスフェアからの回収実験は、アクアスフェアがマイクロスフェアの内部で原形を保つことを示した(実施例4)。

30

#### 【0014】

アクアスフェアに充填された蛋白質の生物活性は、細胞増殖の測定において、有機溶媒との接触後、及びマイクロカプセル化プロセス後にも維持されており(実施例5、6、及び7)、多糖類のガラス質マトリクス内で蛋白質の構造が十分に保護されたことを示した。加えて、PLGAマイクロスフェア内でのマイクロカプセル化後の蛋白質の活性保持(実施例7)は、高いカプセル化効率を示唆している。

#### 【0015】

徐放性蛋白質投与形態の開発において最も困難な課題は、生理的温度の水和状態において蛋白質の活性を確保することである(21)。水和及び温度上昇は、蛋白質の可動性を高め、蛋白質の加水分解、凝集、及び構造変化のためのエネルギー障壁を低下させる。本技術により、アクアスフェアに充填された蛋白質は、37 の水和状態において長期的な活性を示した(実施例8)。8.5時間の in vitro 半減期及び一日の in vitro 半減期を有する組み換えヒトエリスロポエチン(rhEPO)は、アクアスフェアに充填された時、水和条件下で一週間の半減期を示した(実施例8)。アクアスフェアマトリクスは、蛋白質を取り囲む粘性相を形成したため、蛋白質の可動性と、蛋白質が互いに接触する機会及び他の種(分解性高分子及び酵素)に接触する機会とを限定した。

40

#### 【0016】

50

投与の初期期間における多大な量の充填物の急速な放出として定義されるバースト効果は、蛋白質薬物の徐放投与形態を開発する上で、別の共通する問題である。バースト効果は、注射可能移植体とマイクロスフェア製剤との両方で見られるが、原因は異なる場合がある。バースト効果には、充填された蛋白質の一部が高分子マトリクスと強く相互作用し、必要な期間に放出できない不完全放出が付随する。分解性高分子への充填前にアクアスフェアにおいてカプセル化された蛋白質は、バースト効果を効果的に防止可能であり、同時に、不完全放出の部分を低減できる（実施例 9）。

#### 【 0 0 1 7 】

更に、アクアスフェアは、高分子の分解によって発生する局所酸性を低減するのに役立つ。局所酸性は、放出期間中の蛋白質の変性の別の原因と考えられる。アクアスフェアは、水和されている際に、分解性高分子マトリクスにおいて相互接続チャネルを形成し、相互接続チャネルは、その粘着性で巨大分子蛋白質の拡散を制限するが、小分子緩衝剤には浸透可能となる。この性質により、徐放プロセスにおいて、局所酸性を緩衝できる。加えて、表面改質剤（アルギン酸ナトリウム）自体が、大きな緩衝効果を有する。

10

#### 【 0 0 1 8 】

本発明は、徐放性蛋白質マイクロスフェアの開発における、長年に渡るあらゆる技術的困難（3乃至5）に単純かつ効果的な解決策を提供する。

#### 【 発明を実施するための最良の形態 】

#### 【 0 0 1 9 】

本発明は、高分子水性 - 水性乳剤系 [ 2 4 ] を使用して、蛋白質及びその他の生物剤を徐放性投薬形態で送給する方法を提供する。生物剤を多糖溶液に加え、その後、乳化及び凍結乾燥する際に、その構造は、親水性ガラス質マトリクスにおいて「固定」される。こうしたガラス質粒子（アクアスフェア）は、報告済みの他のいかなる方法でも全てを達成することはできない一連の利点を提供する。

20

#### 【 0 0 2 0 】

予備的に保護された蛋白質の小さく均一な粒子サイズは、バースト放出の制御と、S - O - W又はS - O - Oマイクロカプセル化プロセスにおけるカプセル化効率の向上とにおいて重要な役割を果たす（6、13）。本発明は、有機溶媒と、強い界面張力と、強い剪断と、高温と、多量の界面活性剤と、（共有又はイオン）架橋剤との存在しない条件下で、定められた形状及び均一なサイズ（1乃至3  $\mu$ m、実施例 1 及び 2）の蛋白質充填多糖ガラス質粒子を調製する方法を提供する。こうした要素は、マイクロカプセル化プロセスの一つ又はいくつかのステップにおいて、蛋白質を変性させることが知られている（3、6、21）。しかしながら、上で説明したように、上記の障害による劣化なしで、蛋白質粒子を調製するために使用可能な（乳化、噴霧乾燥、噴霧凍結乾燥、凍結乾燥、製粉、in situ架橋を行わない）方法は、これまでに知られていない。

30

#### 【 0 0 2 1 】

加えて、多糖溶液は粘性が高く噴霧できないため、噴霧乾燥及び噴霧凍結乾燥は、低分子量の糖又は塩類を蛋白質安定剤とした粒子の調製にしか使用できない。本発明の安定乳化方法では、粘性水溶液を容易に分散させることができる。下で説明するように、多糖安定剤は、蛋白質の安定化及び動態について多数の利点を保持している。

40

#### 【 0 0 2 2 】

多糖粒子に充填すると、脆弱な蛋白質は、マイクロカプセル化プロセス中に、有機溶媒との接触から保護される。 - ガラクトシダーゼと、組み換えヒトエリスロポエチン（rhEPO）と、組み換えヒト顆粒求マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF）を、アクアスフェアに充填し、ジクロロメタン（DCM）による洗浄、及び/又はDCMを溶媒としたPLGAマイクロスフェアでのカプセル化を施した。こうした蛋白質の生物活性は、調製処理後の活性測定により決定されるものとして、十分に保持できる（実施例 5、6、及び 7）。有機溶媒との接触は、分解性高分子を使用したマイクロカプセル化プロセスにおける主要な化学的障害として考えられる（3）。

#### 【 0 0 2 3 】

50

有機溶媒に対する耐性に加え、アクアスフェアは、生理的溫度の水和状態における凝集及び構造変化から蛋白質を保護できる。こうした条件下で脆弱な蛋白質を保護することは、徐放性放出において最も困難な技術的ハードルとみなされている(21)。我々は、r h E P O、r h G M - C S F、及び - ガラクトシダーゼをそれぞれ充填した水和アクアスフェアを37 で培養し、蛋白質活性が十分に維持されることを発見した(実施例8)。r h E P Oでは、水和アクアスフェアにおける半減期が、B P S緩衝液におけるものの七倍の長さになった(図8及び実施例8)。r h G M - C S Fでは、九日間の培養後、生物活性における大幅な低下が存在しなかった(図9及び実施例8)。 - ガラクトシダーゼでは、アクアスフェアとトレハロース(同じ培養条件下で強く推奨される蛋白質安定剤(6)マトリクス)との間での比較を行った。アクアスフェアで保護された蛋白質は、一週間の培養後、トレハロースで保護されたものの五倍の活性を示した(図10及び実施例8)。

10

#### 【0024】

アクアスフェアは、分解性高分子マイクロスフェアにおいてカプセル化される時、長期の線形動態を有し、バーストの存在しない、理想的な放出プロファイルを提供する。ポリ乳酸-グリコール酸(P L G A)マイクロスフェアは、充填された巨大分子を三相で放出することが知られており(22)、これらは即ち、マイクロスフェアの表面領域(25)又は水が充填した内部の微細孔(14)に位置する分子の急速な拡散による初期バーストと、初期バースト後のラグ相と、高分子の大量の分解による加速放出とである。投与後の一日目に充填物の50%を超えた放出が起こり得るバースト効果は、多くの治療剤にとって危険となり得る。小さく均一なサイズのため、本方法によって調製された粒子は、分解性高分子のマトリクスにおいて均一に分布しており(実施例3)、表面での高い蛋白質分布は存在しない。加えて、容易に溶解し(高い浸透圧を引き起こし(11))、高分子マトリクスの外部へ急速に拡散する小分子量の蛋白質安定剤とは異なり、アクアスフェアは、水和時に拡散チャネルを満たす粘性相を形成する。多糖自体の分子が高分子マトリクスから徐々に拡散するため(23)、蛋白質のバーストは、粘性安定剤によって抑制可能である(実施例9)。更に、拡散プロセスは、分解プロセスと重複するように延長し、単相の放出動態を提供し得る(実施例9)。

20

#### 【0025】

充填蛋白質と分解性高分子との間の相互作用は、不完全な放出と不溶性の蛋白質凝集とを発生させる、もう一つの問題である(18)。本発明において、蛋白質分子は、放出期間全体で水和マイクロスフェアの側において粘性多糖類に囲まれており(23)、蛋白質-高分子接触の期間は低減される。図11では、P L G Aマイクロスフェア内で直接的にカプセル化されたミオグロビンと、アクアスフェアを介してカプセル化されたものとの間で、放出プロファイルを比較している(実施例9)。直接的マイクロカプセル化では、45日間に20%未満の充填蛋白質が放出された。一方、アクアスフェアを介したカプセル化では、同じ期間で、充填物の70%が放出された。

30

#### 【0026】

P L G Aマトリクスにおける局所酸性は、蛋白質変性のもう一つの原因となる(3)。高分子が分解する時、分解産物(乳酸、グリコール酸、及びそのオリゴマ)は、高分子マトリクスの内部に捕らえられ、局所pHの低下を発生させ得る。我々の系において、アクアスフェアは、水和時に、相互接続粘性相を形成する。こうした粘性チャネルは、巨大分子への浸透性は低いものの、小分子緩衝剤には浸透可能であるため、酸性分解断片を緩衝し得る。加えて、水性-水性乳剤の表面改質剤として使用されるアルギン酸塩(実施例1)は、緩衝効果を有する。滴定試験において、0.1NのH C l 100  $\mu$  lを150mM(モノマに基づく)のアルギン酸溶液0.9m lに追加した時、pHは、約5で安定した。同量の水では、同じ酸10  $\mu$  lで、pHは1まで低下した。

40

#### 【0027】

本発明は、徐放性蛋白質送給における技術的課題の全てに対処可能な、単純かつ包括的解決策を初めて提供する。この方法により、脆弱な蛋白質は、製剤及び投与の両方のステ

50



ップにおいて保護可能であり、最小のバースト及び不完全放出により、ほぼ絶え間なく放出できる。この系は、脆弱な治療物の送給のための広範な用途を有すると予想される。

#### 【0028】

本発明は下の実施例を参照することで更に良く理解されるが、具体的な例が単なる例示的なものであり、後の請求項によって定義される本明細書記載の本発明の制限を意図しないことを、当業者は容易に理解するであろう。

#### 【0029】

##### 実施例

##### 実施例1．高分子水性－水性乳剤の安定性

高分子水性－水性乳剤の安定性は、分散相の融合（サイズ変化）を顕微鏡下で観察し、着色した分散相の遮断相の形成を、時間の関数として直接的に目で観察することにより調査した。分散相は、デキストラン溶液によって形成した。5、20、及び40 w/w % という三種類の濃度のデキストラン溶液を実験に使用しており、結果には大きな差異がなく、即ち、いずれの濃度においても、安定水性－水性乳剤が形成された。デキストランの平均分子量については、 $\langle M \rangle_w = 10,000$ 、67,000、及び500,000が試験され、結果には大きな差異がなかった。連続相は、濃度5、20、及び40 w/w % のPEGを異なる試験において含有し、その全てについて、安定した乳剤が形成された。使用したPEGの平均分子量は、8000及び22,000である。乳剤安定剤としては、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルデキストラン、及びカルボキシメチルセルロースを試験した。これら全ての安定剤は、水性－水性乳剤の安定化に有効性を示した。アルギン酸ナトリウム（ $\langle M \rangle_w$ は、低、中、又は高粘性によって表現した）は、ソースが豊富であるため、殆どの実験に使用した。乳剤安定剤の濃度は、それぞれ0.2、1、及び5 w/w % を実験に使用した。乳剤安定剤は、それぞれ分散相及び連続相と共溶解した。乳剤安定剤における大きな差異は観察されなかった。直接観察のため、着色分子、青色デキストラン（ $\langle M \rangle_w = 50,000$ 及び1,000,000）又はミオグロビンを、インジケータとして分散相に追加した。

10

20

#### 【0030】

デキストラン溶液をPEG溶液に追加し、その後、機械式ホモジナイザにより均質化することで、様々な塩化ナトリウム濃度の乳剤を調製した。デキストランのPEGに対する比は、1：5乃至1：20とした。乳剤の調製後、一滴の試料を顕微鏡にセットし、顕微鏡写真を撮影した。その後、継続的な観察のため、試料を瓶に残しておいた。

30

#### 【0031】

図1は、混合を停止し、乳剤を室温で一週間保管した後の高分子水性－水性乳剤の写真を示している。ミオグロビンが、分散相に充填するモデル蛋白質として使用されており、錆色を示している。六つの試料のうち、試料4は、アルギン酸ナトリウムなしで調製した。試料6は、塩化ナトリウムを（100 mMに達するまで）追加したことを除き、試料1と同じとした。これら二試料では、攪拌を停止した直後に、分散相の融合が発生し、数時間のうちに二つの遮断相の形成につながった。図1の他の四試料では、小滴の直径は、一週間に渡って3乃至7  $\mu\text{m}$ の範囲を維持した（図2A）。この結果は、荷電ポリマ分子が小滴の表面に吸着され、拡散二重層を形成するという我々の仮説を支持した。ナトリウムイオンの濃度を高めると、アルギン酸塩の対イオンでは、表面電荷が奪われ、ゼータ電位の大きさが低下し、したがって、小滴の合体が生じる。デキストラン/PEG比を1：15に減らすことで、二週間に渡って安定状態の乳剤が発生した。

40

#### 【0032】

この実験において、連続相と分散相との間でのミオグロビンの分配係数は、410 nmでの吸光度によって決定されるものとして、1：50となり、ミオグロビンの大部分がデキストラン相にあることを示した。ミオグロビンに加えて、組み換えヒト顆粒求マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF）及びアンフォテリシンB（AmB）を運ぶリポソームも、この系に充填し、図2Bのものと同様のガラス質粒子を形成した。rhGM-CSFの約93%及びAmB/リポソームの95%が、分散相に分配されたことが、

50

それぞれ、活性測定（下の説明を参照）及び408nmでのUV吸光度によって検出された。

#### 【0033】

図2Aは、上で説明した塩化ナトリウムなしの溶液によって調製された高分子水性・水性乳剤の顕微鏡画像を図示している。直径3乃至8ミクロンの均一なサイズ分布の乳剤小滴が観察された。

#### 【0034】

##### 実施例2・アクアスフェアの調製

アクアスフェアは、単純に上の安定乳剤を凍結乾燥することで調製した。凍結乾燥後、デキストラン小滴は、固体粒子に転換された。しかしながら、殆どのデキストラン粒子は、連続相のPEGによって形成された固体マトリクス内に分散した。PEGは、凍結乾燥粉末を塩化メチレン又はアセトニトリルによって洗浄することで除去できる。こうした溶媒は、乾燥デキストラン相を溶解又は膨張させない。図2A及び2Bは、異なる調製段階での分散相の顕微鏡画像を図示しており、それぞれ、乳化後、凍結乾燥し（PEG除去のため）ジクロロメタンにより洗浄した後、及びPLGAコーティングからの回収後である。凍結乾燥後、分散相の直径は、依然として均一だったが、3乃至7μmから1乃至3μmへ低下し、水分の喪失による妥当なサイズとなった。これらの画像は、凍結乾燥中に小滴の融合が発生していないことを示した。この乾燥粒子のサイズ範囲（1乃至3μm）は、治療物の吸入送給に理想的であり、二重カプセル化（S-O-W）（5、13）による分解性高分子コーティングミクロスフェアの調製にも適している。

#### 【0035】

##### 実施例3・アクアスフェアのPLGAマイクロスフェアへのマイクロカプセル化

アクアスフェアは、「solid-in-oil-in-water」乳化プロセスにより、PLGA及びその他の生分解性高分子のマトリクスにおいて更にマイクロカプセル化できる。本研究では、乳酸：グリコール酸の比が50：50及び75：25のPLGAを使用した。実施例2のように調製したアクアスフェアを、最初に、アクアスフェア/PLGAの比を1：2乃至1：20でPLGA/ジクロロメタン溶液（10乃至20%）中で懸濁し、次に、0.1乃至10%の塩化ナトリウム及び0.1乃至4%のポリビニルアルコール（PVA）又はPEG又はポリビニルピロリドンを含む水溶液に攪拌しながら追加した。二つの溶液の体積比は、1：2乃至1：10とした。乳剤形成後、この系に大量の冷水（乳剤の10倍）を攪拌しながら流し込んで、有機溶媒を抽出した。図3A及び3Bは、それぞれ溶媒抽出前のPLGA小滴及び溶媒抽出後のPLGA粒子の顕微鏡画像を図示している。溶媒抽出前、PLGA小滴は、透明であり、内部にはアクアスフェアが均等に分布していた。溶媒の除去により固めた後、PLGA粒子は、透明性を失った。

#### 【0036】

##### 実施例4・PLGA粒子からのアクアスフェアの回収

アクアスフェアは、実施例3のように調製したPLGAマイクロスフェアから回収できる。アクアスフェア充填PLGA粒子を、ジクロロメタン又はアセトニトリルに再溶解し、その後、遠心分離した。この手順を、四乃至六回、繰り返した。図4は、上記の手順によりPLGAマイクロスフェアから回収したアクアスフェアを図示している。アクアスフェアの粒子サイズ及び形状は、PLGAマイクロスフェアにカプセル化する前と同じものを保っている。この結果は、マイクロカプセル化プロセス中のアクアスフェアの水和が顕著ではないことを示唆している。

#### 【0037】

PLGAマイクロスフェアによるアクアスフェアのカプセル化効率を調べるために重量測定を実行した。PLGAに対するデキストランの重量比は、マイクロカプセル化の前（1：19）と後（1.06：19）で、比較的一定のものが得られ、高いカプセル化効率を示唆した。この結論は、我々のカプセル化前後での蛋白質活性測定の結果と一致する。

#### 【0038】

##### 実施例5・アクアスフェアによる有機溶媒に対する - ガラクトシダーゼの保護

有機溶媒からの脆弱な蛋白質の保護におけるアクアスフェアの有効性を調べるため、四量体構造で分子量 434 KD の酵素である - ガラクトシダーゼを、アクアスフェアに充填した。蛋白質を、10 乃至 100 単位 / ml の比でデキストラン溶液 (MW = 10 乃至 500 KD、濃度 5 乃至 25 %) に溶解し、実施例 1 のように PEG 溶液で乳化した。凍結乾燥後、ジクロロメタン (PLGA マイクロスフェアの調製において使用される一般的な溶液) により実施例 4 のように数回洗浄することで、PEG 相を除去した。その後、得られた蛋白質充填アクアスフェアを、緩衝液に再溶解し、o - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシド (ONPG) の加水分解により測定した。図 5 に示すように、酵素の触媒活性は、(乳化、凍結乾燥、ジクロロメタンによる洗浄を含む) 実施例 1 から実施例 2 の手順後に、10 % 未満しか減少しなかった。この結果は、三回の実施で再現できた。この 10 % の活性低下は、乳化プロセス及び洗浄プロセスによるデキストラン相及び PEG 相の間での分配による蛋白質の損失と、凍結乾燥及び洗浄プロセスにおいて変性した蛋白質、及び洗浄プロセス中に失われた蛋白質とを含む。この結果は、アクアスフェア内部の脆弱な蛋白質を、マイクロカプセルプロセス中に有機溶媒から十分に保護できることを示唆している。

10

#### 【0039】

実施例 6 . 水性 - 水性乳剤の分散相及び連続相における rhEPO 及び rhGM - CSF の分配

乳剤系の分散相に充填された蛋白質の効率を判定するために分配実験を行った。組み換えヒトエリスロポエチン (rhEPO) 又は組み換えヒト顆粒求マクロファージコロニー刺激因子 (rhGM - CSF) を含有する水性 - 水性乳剤を遠心分離し、その後、TF1 細胞株を使用して細胞増殖測定を行った。蛋白質活性は、顕微鏡下でウェル当たりの細胞数を計数して測定した。分配実験により、rhEPO の 94 % 及び rhGM - CSF の 93 % がデキストラン相において発見された。

20

#### 【0040】

実施例 7 . アクアスフェアによる有機溶媒に対する rhEPO 及び rhGM - CSF の保護

アクアスフェアによる蛋白質保護を、二種類の蛋白質 rhEPO 及び rhGM - CSF により更に調べた。蛋白質をアクアスフェアに充填し、実施例 5 と同一の手順に従って処理した。蛋白質の生物活性は、分配に関するもの (実施例 6) と同じ細胞増殖方法により測定した。乳化前の蛋白質と (ジクロロメタンによる洗浄後) アクアスフェアから回収した蛋白質とを、それぞれ同じ細胞懸濁液に追加した。rhEPO の結果は、図 6 に図示している。凍結乾燥後、rhEPO での活性保持は、ウェル当たりの細胞数の 27800 から 23700 への低下によって示されるように、85 % だった。凍結乾燥粉末の洗浄 (したがって、PEG 相が除去される) により、細胞数は、更に 22600 まで低下し、活性保持が 95 % であることを示した。有機溶媒による洗浄後、蛋白質の 94 % のみがデキストラン層に留まることから (実施例 6)、有機溶媒との接触後の活性保持は、100 % となった。

30

#### 【0041】

図 7 は、画策性ステップ後の rhGM - CSF の活性測定の結果を図示している。蛋白質充填乳剤の乾燥粉末への凍結乾燥により、ウェル当たりの平均細胞数は、130900 から 122600 へ僅かに減少し、約 94 % の活性保持を示した。残存 PEG を除去するためのジクロロメタンによる凍結乾燥粉末の洗浄後、細胞数は、ウェル当たり 111100 に減少し、更に 9 % が低減された。しかしながら、この 9 % の低減の多くは、PEG と一緒に洗い落とされた連続相における rhGM - CSF の分配によって生じたものだった (全 rhGM - CSF の約 7 %、実施例 6)。蛋白質充填デキストラン粒子の PLGA マイクロスフェアへのカプセル化では、ウェル当たり 118900 の平均細胞数が示すように、更なる活性の減少は生じなかった。高い活性保持は、更に、重量測定 (実施例 4) によって示唆された高いカプセル化効率を示した。

40

#### 【0042】

50

実施例 8 . 生理的溫度の水和状態におけるアクアスフェアによる r h E P O、r h G M - C S F、及び - ガラクトシダーゼの活性保持

蛋白質薬物の徐放性投薬形態を開発する上で最も困難な課題は、生理的溫度の水和状態において蛋白質の活性を確保することであると広く考えられてきた ( 1 8 )。徐放中、分解性高分子マイクロスフェアは、水を吸収して膨張し、カプセル化した蛋白質分子は、体温での水和条件に晒される。水和及び温度上昇は、蛋白質分子の可動性を高め、蛋白質の化学的又は物理的变化の機会を増加させる ( 1 9 )。生理的条件下での蛋白質の安定性を調べるために、r h E P O又はr h G M - C S Fを充填したデキストラン粒子に水を追加し ( 粘性 3 0 w / w %デキストラン溶液を形成し )、3 7 で培養した。T F 1細胞増殖における蛋白質活性を、培養時間の関数として、図 8 及び 9 に図示した。

10

【 0 0 4 3 】

r h E P Oでは、アクアスフェアによって保護されたものの活性は、一週間で約 5 0 %まで徐々に低下した ( 図 8 )。しかしながら、保護されていない r h E P Oでは、同量の活性低下に、僅か一日しか要しなかった。r h E P Oの半減期は、体内の酵素触媒作用により、i n v i v oで 8 . 5 時間である。明らかに、アクアスフェアの水和によって形成された粘性多糖相は、生理的条件下において、大幅な期間に渡って蛋白質活性を延長できる。

【 0 0 4 4 】

同様の結果は、r h G M - C S Fでも得られた ( 図 9 )。保護された r h G M - C S Fでは、活性保持は、培養十日後で 8 5 %となった。保護されていない r h G M - C S Fでは、同じ培養期間で 5 6 %だった。

20

【 0 0 4 5 】

水和状態における - ガラクトシダーゼでの多糖安定剤の保護効果を、トレハロースのものと比較した。活性測定は、実施例 5 と同じように実施した。3 7 での培養七日後、多糖類によって安定化した蛋白質の活性は、8 9 %に下降したが、トレハロースによって安定化したものは、1 7 %まで下降した。培養時間を二週間に延長すると、水和アクアスフェアでは活性が更に 4 8 %まで低下したが、トレハロース溶液での培養では 0 %となった。

【 0 0 4 6 】

実施例 9 . P L G Aマイクロスフェアからの最小限のバースト及び不完全放出を有する蛋白質放出プロフィール

30

バースト効果及び不完全放出は、蛋白質薬物の徐放投薬形態の開発における別の共通問題である。バースト効果により、充填された蛋白質の 3 0 乃至 7 0 %が、投与直後に放出され得る。不完全放出は、充填物の 2 0 乃至 4 0 %が不溶残分として残ることを指す。こうした望ましくない放出は、アクアスフェア内に蛋白質を予備充填することで防止できる。蛋白質を、最初に水性 - 水性乳化プロセスにより、アクアスフェア ( 0 . 1 乃至 2 0 % ) に充填した。次に、S - O - W手法を使用して、蛋白質充填アクアスフェアを、P L G Aマイクロスフェア ( 1 乃至 2 0 % ) においてカプセル化した。P L G A内のミオグロビンの充填容量は、0 . 2 5 乃至 5 %とした。P V A、P E G、及びP V Pを、水相 ( 0 . 1 乃至 5 % ) において、界面活性剤として溶解させた。図 1 1 は、アクアスフェアによる保護が存在する状態と存在しない状態とでの、( 末端器をブロックした ) P L G Aマイクロスフェアでカプセル化したミオグロビンの放出プロフィールを図示している。純粋な蛋白質粒子として、ミオグロビンがエステル末端 P L G Aで調製されたマイクロスフェアにカプセル化された時、4 5 日間で充填蛋白質の 1 7 %のみが放出された。アクアスフェアに予備充填した後でカプセル化されたミオグロビンでは、充填蛋白質の 7 5 %までが、開始時のバースト放出なしで、4 5 日間に渡って直線的に放出された。こうしたバーストのない線形放出は、ミオグロビン - デキストラン粒子を、相対的に親水性の酸末端 P L G Aのマイクロスフェアにおいてカプセル化した時にも達成される ( 図 1 2 )。

40

【 0 0 4 7 】

図 1 2 は、乳酸 : グリコール酸の比がそれぞれ 5 0 : 5 0、6 5 : 3 5、及び 7 5 : 2

50

5 である酸末端 P L G A (分子量 = 12 K) で調製されたマイクロスフェアからのミオグロビン放出プロフィールを図示している。これら全ての試料において、ミオグロビンは、P L G A マイクロスフェアでのカプセル化の前に、予備製剤してアクアスフェアとした。充填物の約 7 乃至 12 % が一日目に放出され、その後、線形動態で放出された。L / G が 50 / 50 及び 65 / 35 で、MW が 12 K である P L G A で調製されたマイクロスフェアでは、蛋白質放出が、50 日間で 90 % を上回り、ほぼ完全となった。L / G 比を 65 / 35 から 75 / 25 に増加させることで、放出の割合は僅かに低下し、同じ期間に充填物の 80 % が放出された。分子量 (MW) を 12 K から 20 K に増加させることで、放出の割合は、更に下降した。L / G 比が 65 / 35 の P L G A では、カプセル化したミオグロビンの 65 % が、50 日の間に放出された。いずれのケースにおいても、放出プロフィールは、ほぼ線形となった。この方法によるミオグロビンの P L G A マイクロスフェアへのカプセル化効率は、調製プロセス後の上澄みにおける蛋白質含有量の分析に基づいて、約 90 % となった。

10

#### 【0048】

実施例 10 . P L G A マイクロスフェアから放出された G M - C S F の生物活性

蛋白質 r h G M - C S F を、実施例 1、2、及び 3 において説明した方法に従って、アクアスフェアを介して P L G A マイクロスフェアに充填した。デキストランに対する蛋白質の比は、1 : 500 とし、P L G A に対するアクアスフェアの比は、1 : 5 とした。r h G M - C S F 充填 P L G A マイクロスフェアを、緩衝溶液に懸濁し、37 で培養した。上澄みを毎日収集し、新鮮な緩衝液に置き換えた。収集した上澄みを、20 倍に希釈し、実施例 7 のように測定した。測定された活性は、図 13 において、試料抽出の日付に対してプロットしている。活性は、培養後 24 日目まで、ほぼ一定となり、その後、32 日目に陰性対照のレベルまで低下した。

20

#### 【0049】

高分子の分解により P L G A マイクロスフェア内部で生成される局所酸性は、放出期間中の蛋白質変性の主な原因の一つとして広く認識されている (26)。r h G M - C S F の活性に対する酸性の影響を調べるために、この蛋白質を、活性測定の一日前に、デキストラン溶液中において、p H 1、2、3、4、5、及び 6 で、それぞれ培養した。p H 6 で培養した試料と比較して、活性は、p H 4 で 75 % に減少し、p H g a 2 を下回る時、45 % に減少した。この p H 依存性の活性低下は、P L G A マイクロスフェアから放出された蛋白質では観察されなかった (図 13)。この結果は、P L G A マイクロスフェアのマトリクスにおいて、局所酸性が蓄積されなかったことを示唆している。おそらく、アクアスフェアは、巨大分子の作用物質に対する透過性は低い、小分子の緩衝剤に対して透過性が非常に高い粘性チャネルを水和時に形成するため、P L G A の分解によって生成された酸性基が蛋白質放出期間中に緩衝されるようになる。

30

#### 参考文献

- 1 . R. Langer, Folkman, J., Nature 263, 793-800 (1976).
- 2 . CAS, 「C h e m i c a l A b s t r u c t の検索の結果、分解性高分子に基づく蛋白質の徐放を主題とする 962 件の研究論文及び特許が存在した」(2002).
- 3 . M. V. Weert, Hennink, W. E., Jiskoot, W., Pharm. Res. 17, 11591167 (2000).
- 4 . R. T. Bartus, Tracy, M. A., Emerich, D. F., Zale, S. E., Science 281, 1161-1162 (1998).
- 5 . P. A. Burke, 薬剤制御放出技術ハンドブック, Marcel Dekker, 661-692 (2000).
- 6 . J. L. Cleland, Jones J. S., Pharm. Res. 13, 1465-1475 (1996).
- 7 . O. L. Jonson, Pharmaceutical Research 14, 730-735 (1997).
- 8 . B. C. Cunningham, Mulkerrin, M. G., Wells, J. A., Science 253, 545-548 (1991).
- 9 . S. E. Zale, Burke, P. A., Bernstein, H., Brickner, A., 米国特許第 5,716,644 号内 (米国、1998) .

50

- 10 . A. sanchez, Villamayor, B., Guo, Y., McIver, J., Alonso, M. j., Intern. J. Pharm. 185, 255-266 (1999).
- 11 . S. P. Schwendeman, Tobio, M., Jaworowicz, M., Alonso, M. J., Langer, R., J. Microencapsulation 15, 299-318 (1998).
- 12 . M. Morlock, Koll, H., Winter, G., Kissel, T., European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics 43, 29-36 (1997).
- 13 . S. Yoshioka, Aso, Y., Kojima, S., Pharmaceutical Research 14, 736-741 (1997).
- 14 . M. v. d. Weert2. Hof, R. V., Weerd, J. v. d., Heeren, M. A., Posthuma, G., Hennink, W. E., Crommelin D. J. A., J. Controlled Release 68, 31-40 (2000). 10
- 15 . T. Morita, Horikiri. Y., Suzuki, T., Yoshino, H., International Journal of Pharmaceutics 219, 127-137 (2001).
- 16 . Y. -F. Maa, Nguyen, P-A., Hsu, S. W., J. Pharm. Sci., 87, 152-159 (1997).
- 17 . T. Morita, Horikiri. Y., Yamahara, H., Suzuki, T., Yoshino, H., Pharm. Res. 17, 1367-1373 (2000).
- 18 . T. G. Park, Lee, H. Y., Nam Y. S., J. Controlled Release 55, 181-191 (1998).
- 19 . O. Franssen, W. E. Hennink, Intern. J. Pharm., 168, 1-7 (1998).
- 20 . F. Lamberti, WO 96 / 40071 内 ( 1996 ). 20
- 21 . S. P. Schwendeman, Cardamone, M., Brandon, M. R., Klibanov, A., Langer, R., 蛋白質の安定性と生分解性高分子マイクロスフェアからの送給、S. C. H. Bernstein 編、蛋白質及びワクチンの送給のための微粒子系 (Mercel Dekker, New York, 1996), vol. 77.
- 22 . W. R. Liu, Langer, R., Klibanov, A. M., Biotech Bioeng. 37, 177-184 (1991).
- 23 . B. Bittner, Morlock, M., Koll, H., Winter, G., Kissel, T., Eur. J. Pharm. Bipharm. 45, 295-305 (1998).
- 24 . T. Jin, L. Chen, H. Zhu, 米国特許出願第 09 / 886 , 555 号 ( 2001 ). 30
- 25 . H. Takahata, Lavelle, E. C., Coombes, A. G. A., Davis, S. S., J. Controlled Release 50, 237-246 (1998).
- 26 . G. Zhu, S. R. Mallery, S. P. Schwendemen, Nature Biotech., 18, 52-57 (2000).

# 【図面の簡単な説明】

## 【0050】

【図1】分散相にミオグロビンを充填した安定高分子水性 - 水性乳剤を示す図。写真は、試料調製の一週間後に撮影した。 (1) 分散相：1 ml、ミオグロビン 5 w / w % 及びデキストラン 20 w / w % 含有。連続相：5 ml、アルギン酸ナトリウム 1 w / w % 及び PEG 20 w / w % 含有。 (2) 分散相：1 ml、ミオグロビン 5 w / w % 及びデキストラン 20 w / w % 含有。連続相：10 ml、アルギン酸ナトリウム 1 w / w % 及び PEG 20 w / w % 含有。 (3) 分散相：0.5 ml、ミオグロビン 5 w / w % 及びデキストラン 20 w / w % 含有。連続相：10 ml、アルギン酸ナトリウム 1 w / w % 及び PEG 20 w / w % 含有。 (4) 分散相：1 ml、ミオグロビン 5 w / w % 及びデキストラン 20 w / w % 含有。連続相：5 ml、PEG 20 w / w % 含有。 (5) 分散相：1 ml、ミオグロビン 5 w / w % 及びデキストラン 20 w / w % 含有。連続相：5 ml、アルギン酸ナトリウム 1 w / w %、PEG 20 w / w %、及び NaCl 10 mM 含有。 (6) 分散相：1 ml、ミオグロビン 5 w / w % 及びデキストラン 20 w / w % 含有。連続相：5 ml、アルギン酸ナトリウム 1 w / w %、PEG 20 w / w %、及び NaCl 100 mM 含有。 試料 (4) 及び (6) における茶色の分散相 (ミオグロビン / デキストラン 40 50

）は、調製直後に融合を開始し、一晩で底部に遮断相を形成した。試料（１）、（２）、（３）、及び（５）のものは、顕微鏡を使用した観察において、一週間に渡って変化しなかった。

【図２】安定水性－水性乳剤及び多糖粒子の顕微鏡画像を示す図。（２Ａ）：図１－１に図示した安定水性－水性乳剤の顕微鏡画像。（２Ｂ）：（２Ａ）を凍結乾燥し、（乾燥PEG相を除去するために）ジクロロメタンにより洗浄した後の顕微鏡画像。

【図３】S－O－W二重乳化によるポリ乳酸－グリコール酸（PLGA）マイクロスフェアの調製を示す図。３Ａ）アクアスフェアが有機PLGA相において均等に懸濁されたS－O－W二重乳化の顕微鏡画像。３Ｂ）アクアスフェアがカプセル化された固化PLGAマイクロスフェア。

10

【図４】（図３Ｂに図示したような）PLGAマイクロスフェアから回収したアクアスフェアの顕微鏡画像を示す図。回収したアクアスフェアのサイズ及び形状は、PLGAマイクロスフェアにおいてカプセル化される前のものと同一である（図２Ｂ）。

【図５】アクアスフェア技術を使用したマイクロカプセル化の各ステップにおいて測定した、－ガラクトシダーゼの触媒活性の比較を示す図。未使用の水性－水性乳剤に充填した－ガラクトシダーゼと比較して、その活性は、後続のステップにおいて、ほんの僅かしか減少していない。

【図６】各調製ステップ後にTF1細胞の増殖によって測定した、rhEPOの生物活性を示す図。乳化、凍結乾燥、及びジクロロメタンによる洗浄後に、それぞれ同量のrhEPOを再構成し、TF1細胞と共に培養した。増殖した細胞は、顕微鏡下で計数した。ウェル当たりの細胞数は、三つのウェルから平均化した。

20

【図７】各調製ステップ後にTF1細胞の増殖により測定した組み換えヒト顆粒求マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF）の生物活性を示す図。乳化、凍結乾燥、ジクロロメタンによる洗浄、及び蛋白質がカプセル化されたPLGAマイクロスフェアからの回収後に、同量のrhGM-CSFを再構成し、TF1細胞と共に培養した。増殖した細胞は、顕微鏡下で計数した。ウェル当たりの細胞数は、三つのウェルから平均化した。

【図８】３７の水和形態での培養後のTF1細胞の増殖によって測定した、rhEPOの生物活性を示す図。生理的温度の水和状態での培養後の活性：アクアスフェアに充填した蛋白質に、その質量の二倍の水を加え、細胞培養前に様々な日数に渡って３７で培養した。活性は、各ウェルにおいて成長した細胞の平均数で示した。対照として、同量のrhEPOをPBS緩衝液において培養し、同一の条件下で測定した。

30

【図９】３７の水和形態での培養後のTF1細胞の増殖によって測定した、rhGM-CSFの生物活性を示す図。生理的温度の水和状態での培養後の活性：アクアスフェアに充填した蛋白質に、その質量の二倍の水を加え、細胞培養前に様々な日数に渡って３７で培養した。活性は、各ウェルにおいて成長した細胞の平均数で示した。対照として、同量のrhEPOをPBS緩衝液において培養し、同一の条件下で測定した。

【図１０】３７の水和形態における培養時間の関数としての、アクアスフェア充填－ガラクトシダーゼの触媒活性を示す図。活性は、トレハロース溶液において培養したものと比較した。糖（又は多糖）の濃度は、水和アクアスフェアとトレハロースとの両方で30w/w%とした。

40

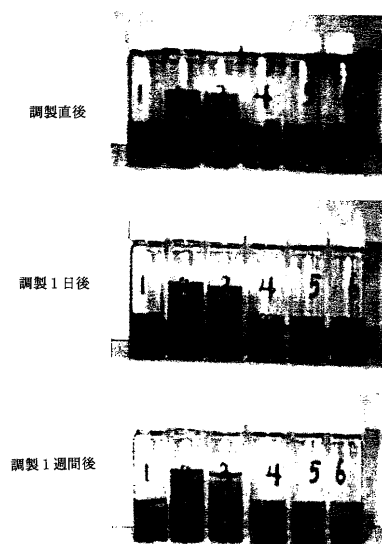
【図１１】PLGAマイクロスフェアからのミオグロビンの放出プロフィールを示す図。放出の研究は、マイクロスフェア50mgを37の0.1M BPS緩衝液2mLに懸濁させて実施した。放出されたミオグロビンの量は、BCA法を使用して測定した。：ラクチド/グリコリド比50/50及び分子量6Kであるエステル末端PLGAで調製されたマイクロスフェア内に直接的にカプセル化された純粋なミオグロビン粒子。：上と同じPLGAで調製したマイクロスフェア内にカプセル化したミオグロビン－デキストラン粒子。

【図１２】アクアスフェアとしてPLGAマイクロスフェアにおいてマイクロカプセル化されたミオグロビンの放出プロフィール。：ラクチド/グリコリド比（L/G）50

50

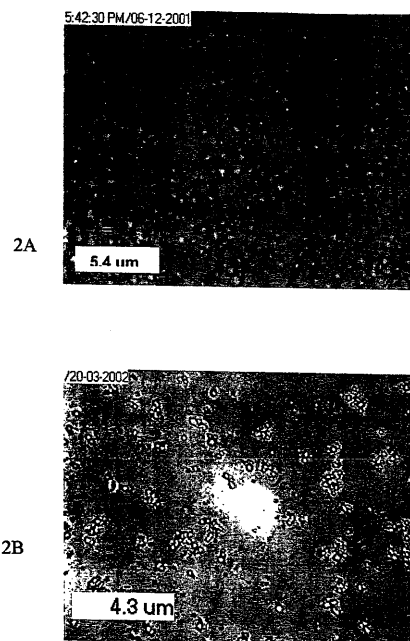
/ 5 0 及び分子量 ( MW ) 1 2 K である P L G A のマイクロスフェアからのもの。 : L /  
 / G 6 5 / 3 5 及び MW 1 2 K である P L G A のマイクロスフェアからのもの。 : L /  
 G 7 5 / 2 5 及び MW 1 2 K である P L G A のマイクロスフェアからのもの。 : L / G  
 6 5 / 3 5 及び MW 2 0 K である P L G A のマイクロスフェアからのもの。

【 図 1 】



様々な組成物と共に高分子水性-水性乳剤  
 (さび色を示す分散相にミオグロビンを充填)  
 写真は調製後の時間の関数で撮影した。

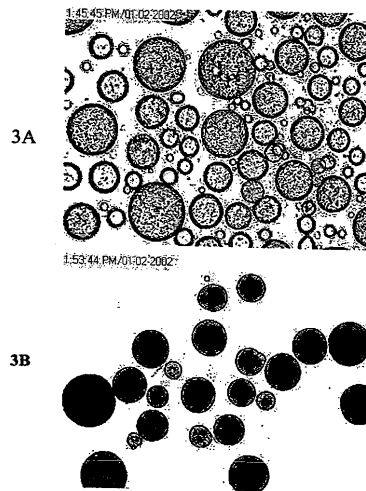
【 図 2 】



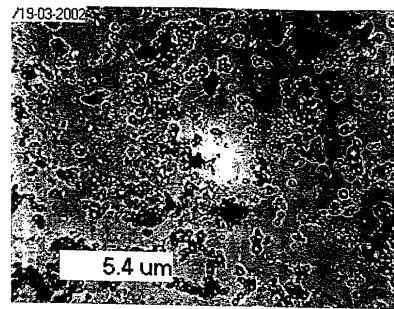
安定な水性-水性乳剤とポリサッカライド顆粒の顕微鏡画像



【図 3】



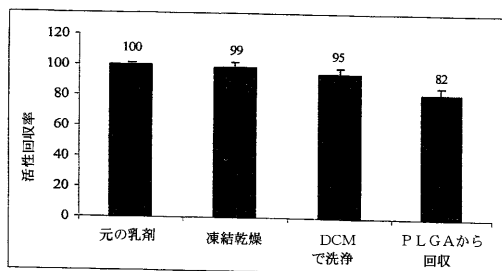
【図 4】



(図 3 Bに図示したような) PLGAマイクロスフェアから回収したアクアスフェアの顕微鏡画像

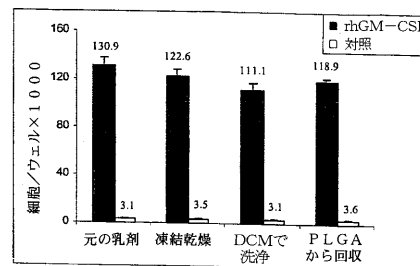
S-O-Wダブル乳化したPLGAマイクロスフェアの調製

【図 5】



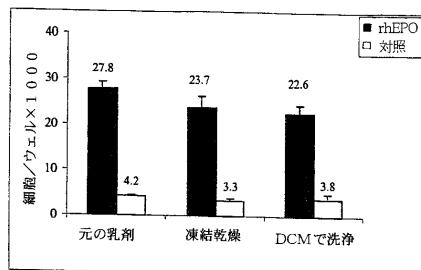
マイクロカプセル化の各ステップで測定した  
β-ガラクトシダーゼの触媒活性の比較

【図 7】



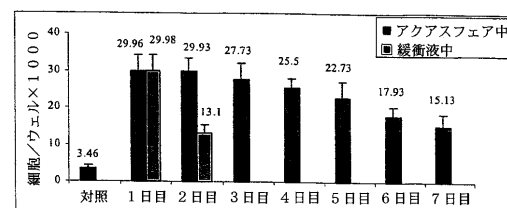
各調製ステップ後のTF1細胞増殖で測定した  
rhGM-CSFの生物活性

【図 6】



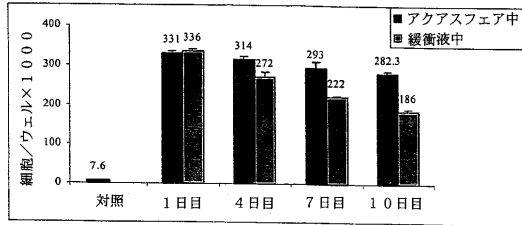
各調製ステップ後のTF1細胞増殖で測定した  
rhEPOの生物活性

【図 8】



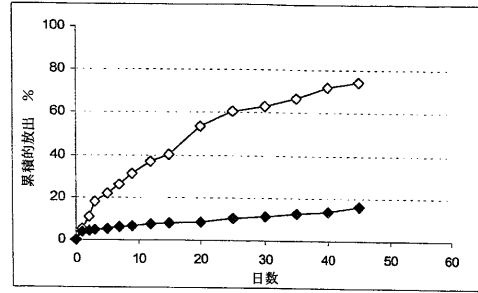
37℃で加水した形状で反応後のTF1細胞  
増殖で測定したrhEPOの生物活性

【図 9】



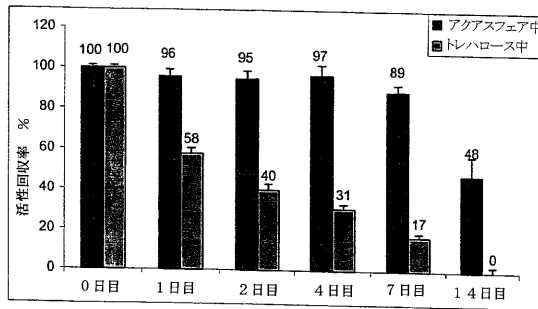
37°Cで加水した形状で反応後のTGF-β1細胞増殖で測定したrhGM-CSFの生物活性

【図 11】



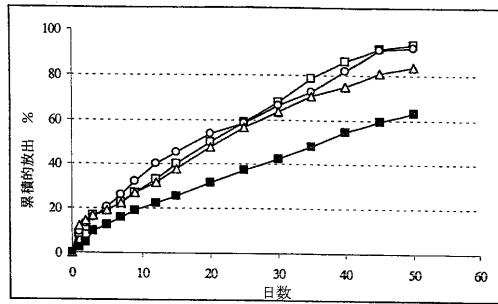
PLGAマイクロスフェアからミオグロビンの放出プロフィール

【図 10】



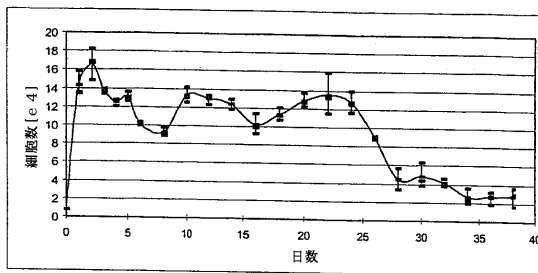
37°Cで水和状態で培養時間の関数としてのアクアスフェアに充填したβ-ガラクトシダーゼの触媒活性

【図 12】



アクアスフェアとしてPLGAマイクロスフェアにマイクロカプセル化されたミオグロビンの放出プロフィール

【図 13】



37°CでPLGAマイクロスフェアから放出された後に測定されたrhGM-CSFの生物活性

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 47/36 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/36	
<b>A 6 1 K 47/38 (2006.01)</b>		A 6 1 K 47/38	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジン, ツオ  
中国 ティアンジン 3 0 0 0 7 0, ナンカイ ディストリクト, クジャンタイ ロード, ナンバ  
ー 4 0 6

(72)発明者 ツー, ファ  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 3 6, プレインボロ, パーチ ドライブ 1 9

(72)発明者 ツー, ジャハオ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 1 2 2 3, ブルックリン, ダブリュ 1 2 番 ストリート,  
1 8 6 4

F ターム(参考) 4C076 AA53 AA55 AA94 CC29 DD38 DD67 EE06 EE16 EE23 EE30  
EE31 EE33 EE36 EE37 EE38 FF31 FF32 FF36 GG16