

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7197465号
(P7197465)

(45)発行日 令和4年12月27日(2022.12.27)

(24)登録日 令和4年12月19日(2022.12.19)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10
A 6 1 K	49/22 (2006.01)	A 6 1 K	49/22

請求項の数 13 (全23頁)

(21)出願番号	特願2019-508185(P2019-508185)	(73)特許権者	519046281 ブラッコ・スイス・ソシエテ・アノニム スイス国 6 8 1 4 カデンピーノ ヴィア ポンテツジャ 2 3
(86)(22)出願日	平成29年8月30日(2017.8.30)	(74)代理人	100113376 弁理士 南条 雅裕
(65)公表番号	特表2019-526551(P2019-526551 A)	(74)代理人	100179394 弁理士 瀬田 あや子
(43)公表日	令和1年9月19日(2019.9.19)	(74)代理人	100185384 弁理士 伊波 興一朗
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/071788	(74)代理人	100137811 弁理士 原 秀貢人
(87)国際公開番号	WO2018/041906	(72)発明者	セガーズ ティム スイス国 1 2 2 8 プラン レ ズウア トルート ドラ ガレーズ 3 1 ブラッ 最終頁に続く
(87)国際公開日	平成30年3月8日(2018.3.8)		
審査請求日	令和2年8月28日(2020.8.28)		
(31)優先権主張番号	16186356.8		
(32)優先日	平成28年8月30日(2016.8.30)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		

(54)【発明の名称】 サイズが制御された微粒子の調製

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

リン脂質を含む両親媒性材料の層によって安定化された、ガスが充填された微小胞の懸濁液を調製する方法であって、

前記方法は：

- 第一の流体流、および、別個に、前記両親媒性材料を含む液体流を提供するステップ；ここで前記第一の流体流はガスである
- 前記の第一の流体流および前記の液体流を、それぞれの取水路を通して接触ゾーンに向けて方向付けるステップ；
- 前記の第一の流体流および前記の液体流を、前記接触ゾーンから、校正されたオリフィスを通して方向付けて、前記微小胞を含む懸濁液を得るステップ；および
- 前記微小胞を含む前記懸濁液を、排水路に向けて方向付けるステップ；

を含み、

ここで、前記排水路の最初の部分は、前記両親媒性材料の遷移温度に対して20%低い温度よりも低くない制御された温度()で維持され、

ここで、前記排水路の最初の部分は、前記の校正されたオリフィスから0.1mm~10.0mm伸長している、方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

前記の制御された温度()は、前記両親媒性材料の遷移温度に対して10%低い温度

よりも低くない温度である、
方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、
前記の最初の部分は、前記の校正されたオリフィスから 1 mm ~ 50 mm 伸長する、
方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、
前記の最初の部分は、前記の校正されたオリフィスから 2 mm ~ 30 mm 伸長する、
方法。

10

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、
前記の接触ゾーンおよび前記の校正されたオリフィスもまた、前記の制御された温度で
維持される、
方法。

【請求項 6】

リン脂質を含む両親媒性材料の層によって安定化された、ガスが充填された微小胞の懸
濁液を調製する方法であって、

前記方法は：

- 第一の流体流、および、別個に、前記両親媒性材料を含む液体流を提供するステップ；
- ここで前記第一の流体流はガスである
- 前記の第一の流体流および前記の液体流を、それぞれの取水路を通して接触ゾーンに
向けて方向付けるステップ；

20

- 前記の第一の流体流および前記の液体流を、前記接触ゾーンから、校正されたオリフ
イスを通して方向付けて、前記微小胞を含む懸濁液を得るステップ；および
- 前記微小胞を含む前記懸濁液を、排水路に向けて方向付けるステップ；
を含み、

ここで、前記排水路の最初の部分は、前記両親媒性材料の遷移温度に対して 20 % 低い
温度よりも低くない制御された温度 () で維持され、

前記微小胞を含む前記懸濁液は、その後、前記両親媒性材料の前記遷移温度よりも低い
温度で冷却され、

30

前記冷却は、前記微小胞の形成から 60 秒以内に生じ、

ここで前記冷却の温度は、前記排水路の前記最初の部分の温度よりも低い、

方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、
前記の制御された温度 () は、前記両親媒性材料の遷移温度に対して 10 % 低い温度
よりも低くない温度である、

方法。

【請求項 8】

請求項 6 又は 7 に記載の方法であって、
前記冷却は、前記微小胞の形成から 5 秒以内に生じる、

40

方法。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法であって、
前記冷却において、前記懸濁液は、前記両親媒性材料の前記遷移温度よりも少なくとも
5 % 低い温度 () で冷却される、

方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、

50

前記冷却において、前記懸濁液は、前記両親媒性材料の前記遷移温度よりも少なくとも10%低い温度()で冷却される、方法。

【請求項11】

請求項1～10のいずれか1項に記載の方法であって、

前記リン脂質は、ホスファチジルコリン、エチルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールまたはスフィンゴミエリンの脂肪酸ジエステルから選択される、

方法。

10

【請求項12】

請求項1～11のいずれか1項に記載の方法であって、

前記ガスは、フッ素化ガスを含む、

方法。

【請求項13】

請求項12に記載の方法であって、

前記ガスは、ガス(A)および(B)の混合であって、ここでガス(B)は、フッ素化ガスであり、ガス(A)は、空気、酸素、窒素、二酸化炭素またはそれらの混合から選択される、

方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ガスが充填された微小胞などのサイズが制御された微粒子を、特に、フローフォーカシング装置を用いて調製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ガスが充填された微小胞は、造影超音波(CEUS)撮像として知られる超音波撮像技術における適切な造影剤として一般に用いられる。これらの微小胞のガスは、典型的に、例えば、乳化剤、油類、増粘剤または糖類を含む、安定化エンベロープ内にトラップまたはカプセル化される。これらの安定化された気泡(適切な生理学的溶液内に分散される)は、典型的にそれらの調製に用いられる安定化材料に依存して、様々な専門用語で当該分野において一般に呼ばれて；これらの用語は、例えば、「マイクロスフェア」、「微小気泡」、「マイクロカプセル」または「マイクロバルーン」を含み、本明細書において包括的に「ガスが充填された微小胞」(または短縮して「微小胞」と呼ばれる。

30

【0003】

特定の興味は、ガスが充填された微小胞の水性懸濁液であり、ガスの気泡は、ガスと液体の界面に置かれた安定化両親媒性材料(典型的にリン脂質)を伴う非常に薄いエンベロープ(フィルム)によって、ガス/液体界面において境界が作られている。これらの懸濁液は、典型的に、粉末化された両親媒性材料、例えば凍結乾燥された事前に形成されたりポソームまたは凍結乾燥または噴霧乾燥された脂質溶液を、空気または任意の他のガスと、それから、水性担体と、攪拌しながら接触させて、ガスが充填された微小胞の懸濁液を生産することによって調製されて、それから、好ましくはその調製後すぐに投与され得る。安定化層は、上記のリン脂質に加えて、脂肪酸のような他の両親媒性材料も含んでよい。

40

【0004】

参考文献1は、ガスが充填された微小胞の生産のための代替方法を開示し、疎水性液体、典型的には油を、両親媒性材料の水性分散中で乳化して、液体が充填された微小滴のエマルションを得るステップを含み；それからエマルションが凍結乾燥されて、凍結乾燥された残渣は続いてガスおよび水性溶媒の存在下で再構成されて、微小気泡懸濁液を形成する。

50

【 0 0 0 5 】

液体が充填された微小滴（短縮して「微小滴」）を含む水性エマルションは、薬物担体としても用いられ得る。疎水性薬物または親水性薬物は、両親媒性材料によって被覆された液滴に組み込まれ得る。1つ目の場合では、両親媒性材料は、液滴の周りに単一層を形成する。2つ目の場合では、二重の両親媒性材料の層（リポソーム）が水性液滴の周りに形成される。相対的に低い沸点 T_b を有する液体（例えばパーフルオロペンタン $T_b = 29\text{C}$ ）が充填された微小滴、または、例えば低沸点を有する油中のナノ小滴を含む薬物の（ナノ）エマルションが充填された微小滴は、超音波を用いた薬物輸送用途において大きな潜在性を有する。超音波は、インピボ適用において液滴の気化を引き起こすために用いられ得て、それにより、それらのペイロードを放す。

10

【 0 0 0 6 】

調製の従来法は一般に、相対的に高い多分散性指数（PDI）でのサイズ分布を有する微小胞または微小滴（両方とも本明細書において「微粒子」として定義される）懸濁液を提供して、微粒子の集団の標準偏差「s」および平均サイズ「n」の間の比： $PDI = s / n * 100\%$ として数学的に定義される。例えば、典型的な調製方法は、約2～3マイクロメートルの平均直径および約60%のPDIを有する微粒子を与え得る。相対的に高いPDI（例えば60%）を有する微粒子、特に、ガスが充填された微小胞は、実際の撮像技術の大部分に一般に良好に適合するが、そのようなPDIは、それでもなお、前記撮像技術にさらに最適化され得る。さらに、特定の治療的超音波適用のために、PDIを最小限にすることが望ましくあり得る。

20

【 0 0 0 7 】

したがって、いわゆる「サイズが制御された」または「単分散」微粒子、すなわち、ガスが充填された微小胞または液体が充填された微小滴の製剤を調製するための方法が開発されていて、ここでPDIは、10%よりも低く、好ましくは5%よりも低く、さらにより好ましくは2%よりも低い。

【 0 0 0 8 】

単分散微粒子を調製するための適切な方法は、典型的にT接合またはフローフォーカシング装置を用いることによって、例えばマイクロ流体技術の使用を含む。手短にいうと、フローフォーカシング装置では、第一の流体の構成要素（例えばガスまたは油）の流れは、狭いオリフィスを通る第二の流体の構成要素の流れによって集められる。典型的に、第二の流体の構成要素は、エンベロープ形成材料（典型的に、リン脂質および/または脂肪酸を含む、脂質などの界面活性剤）を含む液体の流体であり、第一の流体の構成要素をトラップして所望の微粒子を形成して（ガスが充填された微小胞または液滴の形態で）、前記エンベロープ形成材料によって合体および分離に対して安定化される。

30

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本出願人は、しかしながら、特に、高い流速下で（例えば 10^5 微粒子/秒またはそれよりも高い、高い形成速度を達成する必要がある）、形成されたばかりの微粒子は、相対的に高い運動エネルギーで衝突し得て、そのような衝突は、微粒子の合体をもたらし得ることを観察した。そのような合体の結果は、形成された微粒子の寸法が、例えば、所望の微粒子体積の2、3、およびn倍までの体積に無作為に変化し得ることである。したがって、微粒子集団のサイズおよびPDIは、無制御になり得る。

40

【 0 0 1 0 】

ここで本出願人は、マイクロ流体方法に従って、調製される微粒子の合体を制限するために適用され得る適切な調製条件を見いだした。

【 0 0 1 1 】

一般論として、本出願人は、微粒子が形成されるゾーンに近い温度を制御することによって、特に、微粒子の安定化エンベロープを形成する両親媒性材料（単数または複数）の遷移（transition）温度（ T_m ）付近またはそれよりも上の温度に微粒子を供

50

することによって、合体现象が実質的に減少され得ることを観察した。

【0012】

さらに、本出願人は、両親媒性材料の遷移温度よりも低い、形成された懸濁液のその後の冷却は、微粒子の所望の制御されたサイズおよびPDIを維持するのを有利にさらに助け得ることを観察した。

【課題を解決するための手段】

【0013】

第一の態様によれば、本発明は、両親媒性材料の層によって安定化された微粒子の懸濁液を調製するための方法に関し：

- 第一の流体流、および、別個に、前記両親媒性材料を含む液体流を提供するステップ；
- 前記の第一の流体流および前記の液体流を、それぞれの取水路を通して接触ゾーンに向けて方向付けるステップ（ここで、前記のそれぞれの流れは接触する）；
- 前記の第一の流体流および前記の液体流を、接触ゾーンから、校正されたオリフィスを通して方向付けて、前記微粒子を含む懸濁液を得るステップ；および
- 前記微粒子を含む前記懸濁液を、排水路に向けて方向付けるステップ；を含み、ここで、前記排水路の最初の部分は、両親媒性材料の遷移温度に対して20%低い温度よりも低くない温度（ ）で維持される。

10

【0014】

好ましくは、排水路の最初の部分は、両親媒性材料の遷移温度に対して10%低い温度よりも低くない温度（ ）で維持される。

20

【0015】

排水路の前記の最初の部分は、好ましくは、少なくとも微粒子の水性懸濁液の流れが実質的に定常速度に到達するゾーンまで、校正されたオリフィスの出口から伸長する。

【0016】

好ましい実施態様では、懸濁液は、校正されたオリフィスから排水路へ、校正されたチャネルを通して流れる。

【0017】

校正されたオリフィス（およびチャネル）および排水路の形状に応じて、前記の最初の部分は、校正されたオリフィス（またはチャネル）の出口から少なくとも0.1mm、好ましくは少なくとも1mm、より好ましくは少なくとも2mm、伸長してよい。前記の最初の部分の長さは、マイクロ流体装置の排水路の全長まで、例えば校正されたオリフィスの出口から100mmであってよい。

30

【0018】

好ましい実施態様によれば、前記の第一の流体流は、ガスであり、前記微粒子は、ガスが充填された微小胞である。

【0019】

好ましくは、接触ゾーンおよび校正されたオリフィスもまた、所望の温度で維持される。そのような場合は、校正されたオリフィスと排水路との間の任意選択の校正されたチャネルもまた、好ましくは前記温度で維持される。

【0020】

本発明の別の態様によれば、得られた懸濁液は、微粒子の形成後、相対的に短い期間内に両親媒性材料の遷移温度よりも低い温度まで冷却される。例えば、懸濁液は、微粒子の形成から10秒以内、好ましくは5秒以内、さらにより好ましくは2秒以内に冷却される。好ましくは、懸濁液は、 T_m よりも少なくとも5%低い、より好ましくは少なくとも10%低い、例えば T_m の50%に至るまでの温度（ ）で冷却される。好ましい実施態様では、例えば、室温よりも高い T_m を有する両親媒性材料については、特に、微粒子懸濁液が室温で保管される場合、冷却温度は室温（例えば22）である。特定の実施態様では、懸濁液がより低い温度（例えば10）で保管される場合、冷却温度はより低くてもよく、例えば保管温度に対応する。

40

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 2 1 】

【 図 1 】 フローフォーカシング装置のコア部分の略図である。

【 図 2 】 本発明のフローフォーカシングプロセスに有用なチップの例示的な略図（上面図）を示す。

【 図 3 】 本発明のプロセスに有用な装置の例示的な略図を示す。

【 図 4 】 本発明に係る、ガスが充填された微小胞の形成中の温度制御の実験的結果を図解する。

【 図 5 】 本発明に係る、他の両親媒性材料を用いた、ガスが充填された微小胞の形成中の温度制御の実験的結果を図解する。

【 図 6 】 ガスが充填された微小胞の懸濁液に対する冷却効果の実験的結果を図解する。 10

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 2 】

図 1 は、本発明のプロセスに有用なフローフォーカシング装置（チップ）のコア部分 1 0 0 の略図を示す。チップは、第一の流体流 1 0 1 ' を供給するための第一の供給チャンネル 1 0 1、および、両親媒性材料を含む液体流を供給するための 2 つのさらなる供給チャンネル 1 0 2 a および 1 0 2 b を備える。

【 0 0 2 3 】

第一の流体流（好ましくはガス）および 2 つの液体流は、接触ゾーン 1 0 3 に向かって方向付けられて、それから、図 1 において点線として示される校正されたオリフィス 1 0 4 を通る。 20

【 0 0 2 4 】

図 1 に図解されるように、校正されたオリフィスは、好ましくはオリフィスと同一の横断面を有する校正されたチャンネル 1 0 4 ' に接続されて、今度は排水路 1 0 6 の最初の部分 1 0 5 に接続される。代替の実施態様（図示せず）では、校正されたオリフィス 1 0 4 は、排水路 1 0 6 の最初の部分 1 0 5 に直接的に接続された、すなわち校正されたチャンネルが中間にない、ノズルであってよい。

【 0 0 2 5 】

微粒子 1 0 3 ' は、校正されたオリフィス内に形成されて、校正されたチャンネル 1 0 4 ' を通って、排水路 1 0 6 の最初の部分 1 0 5 へ方向付けられる。排水路の水力直径は、一般に、校正されたオリフィスの水力直径よりも大きく、典型的に、校正されたオリフィスの最初の直径から排水路 1 0 6 の最後の直径へ増大して、回収チューブ（図示せず）の水力直径に実質的に対応して、密封されたバイアルなどのコンテナーにフローフォーカシング装置を接続する。 30

【 0 0 2 6 】

本出願人によって観察されたように、水力直径の増大（特に、高い製造速度、例えば約 1 0 ⁵ 微粒子 / s またはそれよりも高い）に起因して、流れの速度は、校正されたオリフィスの出口での相対的に高い速度から、懸濁液の定常状態の速度まで劇的に低減する（すなわち、典型的に、排水路および回収チューブにおける下流で到達する）。この負の速度勾配は、校正されたオリフィスから出る微粒子が、排水路の最初の部分において実質的により低い速度で流れている微粒子に衝突するのを生じさせ得る。微小胞の温度が十分に高くない場合、これらの衝突は、微粒子の無制御な崩壊を引き起こし得て、製剤の多分散性を望ましくなく増大させる結果を伴う。 40

【 0 0 2 7 】

本出願人によって発見されたように、そのような望ましくない合体现象は、装置の排水路の最初の部分 1 0 5 において、好ましくは接触ゾーン 1 0 3 および校正されたオリフィス 1 0 4 においても、微粒子の温度を制御することによって実質的に減少され得る。

【 0 0 2 8 】

特に、本発明によれば、排水路の最初の部分は、好ましくは、液体流内に含まれる両親媒性材料の T_m に対して 2.0 % 低い温度よりも低くない温度で維持されて、微粒子の安定化エンベロープを形成する。より好ましくは、前記温度は、両親媒性材料の T_m に対して 50

10%低い温度よりも低くない。一般に、 T_m よりも過度に高い温度を有する必要はないが、そのような温度は、両親媒性材料の熱分解耐性と互換性で、必要に応じて高くてもよく；例えば、温度は、両親媒性材料の T_m よりも20%まで高くてもよく、好ましくは10%まで高くてもよい。好ましい実施態様では、前記温度は、両親媒性材料の T_m 、またはわずかにそれより上である（例えば5%まで、より高い）。温度制御は、微粒子の水性懸濁液の流れが実質的な定常速度にまだ到達していない排水路のゾーンにおいて、例えば、絶対速度勾配が約 10 s^{-1} よりも高い場合に、特に有用である。チップの形状に応じて、前記ゾーンは、校正されたオリフィスから約 $0.1\text{ mm} \sim 100\text{ mm}$ 、好ましくは $1.0 \sim 50\text{ mm}$ 、より好ましくは $2.0 \sim 30\text{ mm}$ の長さ、伸長してよい。

【0029】

有利に、温度は、上記に規定のパラメーターを、接触ゾーンおよび校正されたオリフィス（存在する場合は、校正されたチャネル）にも適用することによって同様に制御され得る。

【0030】

本出願人によって観察されたように、制御された温度は、形成された微粒子間の合体の実質的な減少を提供する。

【0031】

合体のパーセンテージは、フローフォーカシング装置の排水路において光学顕微鏡を用いて得られた画像由来のサイズ分布のピークから、合体した微粒子の合計数を計算することによって決定され得て、例えば以下による：

- 最初に形成された微粒子 V_i の体積の2倍と等しい体積を有する微粒子（サイズ分布の2番目のピーク）の合計数に因子2を掛ける（合体した微粒子は2つの微粒子から生じたので）；および

- この数を、最初の体積の3倍を有する微粒子（サイズ分布の3番目のピーク）の合計数に因子3を掛けたものに加えて、そして、測定されたサイズ分布の n 番目のピークまで同様にする。

合体のパーセンテージは、したがって、合体した微粒子の合計数を、生産された微粒子の合計数によって標準化することによって計算され得る。

【数1】

$$coalescence \% = \frac{\sum_{n=2}^n nN_n V_i}{\sum_{n=1}^n nN_n V_i} \times 100\%$$

【0032】

一般に、約10%未満、好ましくは約5%未満、さらにより好ましくは約1%以下の合体パーセンテージ、例えば0.01%の合体パーセンテージまでが望ましい。

【0033】

加えて、装置が運転される流速もまた、微粒子の合体に影響し得る。特に、いわゆる「滴下」レジームの下では、流速が相対的に低く（例えば、約 $600\text{ }\mu\text{m}^2$ の校正されたオリフィスに関して約 $45\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ ）、微粒子サイズが典型的により大きいので（典型的に、校正されたオリフィスの横断面に対応する）、合体现象は相対的に減少する。他方で、いわゆる「噴射」レジームの下では、増大された流速は（例えば、約 $600\text{ }\mu\text{m}^2$ の校正されたオリフィスに関して $55\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ またはそれよりも高い）、低減された微粒子サイズと関連して（典型的に、流速が速ければ速いほど、微粒子はより小さくなる）、形成される微粒子の合体の増大を決定する。しかしながら、滴下レジームの下での微粒子の形成速度は約 $10^2 \sim 10^4$ 微粒子/秒であるが、噴射レジームでは、そのような形成速度は、典型的に 10^5 微粒子/秒以上に増大される。したがって、たとえ合体の観点から不利であるとしても、高い流速は、産業スケールでの微粒子の許容できる形成速度を達成するために必要である（参考文献2）。

10

20

30

40

50

【0034】

実験部分に詳細に示されるように、温度を両親媒性材料の T_m またはその付近に維持することによって、合体の減少が、（熱が加えられない場合に必要な、より高い濃度と比較して）実質的により低い濃度の両親媒性材料を用いることによって観察される。

【0035】

フローフォーカシング装置は、当技術分野で知られている任意のものであってよく、例えば、（参考文献3などを参照）に記載される。好ましくは、フローフォーカシング装置は、例えば参考文献4に記載のもののようなチップを備える。

【0036】

図2の概略図に関して、チップ200は、第一の取水路201（それを通して第一の流体（好ましくはガス）の流れが供給される）、および、2つの取水路202'および202''（それを通して液体流が供給される）を備えてよい。前記取水路のそれぞれは、それぞれのチューブを通してそれぞれのリザーバーに接続される（図示せず）。チップは、それぞれのチューブを通して、微粒子の懸濁液を回収するように適合されたコンテナ（図示せず）に接続された、排水路203をさらに備える。校正されたオリフィスに近い、取水路201aおよび202aの最後の部分の横断面は、チャンネル201bおよび202bの残部に対して実質的に減少される。この最後の部分201aおよび202aの横断面は、 $25 \sim 1 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ 、好ましくは $200 \sim 1 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ に変化してよく、有利に、校正されたオリフィスの横断面に実質的に対応する。取水路の最初の部分の横断面は、 $1 \cdot 10^3 \sim 1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$ 、好ましくは $1 \cdot 10^4 \sim 1 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ に変化してよく、一方で、それらの長さは、 $50 \text{ mm} \sim 1 \text{ mm}$ 、好ましくは $2 \text{ mm} \sim 5 \text{ mm}$ に変化してよい。同様に、排水路の最初の部分203aの横断面（図1における校正されたチャンネルに対応する）もまた相対的に減少して；その断面は、一般に、調製される微粒子の所望の直径に従って校正される（例えば参考文献4を参照）。例えば、 $5 \mu\text{m}$ の平均直径を有する単分散微粒子を調製するために、校正されたオリフィスおよび校正されたチャンネルは、約 $250 \sim 2500 \mu\text{m}^2$ の断面積を有する。有利に、取水路および排水路の横断面は実質的に同様であり、それらのそれぞれの最後および最初の部分も同様である。校正されたチャンネル203aの長さは、約 $0.05 \text{ mm} \sim 10 \text{ mm}$ 、好ましくは $1 \text{ mm} \sim 5 \text{ mm}$ に変化してよく、一方で、排水路の全長は、 100 mm まで、好ましくは 50 mm まで、より好ましくは 30 mm までであってよい。典型的に、チップは、石英ガラス、溶融シリカの両半分、または任意のプラスチック（例えばポリ（メチルメタクリレート））材料から作られる。チャンネルは、所望の深さおよび幅の全体に関して、それぞれの半分の内側表面を、乾燥または湿潤のいずれかでエッチングすることによって生産され得る。例えば、表面は、 $14 \mu\text{m}$ の一定の深さで、接触ゾーンに近いそれぞれの校正された部分に関しては $15 \sim 20 \mu\text{m}$ の幅で、残部部分に関しては $0.5 \sim 1.0 \text{ mm}$ の幅で、エッチングされ得る。本発明のプロセスでの使用に適切な市販されるチップは、例えば、Dolomite microfluidics (Royston, United Kingdom) または Micronit (Enschede, the Netherlands) から利用可能である。

【0037】

好ましい実施態様によれば、形成された微粒子の単分散性を維持するために、懸濁液はそれから、好ましくは回収ゾーン内の懸濁液の流れが実質的に定常速度に到達した時点で、両親媒性材料の T_m よりも下の温度まで急速に冷却されてよい。

【0038】

図3に関して、フローフォーカシング装置のコア部分を備えるユニット300（例えば図2に記載のチップ）は、例えば恒温浴を用いて、上述のように、両親媒性材料の T_m に近いまたはわずかにそれよりも上の所望の温度で維持され得る。第一の流体流および両親媒性材料を含む液体流は、それぞれのリザーバー301および302からユニット300へ、それぞれの供給チューブ（例えば $100 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $150 \sim 250 \mu\text{m}$ の内径を有する）を介して、ユニット300に供給される。排出チューブ303は、

ユニット 300 の排水路 (図示せず) を、適切な回収コンテナ 304、例えば密封されたバイアルに接続する。本出願人によって観察されたように、微粒子の形成から数秒以内に、好ましくは懸濁液の流れが実質的に定常速度に到達したらずに、微粒子の懸濁液の冷却を始めることが有利である。典型的に、前記冷却は、微小胞の形成から 180 秒以内、好ましくは 60 秒以内、より好ましくは 10 秒以内、さらにより好ましくは 2 秒以内に開始され得る。フローフォーカシング装置の形状に応じて、定常の流れは一般に、微粒子の形成後、数ミリ秒以内または更にそれ未満で到達されて；冷却はしたがって、微粒子の形成後、1ミリ秒から始まって適用され得る。典型的に、微粒子の懸濁液は、形成の数ミリ秒後よりも短い時間以内にユニット 300 の出口に到達するので、冷却は、ユニット 300 を出る排出チューブの最初の部分に有利に適用され得る。したがって、ガスが充填された微粒子の懸濁液の温度を、微小胞の安定化エンベロープを形成する両親媒性材料の T_m よりも下に減少させるために、排出チューブの最初の部分は、適切な冷却手段 305、例えば熱交換器によって、有利に冷却に供される。冷却に供される排出チューブの最初の部分の長さは、例えばユニット 300 の加熱温度、適用される冷却の有効性、接触時間などに依存して、例えば 1 cm ~ 100 cm、好ましくは 5 cm ~ 10 cm 変化し得る。

【 0039】

遷移温度

本明細書において、両親媒性材料の遷移温度 (T_m) を指す場合、前記温度は、単一の両親媒性構成要素または両親媒性構成要素の混合物のいずれかを指してよい。

【 0040】

特に、安定化エンベロープを形成する両親媒性材料が、異なる両親媒性構成要素の混合物である場合は、前記 T_m は、一般に、前記の両親媒性構成要素の混合物の T_m と呼ばれる。両親媒性材料の混合物については、測定される T_m は一般に、混合物の個々の構成要素の T_m のモル比加重平均に相当する。

【 0041】

脂質の遷移温度 T_m は、規則正しいゲル相から乱れた液体結晶相への脂質の物理的状態における変化を反映する。ゲル相では、脂質の炭化水素鎖は完全に伸びて、ぎっしり詰まっている。液相では、炭化水素鎖はランダムに配向されて流動性である。

【 0042】

水性脂質混合物の T_m は、示差走査熱量計 (DSC) を用いることによって有利に測定され得る。熱量測定または熱分析は、時間と温度の関数として、制御された雰囲気内で、材料の遷移に關与する熱の流れの測定を可能にする。DSC は、一定の速度 (/ 分) でサンプルを加熱または冷却することによって、サンプルと不活性参照との間の熱の流れの違いを測定する。リン脂質を含む両親媒性材料 (純粋または混合) の T_m の測定は、例えば、DSC - Q2000 装置 (TA Instruments, New Castle, DE USA) を用いることによって行われ得る。パラメーター、例えば、遷移が開始してそのピークに到達する温度、遷移のエンタルピーが、 T_m を決定するために測定される。測定の詳細は、実験部分に提供される。

【 0043】

両親媒性材料

本発明の方法での使用に適切な両親媒性材料は、例えば、リン脂質；リゾリン脂質；脂肪酸類、例えば、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸またはオレイン酸；ポリマーを保有する脂質、例えば、キチン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドンまたはポリエチレングリコール (PEG)、「ペグ化脂質」とも呼ばれる；スルホン化モノ - ジ -、オリゴ - または多糖類を保有する脂質；コレステロール、コレステロール硫酸またはヘミこはく酸コレステロール；ヘミこはく酸トコフェロール；エーテルを含む脂質またはエステル結合脂肪酸；重合脂質；リン酸ジアセチル；リン酸ジセチル；セラミド類；ポリオキシエチレン脂肪酸エステル類 (例えば、ポリオキシエチレン脂肪酸ステアリン酸)、ポリオキシエチレン脂肪族アルコール類、ポリオキシエチレン脂肪族アルコールエーテル類、ポリオキシエチル化ソルピタン脂肪酸エステル類、グリセロールポリエチレングリコール

10

20

30

40

50

リシノール酸、エトキシ化大豆ステロール類、エトキシ化ヒマシ油またはエチレンオキシド (EO) およびプロピレンオキシド (PO) ブロック共重合体；コレステロールグルクロニド、ラノステロールグルクロニド、7-デヒドロコレステロールグルクロニド、エルゴステロールグルクロニド、コレステロールグルコン酸、ラノステロールグルコン酸、またはエルゴステロールグルコン酸を含む、糖酸類のステロールエステル類；ラウリルグルクロニド、ステアロイルグルクロニド、ミリストイルグルクロニド、ラウリルグルコン酸、ミリストイルグルコン酸、またはステアロイルグルコン酸を含む、アルコール類および糖酸類のエステル；スクロースラウリン酸、フルクトースラウリン酸、スクロースパルミチン酸、スクロースステアリン酸、グルクロン酸、グルコン酸またはポリウロン酸を含む、脂肪酸類と糖類のエステル類；サルササポゲニン、スミラゲニン、ヘデラゲニン、オレアノール酸、またはジギトキシゲニンを含む、サポニン類；グリセロールモノパルミテート、グリセロールモノステアレート、グリセロールモノミリステートまたはグリセロールモノラウレートを含む、脂肪酸とのグリセロールまたはグリセロールモノエステル類；n-デシルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、またはn-オクタデシルアルコールを含む、長鎖アルコール類；6-(5-コレステン-3-イルオキシ)-1-チオ-D-ガラクトピラノシド；ジガラクトシル-ジグリセリド；6-(5-コレステン-3-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-D-ガラクト-ピラノシド；6-(5-コレステン-3-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-D-マンノ-ピラノシド；12-((7'-ジエチルアミノクマリン-3-イル)カルボニル)メチルアミノ)オクタデカン酸；N-[12-((7'-ジエチルアミノクマリン-3-イル)カルボニル)メチルアミノ]-オクタデカノイル]-2-アミノパルミチン酸；N-スクシニルジオレイルホスファチジルエタノールアミン；1,2-ジオレイル-sn-グリセロール；1,2-ジパルミトイル-sn-3-スクシニルグリセロール；1,3-ジパルミトイル-2-スクシニルグリセロール；1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロ-ホスホエタノールアミンまたはパルミトイルホモシステイン；アルキルアミン類またはアルキルアンモニウム塩類、以下を含む、少なくとも1つの(C₁₀-C₂₀)、好ましくは(C₁₄-C₁₈)、アルキル鎖、例えば、N-ステアリルアミン、N,N'-ジステアリルアミン、N-ヘキサデシルアミン、N,N'-ジヘキサデシルアミン、N-ステアリルアンモニウム塩化物、N,N'-ジステアリルアンモニウム塩化物、N-ヘキサデシルアンモニウム塩化物、N,N'-ジヘキサデシルアンモニウム塩化物、ジメチルジオクタデシルアンモニウム臭化物(DDAB)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム臭化物(CTAB)；第3級または第4級アンモニウム塩類、以下を含む、1つまたは好ましくは2つの(C₁₀-C₂₀)、好ましくは(C₁₄-C₁₈)、アシル鎖((C₃-C₆)アルキレン橋を通してN原子に連結される)、例えば、1,2-ジステアロイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DSTAP)、1,2-ジパルミトイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DPTAP)、1,2-オレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)、1,2-ジステアロイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DSDAP)；およびそれらの混合物または組み合わせを含む。

10

20

30

【0044】

好ましい実施態様によれば、微粒子のエンベロープを形成する化合物の少なくとも1つは、任意の他の上記に挙げた材料と混合されていてもよいリン脂質である。この説明によれば、用語「リン脂質」は、任意の両親媒性リン脂質化合物を包含することが意図されて、その分子は、特に、最終的な微小胞の懸濁液におけるガスと水の界面において、材料の安定化フィルムを(典型的に、モノ分子層の形態で)形成することが可能である。したがって、これらの材料は、当該分野において、「フィルム形成リン脂質」とも呼ばれる。

40

【0045】

両親媒性リン脂質化合物は、典型的に、少なくとも1つのリン酸基および少なくとも1つ、好ましくは2つの、脂溶性長鎖炭化水素基を含む。

【0046】

50

適切なリン脂質の例は、脂肪酸の1つまたは好ましくは2つの（等しい、または異なる）残基およびリン酸とグリセロールのエステルを含み、ここで、リン酸残基は、次々に、例えば、コリン（ホスファチジルコリン - PC）、セリン（ホスファチジルセリン - PS）、グリセロール（ホスファチジルグリセロール - PG）、エタノールアミン（ホスファチジルエタノールアミン - PE）、イノシトール（ホスファチジルイノシトール）などの親水性基に結合される。脂肪酸のただ1つの残基とリン脂質のエステルは、一般に、当該分野において、リン脂質の「リゾ」形態または「リゾリン脂質」と呼ばれる。リン脂質内に存在する脂肪酸残基は一般に、典型的に12～24個の炭素原子、好ましくは14～22個を含む長鎖脂肪酸類であり；脂肪族鎖は、1つまたは複数の不飽和を含んでよく、または、好ましくは完全に飽和である。リン脂質に含まれる適切な脂肪酸の例は、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、オレイン酸、リノール酸、およびリノレン酸である。好ましくは、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびアラキジン酸のような飽和脂肪酸が例示される。

10

【0047】

リン脂質のさらなる例は、ホスファチジン酸類、すなわち、脂肪酸とグリセロール-リン酸のジエステル類；スフィンゴミエリン類のようなスフィンゴ脂質類、すなわち、脂肪酸とのグリセロールジエステルの残基がセラミド鎖によって置換されているホスファチジルコリンアナログ；カルジオリピン類、すなわち、脂肪酸と1,3-ジホスファチジルグリセロールのエステル類；ガングリオシドGM1（またはGM2）またはセレブロシド類のような、糖脂質類；糖脂質；スルファチド類およびグリコスフィンゴリピド類である。

20

【0048】

本明細書において用いられる、用語「リン脂質」は、単独または混合物としてのいずれかで用いられ得る、天然起源、半合成または合成的のいずれかで調製された産物を含む。

【0049】

天然起源のリン脂質の例は、天然レシチン類（ホスファチジルコリン（PC）誘導体）、例えば、典型的に、大豆または卵黄レシチン類である。

【0050】

半合成リン脂質の例は、天然起源レシチン類の部分的または完全に水素化された誘導体である。好ましいリン脂質は、ホスファチジルコリン、エチルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールまたはスフィンゴミエリンの脂肪酸ジエステル類である。

30

【0051】

好ましいリン脂質の例は、例えば、ジラウロイル-ホスファチジルコリン（DLPC）、ジミリストイル-ホスファチジルコリン（DMPC）、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン（DPPC）、ジアラキドイル-ホスファチジルコリン（DAPC）、ジステアロイル-ホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイル-ホスファチジルコリン（DOPC）、1,2ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン（エチル-DSPC）、ジペンタデカノイル-ホスファチジルコリン（DPDPC）、1-ミリストイル-2-パルミトイル-ホスファチジルコリン（MPPC）、1-パルミトイル-2-ミリストイル-ホスファチジルコリン（PMP）、1-パルミトイル-2-ステアロイル-ホスファチジルコリン（PSPC）、1-ステアロイル-2-パルミトイル-ホスファチジルコリン（SPPC）、1-パルミトイル-2-オレイルホスファチジルコリン（POPC）、1-オレイル-2-パルミトイル-ホスファチジルコリン（OPPC）、ジラウロイル-ホスファチジルグリセロール（DLPG）およびそのアルカリ金属塩類、ジアラキドイルホスファチジル-グリセロール（DAPG）およびそのアルカリ金属塩類、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG）およびそのアルカリ金属塩類、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）およびそのアルカリ金属塩類、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（DSPG）およびそのアルカリ金属塩類、ジオレオイル-ホスファチジルグリセロール（DOPG）およびそのアルカリ金属塩類、

40

50

ジミリストイルホスファチジン酸 (DMPA) およびそのアルカリ金属塩類、ジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA) およびそのアルカリ金属塩類、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA)、ジアラキドイルホスファチジン酸 (DAPA) およびそのアルカリ金属塩類、ジミリストイル - ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジステアロイルホスファチジル - エタノールアミン (DSPE)、ジオレイルホスファチジル - エタノールアミン (DOPE)、ジアラキドイルホスファチジル - エタノールアミン (DAPE)、ジリノレイルホスファチジルエタノールアミン (DLPE)、ジミリストイルホスファチジルセリン (DMPS)、ジアラキドイルホスファチジルセリン (DAPS)、ジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS)、ジオレイルホスファチジルセリン (DOPS)、ジパルミトイルスフィンゴミエリン (DPS)、およびジステアロイルスフィンゴミエリン (DSSP)、ジラウロイル - ホスファチジルイノシトール (DLPI)、ジアラキドイルホスファチジルイノシトール (DAPI)、ジミリストイルホスファチジルイノシトール (DMPPI)、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール (DPPPI)、ジステアロイルホスファチジルイノシトール (DSPPI)、ジオレイル - ホスファチジルイノシトール (DOPPI) である。

10

【0052】

適切なリン脂質は、ポリエチレングリコール (PEG) またはポリプロピレングリコール (PPG) のような親水性ポリマーが、それに結合することによって改変されたリン脂質をさらに含む。好ましいポリマー改変リン脂質は、「ペグ化リン脂質」、すなわち、PEGポリマーに結合したリン脂質を含む。ペグ化リン脂質の例は、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン類 (短縮して「PE-PEG」)、すなわち、親水性エタノールアミン部分が可変の分子量 (例えば 300 ~ 20000 ダルトン、好ましくは 500 ~ 5000 ダルトン) の PEG 分子に結合されたホスファチジルエタノールアミン類、例えば、DPPE-PEG (または DSPE-PEG、DMPE-PEG、DAPE-PEG または DOPE-PEG) である。例えば、DPPE-PEG 2000 は、約 2000 の平均分子量を有する PEG ポリマーがそれに付着した DPPE を指す。

20

【0053】

特に好ましいリン脂質は、DAPC、DSPC、DPPC、DMPA、DPPA、DSPA、DMPG、DPPG、DSPG、DMPS、DPPS、DSPS および エチル - DSPC である。最も好ましいのは、DPPG、DPPS および DSPC である。

30

【0054】

リン脂質の混合物、例えば、DSPS、DPPS、DSPA、DPPA、DSPG、DPPG、エチル - DSPC および / または エチル - DPPC と、DPPE および / または DSPE (ペグ化誘導体を含む)、DPPC、DSPC および / または DAPC の混合物も用いられ得る。

【0055】

例えば、リン脂質の混合物は、ホスファチジルコリン誘導体、ホスファチジン酸誘導体 および ペグ化ホスファチジルエタノールアミン、例えば DSPC / DPPA / DPPE-PEG、DPPC / DPPA / DPPE-PEG、DSPC / DPPA / DSPE-PEG、DPPC / DPPA / DSPE-PEG、DAPC / DPPA / DPPE-PEG、DAPC / DPPA / DSPE-PEG、DSPC / DSPA / DPPE-PEG、DPPC / DSPA / DSPE-PEG、DSPC / DSPG / DPPE-PEG、DPPC / DSPG / DSPE-PEG を含んでよい。

40

【0056】

本発明の実施態様によれば、リン脂質は、微小胞の安定化エンベロープの主な構成要素であり、ガスが充填された微小胞のエンベロープを形成する構成要素の合計量の少なくとも 50% (w/w)、好ましくは少なくとも 75% の量である。一部の好ましい実施態様では、エンベロープの実質的に全体 (すなわち少なくとも 90% w/w) は、リン脂質から形成され得る。

50

【0057】

リン脂質は、任意の上記に挙げた両親媒性化合物との混合で好適に用いられ得る。したがって、例えば、コレステロール、エルゴステロール、植物ステロール、シトステロール、ラノステロール、トコフェロール、没食子酸プロピルまたはパルミチン酸アスコルビルのような脂質類、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸およびそれらの誘導体またはブチル化ヒドロキシトルエンおよび/または他の非リン脂質化合物のような脂肪酸は、前述のリン脂質の1つまたは複数に、例えば、好ましくは0～50重量%の範囲、より好ましくは25%までの比率で、任意選択で添加されてもよい。例えば、D S P C / D P P G / パルミチン酸、D S P C / D P P E - P E G / パルミチン酸、D P P C / D P P E - P E G / パルミチン酸、D S P C / D S P E - P E G / パルミチン酸、D P P C / D S P E - P E G / パルミチン酸、D S P C / D P P E - P E G / ステアリン酸、D P P C / D P P E - P E G / ステアリン酸、D S P C / D S P E - P E G / ステアリン酸またはD P P C / D S P E - P E G / ステアリン酸を含む、リン脂質 (p h o s p h i l i p i d) および脂肪酸を含む両親媒性材料の混合物が有利に用いられ得る。

10

【0058】

本発明の方法によって調製される微粒子は、任意選択で標的化リガンドを含んでもよい。

【0059】

用語「標的化リガンド」は、生体内の任意の生物学的または病理学的部位に向かう、本発明の組成物の微粒子の標的化活性（例えば選択的結合を含む）を有する、またはそれを促進することが可能な、任意の化合物、部分または残基をその意味の中に含む。標的化リガンドが関係し得る標的は、組織、例えば、心筋組織（心筋細胞 (m y o c a r d i a l c e l l s) および心筋細胞 (c a r d i o m y o c y t e s) を含む）、膜質組織（内皮および上皮を含む）、薄膜、結合組織（間質組織を含む）または腫瘍；血塊；および受容体、例えば、ペプチドホルモン、神経伝達物質、抗原、補体断片、および免疫グロブリンに関する細胞表面受容体、および、ステロイドホルモンに関する細胞質受容体を含む。

20

【0060】

標的化リガンドは、合成、半合成、または天然起源であってよい。標的化リガンドとして作用し得る材料または物質は、例えば、限定されないが、抗体、抗体フラグメント、受容体分子、受容体結合分子、糖タンパク質およびレクチンを含む、タンパク質；オリゴペプチドおよびポリペプチドを含むペプチド；ペプチド模倣薬；単糖類および多糖類を含む、糖類；ビタミン類；ステロイド類、ステロイドアナログ類、ホルモン類、補助因子、生物活性剤およびヌクレオシド、ヌクレオチド、および、ポリヌクレオチドを含む遺伝物質を含む。

30

【0061】

標的化リガンドは、それ自体が両親媒性化合物（微小胞の他の構成要素と混合される）、または、微粒子の形成に用いられる両親媒性分子（例えばリン脂質）に結合された化合物であってよい。

【0062】

好ましい一実施態様では、標的化リガンドは、共有結合を通して、微粒子の安定化エンベロープを形成している両親媒性分子（例えばリン脂質）に結合され得る。所望の標的化リガンドを共有結合するために、微粒子エンベロープを形成している両親媒性化合物の少なくとも一部は、したがって、適切な反応性部分を含み、相補官能性を含む標的化リガンドは、公知技術に従って、例えば微粒子の両親媒性構成要素を含む分散にそれを加えることによって、それに結合される。好ましくは、両親媒性化合物は、以前に述べられたもののような親水性ポリマーを保有する脂質、好ましくはPEG化リン脂質である。この場合では、標的化リガンドは、親水性ポリマー上の適切な反応性部分に連結される。両親媒性化合物は、微小胞を調製する前に所望の標的化リガンドと組み合わせられ得て、そのようにして得られた組み合わせは、微小胞の調製のために用いられ得る。あるいは、微小胞は、最初に製造されてよく、それは、標的化リガンドの対応する相補部分と相互作用することが可能な適切な部分を有する化合物（脂質またはポリマー改変脂質）を含み；その後、

40

50

所望の標的化リガンドが微小胞懸濁液に加えられて、微小胞上の対応する相補部分に結合する。代替の実施態様によれば、標的化リガンドは、物理的および/または静電気相互作用を介して微粒子と適切に関連されてもよい。

【0063】

液体流

本発明の方法で用いられる液体は、例えば5.0~20mg/mL、好ましくは7.5~15mg/mLの濃度で、好ましくは水性担体中に分散された、両親媒性材料(上記に定義)を含む。

【0064】

好ましくは生理的に許容できる適切な水性担体は、水(好ましくは滅菌水)、生理食塩水などの水溶液(注入のための最終産物が低張でないように有利に平衡化され得る)、または、1つまたは複数の浸透圧調節物質の溶液を含む。浸透圧調節物質は、塩類または糖類、糖アルコール類、グリコール類または他の非イオン性ポリオール材料(例えばグルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなど)、キトサン誘導体、例えば、カルボキシメチルキトサン、トリメチルキトサンまたはゲル化化合物、例えば、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルスターチまたはデキストランを含む。

【0065】

代替の実施態様では、特に、第一の流体流がガスである場合、治療的疎水性物質を微小胞内に取り込むためにさらなる油相が加えられ得る。この目的を達成するために、2つのさらなる導管が、例えば参考文献5によって説明されるように所望の油相を供給するために、装置において提供されてよい。形成された、ガスが充填された微小胞は、したがって、ガスと両親媒性材料の安定化層との間の界面に置かれた油のフィルムを有し、それは、所望の治療的薬剤とともにローディングされ得る。適切な油類は、室温で液体である任意の生体適合性の油を含んでよく、例えば、飽和または不飽和(C₂-C₁₈)アルキル鎖とグリセロールのモノ-、ジ-またはトリ-エステル(ホモ-またはヘテロ-アルキルエステル類を含む)、例えば、グリセロールモノブチリン、グリセロールモノリノール酸、1,2-ジヘキサノイルグリセロール、1,2ジオクタノイルグリセロール、1,2-ジオレイル-sn-グリセロール、トリアセチン、トリブチリン、トリカプロイン、トリカプリリン、トリカプリン、およびそれらの混合物;または天然の油類、例えば、大豆油、オリブ油、ペニバナ種子油、ヒマワリ種子油、ピーナッツ油およびそれらの混合物を含む。

【0066】

第一の流体流

好ましい実施態様によれば、第一の流体流は、ガスまたはその前駆体である。

【0067】

本発明のプロセスにおいて、任意の生体適合性ガス、ガス前駆体またはそれらの混合物が、微小胞の調製のために用いられ得る(以降、「微小胞形成ガス」としても定義される)。

【0068】

ガスは、例えば、空気;窒素;酸素;二酸化炭素;水素;亜酸化窒素;希ガスまたは不活性ガス、例えば、ヘリウム、アルゴン、キセノンまたはクリプトン;低分子量炭化水素(例えば、7個までの炭素原子を含む)、例えば、メタン、エタン、プロパン、ブタン、イソブタン、ペンタンまたはイソペンタンのようなアルカン、シクロブタンまたはシクロペンタンのようなシクロアルカン、プロペン、ブテンまたはイソブテンのようなアルケン、または、アセチレンのようなアルキン;エーテル;ケトン;エステル;ハロゲン化ガス、好ましくはフッ素化ガス、例えば、またはハロゲン化、フッ素化またはパーフルオロ化低分子量炭化水素(例えば、7個までの炭素原子を含む);または任意の前述の混合物を含んでよい。ハロゲン化炭化水素が用いられる場合、前記化合物内のハロゲン原子の好ましくは少なくとも一部、より好ましくは全て、フッ素原子である。

【0069】

10

20

30

40

50

フッ素化ガスが好ましく、特にパーフルオロ化ガスが好ましい。フッ素化ガスは、少なくとも1つのフッ素原子を含む材料、例えば、フッ素化炭化水素類（1つまたは複数の炭素原子およびフッ素を含む有機化合物）；六フッ化硫黄；フッ素化、好ましくはパーフルオロ化、ケトン類、例えば、パーフルオロアセトン；および、フッ素化、好ましくはパーフルオロ化、エーテル類、例えば、パーフルオロジエチルエーテルを含む。好ましい化合物は、パーフルオロ化ガス、例えば、 SF_6 またはペルフルオロカーボン類（パーフルオロ化炭化水素類）、すなわち、全ての水素原子がフッ素原子によって置換されている、特に安定したガスが充填された微小胞の懸濁液を形成することが知られる、炭化水素類である。

【0070】

用語ペルフルオロカーボンは、飽和、不飽和、および環状ペルフルオロカーボン類を含む。生体適合性の、生理的に許容できるペルフルオロカーボン類の例は：パーフルオロアルカン類、例えば、パーフルオロメタン、パーフルオロエタン、パーフルオロプロパン類、パーフルオロブタン類（例えば、場合によりペルフルオロ-イソブタンなどの他の異性体との混合で、ペルフルオロ-n-ブタン）、パーフルオロペンタン類、パーフルオロヘキサン類またはパーフルオロヘプタン類；パーフルオロアルケン類、例えば、パーフルオロプロペン、パーフルオロブテン類（例えばパーフルオロブト-2エン）またはパーフルオロブタジエン；パーフルオロアルキン類（例えばパーフルオロブト-2-イン）；およびパーフルオロシクロアルカン類（例えばパーフルオロシクロブタン、パーフルオロメチルシクロブタン、パーフルオロジメチルシクロブタン類、パーフルオロトリメチルシクロブタン類、パーフルオロシクロペンタン、パーフルオロメチルシクロペンタン、パーフルオロジメチルシクロペンタン類、パーフルオロシクロヘキサン、パーフルオロメチルシクロヘキサンおよびパーフルオロシクロヘプタン）である。好ましい飽和ペルフルオロカーボン類は、例えば、 CF_4 、 C_2F_6 、 C_3F_8 、 C_4F_8 、 C_4F_{10} 、 C_5F_{12} および C_6F_{14} を含む。

【0071】

任意の上記のガスの混合物を任意の比で用いることも有利であり得る。例えば、混合物は、従来のガス、例えば、窒素、空気または二酸化炭素、および、安定した微小胞懸濁液を形成するガス、例えば、六フッ化硫黄または上記に示されたとおりのペルフルオロカーボンを含んでよい。適切なガス混合物の例は、例えば参考文献6に見られ得る。以下の組み合わせが特に好ましい：ガス(A)および(B)の組み合わせであって、ガス(B)は、以前に例示されたものの中で選択されるフッ素化ガスであり（それらの混合物を含む）、(A)は、空気、酸素、窒素、二酸化炭素またはそれらの混合物から選択される。ガス(B)の量は、混合物の合計の約0.5%~約9.5% v/v、好ましくは約5%~8%存在してよい。

【0072】

特に好ましいガスは、任意選択で空気、酸素、窒素、二酸化炭素またはそれらの混合物との混合での、 SF_6 、 C_3F_8 、 C_4F_{10} またはそれらの混合物である。

【0073】

特定の状況では、ガス状物質への前駆体（すなわち、インピボでガスに変換されることが可能な材料）を含むことが望ましくあり得る。好ましくは、ガス状前駆体およびそれに由来するガスは、生理的に許容できる。ガス状前駆体は、pH活性化、光活性化、温度活性化等され得る。例えば、特定のペルフルオロカーボン類は、温度活性化ガス状前駆体として用いられ得る。これらのペルフルオロカーボン類、例えば、パーフルオロペンタンまたはパーフルオロヘキサンは、室温（または薬剤が生産および/または保管される温度）よりも高いが体温よりも低い液相/気相遷移温度を有し；したがって、それらは、液相/気相転移を受けて、ヒトの体内でガスに変換され得る。

【0074】

代替の実施態様によれば、第一の流体流の構成要素は液体であってよい。

【0075】

10

20

30

40

50

一実施態様では、前記液体は、水と実質的に非混和性である。適切な液体は、例えば、参考文献 1 に挙げたものであり、例えばアルカン類、例えば分岐または好ましくは直鎖 (C₅ - C₁₀) アルカン類、例えばペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン；アルケン類、例えば (C₅ - C₁₀) アルケン類、例えば 1 - ペンテン、2 - ペンテン、1 - オクテン；シクロ - アルカン類、例えば (C₅ - C₈) - シクロアルカン類 (1 つまたは 2 つのメチル基によって置換されてよい)、例えばシクロペンタン、シクロヘキサン、シクロオクタン、1 - メチル - シクロヘキサン；芳香族炭化水素類、例えば、ベンゼンおよび 1 つまたは 2 つのメチルまたはエチル基によって置換されたベンゼン誘導体、例えばベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、1, 2 - ジメチルベンゼン、1, 3 - ジメチルベンゼン；アルキルエーテル類およびケトン類、例えば、ジ - ブチルエーテルおよびジ - イソプロピルケトン；ハロゲン化炭化水素類またはエーテル類、例えば、クロロホルム、四塩化炭素、2 - クロロ - 1 - (ジフルオロメトキシ) - 1, 1, 2 - トリフルオロエタン (エンフルラン)、2 - クロロ - 2 - (ジフルオロメトキシ) - 1, 1, 1 - トリフルオロエタン (イソフルラン)、テトラクロロ - 1, 1 - ジフルオロエタン、および特にパーフルオロ化炭化水素類またはエーテル類、例えば、パーフルオロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロヘプタン、パーフルオロメチルシクロヘキサン、パーフルオロオクタン、パーフルオロノナン、パーフルオロベンゼンおよびパーフルオロデカリン、メチルパーフルオロブチルエーテル、メチルパーフルオロイソブチルエーテル、エチルパーフルオロブチルエーテル、エチルパーフルオロイソブチルエーテル；およびそれらの混合物を含む。

【0076】

あるいは、前記液体は、例えばグリセロールのエステル類を含む生体適合性の油、または上記に挙げた天然油類であってよい。

【0077】

第一の流体流の構成要素の沸騰温度に応じて、前記構成要素は、懸濁液の製造工程および/またはその後の保管の間に、異なる相遷移を経過し得る。

【0078】

例えば、構成要素が相対的に低い沸点を有する場合 (例えば室温よりもわずかに上)、それは室温で液体として供給され得て、それから、T_mよりも高い加熱のためガス (または蒸気) へ変換されて、続いて再び液体で、最終的な微粒子において室温で保管される。あるいは、液体の構成要素は、ガスまたは蒸気としてそれを供給するためにその沸点よりも上 (例えば T_m またはその付近) で加熱されてよく；室温での微粒子の冷却の際に、それから構成要素は凝縮して、したがって液体が充填された微小滴を提供する。

【0079】

一実施態様によれば、校正された液体が充填された微小滴の生じた懸濁液は、凍結乾燥されたケーキを得るためにその後の凍結乾燥プロセスを受けてよく、それから、例えば参考文献 1 に説明されるように、ガス (上記に例示したものなど) の雰囲気下でバイアル内に保管されてよい。ケーキはそれから、適切な水性の液体を用いて穏やかな攪拌によって再構成されて、ガスが充填された微小胞の懸濁液を得ることができる。このケーキにおいて、溶解保護剤 (例えば参考文献 1 に例示されるものの 1 つ) が懸濁液へ、液体流または微小滴の形成された水性懸濁液へ直接添加され得る。

【0080】

使用

本発明の方法によって調製される微粒子は、特に超音波および磁気共鳴を含む様々な診断および/または治療的技術において用いられ得る。

【0081】

診断技術は、前臨床および臨床研究目的のための撮像を含む、ガスが充填された微小胞の使用が動物 (ヒトを含む) の体の一部または部分の可視化を高めるのを可能にする任意の方法を含む。様々な撮像技術が、例えば、基本およびハーモニック B モード撮像、振幅変調、パルスまたは転相撮像および基本およびハーモニックドップラー撮像を含む、超音

10

20

30

40

50

波適用において用いられ得て；必要に応じて三次元撮像技術が用いられ得る。

【 0 0 8 2 】

診断使用のための微小胞は、例えばそれらのそれぞれの組成、撮像される組織または臓器および/または選択される撮像技術に依存して、患者のkgあたり約0.01~約1.0μLのガスの濃度で(例えば注入によって)投与され得る。この一般的な濃度範囲は、もちろん、特定の撮像適用に応じて、例えば、振幅変調およびパルス反転撮像のような、非常に低い投与量でシグナルが観察され得る場合、変化し得る。

【 0 0 8 3 】

あり得る他の診断撮像適用は、シンチグラフィー、光撮像、および、X線位相コントラスト撮像を含むX線撮像を含む。

10

【 0 0 8 4 】

治療的技術は、患者の治療(上記に定義)の任意の方法を含み、それ自体として(例えば超音波が介在する治療 虚血性脳卒中、凝血溶解など)または治療的薬剤と組み合わせ(例えば、遺伝子治療またはワクチンとしての使用における、例えば、選択部位または組織への生体活性化化合物の送達のため)、微粒子の使用を含み、それ自体によって、または、様々な物理的方法(例えば超音波が介在する送達を含む)による特定の活性化の際に、生物学的効果をインピトロおよび/またはインピボで与える要因となり、または与えることが可能である。

【 0 0 8 5 】

治療的処置のための微小胞は、例えばそれらのそれぞれの組成、治療される対象のタイプ、治療される組織または臓器および/または適用される治療的方法に依存して、典型的に、患者のkgあたり約0.01~約5.0μLのガスの濃度で投与されてよい。以下の実施例は、本発明をさらに説明するのを助ける。

20

【実施例】

【 0 0 8 6 】

材料

DPPC	ジパルミトイル-ホスファチジルコリン	(1)
DSPC	ジステアロイル-ホスファチジルコリン	(1)
DPPA	ジパルミトイルホスファチジン酸	(1)
DPPE-PEG5000	ジパルミトイルホスファチジエタノールアミン-ポリエチレングリコール5000	(1)

30

(1) CordenPharma International, Plankstadt, Germany

【 0 0 8 7 】

実施例 1

両親媒性材料の水性分散の調製

40

異なる相遷移温度(T_m)を有する両親媒性材料の2つの混合物を用いた：

M1：DSPC：DPPA：DPPE-PEG5000(T_m=55)

M2：DPPC：DPPA：DPPE-PEG5000(T_m=44)

両方とも、8：1：1のモル比。

【 0 0 8 8 】

材料を、両親媒性材料の完全な溶解まで、60での攪拌下で、20mg/mLの濃度において上記モル比で、2：1(体積比)クロロホルム/メタノール混合物に加えた。それから、減圧下で溶媒を蒸発させて、得られたフィルムを減圧下で一晩乾燥させた。それから、乾燥された材料を、攪拌下で30分間、60にて、グリセロール、プロピレングリコール、および水の混合物(GPW、5：5：90の体積比)中に、(「微小胞の調製

50

」の部分に詳述される5～15 mg/mLの濃度で)再分散させた。TRISバッファー(20 mM)を添加してpH値を7に調節した。それから、チップ超音波処理器(Branson Sonifier 250)を用いて分散を超音波処理して、材料を均質に分散させた。それから調製物を、ポリカーボネートフィルター(0.45 μmポアサイズ)を用いて濾過して、室温まで冷却してガスを抜いた。

【0089】

遷移温度の測定

両親媒性材料(純粋なDPPCまたはDSPC、および、DPPC:DPPA:DPPE-PEG5000またはDSPC:DPPA:DPPE-PEG5000の混合物)の遷移温度を、Tzeroアルミニウム坩堝を備える工業用示差走査熱量計DSC-Q2000(TA Instruments, New Castle, DE USA)を用いて決定した。温度および熱の流れを含むシステム校正を、インジウム金属(融解エンタルピー28.71 J/g ± 0.5 J/g; 融解開始温度156.6 ± 0.25)を用いて行なった。

10

【0090】

GPW/TRISにおける両親媒性材料(純粋または混合)の分散を、DSC測定のために上述の手順に従って調製した(それぞれ約30 μL、濃度10 mg/mL)。

【0091】

DSC測定は、20～80の温度範囲にわたって2/分の一定温度速度で加熱することによって行なわれた。窒素を50 mL/分の流速でガス抜きとして用いた。

20

【0092】

結果を以下の表に示す：

	開始遷移温度 (°C)	遷移ピーク T_m (°C)
DPPC	40	42
DSPC	52	55
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	41	44
DSPC/DPPA/DPPE-PEG5000	52	55

30

【0093】

実施例 2

ガスが充填された微小胞の調製

市販のチップホルダー(Dolomite microfluidics, パートナンバー: 3000024, 3000109, 3000021)内に乗せられた市販のマイクロ流体フローフォーカシング装置(Dolomite microfluidics, 小液滴チップ、14 μmエッチング深さ、パートナンバー3200136)を用いて微小胞を合成して、チップからガスおよび液体供給チューブへの漏れを防いだ接続を可能にした(Peek Upchurch, 1/16インチ O.D, 150 μm I.D.)。微小胞形成チャンネルは、17 μmの幅および135 μmの長さを有した。全体的なチャンネル深さは14 μmであった。チップおよびそのホルダーを、20倍拡大対物(Olympus, LMPLAN 20x)およびCCDカメラ(Lumenera, LM156M)を備える倒立顕微鏡上に乗せられた光学的に透明な温度制御された水浴内に置いた。シリンジポンプ(Harvard PHD 4400)を用いて液体並行流の速度を制御した。ガス(SF₆)を、圧力センサー(Omega, DPG1000B-30G)に接続された調

40

50

圧装置 (Omega, PRG101-25) を用いて圧力制御した。個々の微小胞は、記録された光学画像から自動的に検出されて、Matlabソフトウェア (The Mathworks Inc., Natick, MA) を用いてPC上で、オフラインでそれらのサイズを測定した。2つの異なる液体並行流の速度を試験して ($45 \mu\text{L}/\text{分}$ または $55 \mu\text{L}/\text{分}$)、それぞれ、滴下レジーム下で、またはより好ましい噴射レジーム下で、フローフォーカシング装置を運転した。

【0094】

微小胞懸濁液を密封されたバイアル内に集めて、室温で保管した。

【0095】

形成された微小胞を加熱する効果

図4a~4eは、 $5 \sim 15 \text{ mg/mL}$ の範囲の両親媒性材料の濃度で (それぞれ図4a~4e)、マイクロ流体チップ (図2に示されるものと同様) を含む恒温浴の異なる温度で、上記のように調製されたDSPC/DPPA/DPPE-PEG5000懸濁液 ($T_m 55$) の液体並行流を用いて得られた結果を示す。四角 () は、滴下レジーム下で行なわれた実験を示し、一方で、三角 () は、より好ましい噴射レジーム下で行なわれた実験を示す。

【0096】

これらの図において観察され得るように、微小胞の合体のパーセンテージ ($C [\%]$) は、噴射レジームと比較して滴下レジームにおいて一般により低い。加えて、滴下および噴射レジーム下の両方とも、温度を上げることにより合体を減少させる有利な効果が明らかである。特に、噴射レジームを考慮すると、 7.5 mg/mL の濃度に関して (図4b)、両親媒性の混合物の $T_m (55)$ 、またはそれよりも高くまで温度を上げることは、約10%またはそれよりも少ない微小胞の合体をもたらす。さらに噴射レジームに焦点を合わせると、両親媒性材料の T_m またはそれよりも高く同様に加熱することは、 10 mg/mL の両親媒性材料の濃度に関して1%未満の合体を提供する (図4c)。両親媒性材料の濃度を 15 mg/mL に増大することによって (図4e)、同様の結果を室温で得ることができる。この場合、両親媒性材料の濃度は、50%増大される必要があることに注意する。

【0097】

これらの結果は、したがって、両親媒性材料の T_m 付近に温度を維持することによって、(より低い温度での同一の調製に関して測定される、より高い合体と比較して) 合体効果の減少を得ることができることを示す。結果は、温度を両親媒性材料の T_m 付近に維持することにより、(熱が加えられない場合に必要とされるより高い濃度と比較して) 実質的により低い濃度の両親媒性材料を用いて同様のパーセンテージの合体が得られ得ることをさらに示す。

【0098】

図5は、 10 mg/mL の両親媒性材料の濃度で、恒温浴の異なる温度で、上記のように調製されたDPPC/DPPA/DPPE-PEG5000懸濁液 ($T_m 44$) の液体並行流を用いて得られた結果を示す。上述の結果と同様に、この場合においても、1%またはそれよりも少ない合体が、両親媒性材料の T_m に近いまたはそれよりも高い温度に加熱した場合に得られる。

【0099】

懸濁液を下流冷却する効果

微小胞の分散度に対する下流冷却の効果を評価するために、異なる冷却条件が試験された。

【0100】

セットアップA (早期冷却の懸濁液) によれば、懸濁液は、微小胞形成の3ms後に (20 で) 熱交換器を通過して、懸濁液の温度を T_m よりも下へ、特に室温に、急に減少させた。したがって、恒温浴内のチップから出るチューブは、チップの出口からおよそ0.5mm後に熱交換器を通過した。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

セットアップ B (後期冷却の懸濁液) によれば、懸濁液は、微小胞形成の 3 分後によ^うやく、同じ熱交換器を通過した。したがって、この 2 つ目の構成では、チップから出るチューブは、1 mm の内径を有するチューブによって置き換えられて、このチューブは、およそ 20 cm の長さを恒温浴内に維持されて、それから、熱交換器を通過した。

【 0 1 0 2 】

両方のセットアップは、55、65 および 75 μL / 分の流速で試験されて、結果をそれぞれ、図 6 a、6 b および 6 c に示す (X 軸 = 直径 (mm)、Y 軸 = 数による微小胞の相対カウント)。図 6 a ~ 6 c では、破線は、後期冷却の調製のサイズ分布を示し、一方で、実線は、早期冷却の調製のサイズ分布を示す。これらの図から、早期冷却の懸濁液の PDI は、対応する後期冷却の懸濁液のものと比較してより低いことが明らかである。さらに、これらの図から、微小胞の平均サイズは、流速の増大に伴い低減することが理解され得る。

10

【 0 1 0 3 】

同様の結果が、両親媒性材料の他の混合物、特に、以前に例示された両親媒性材料の組み合わせによって得られ得る。

【 0 1 0 4 】

引用文献

(1) WO 04/069284

(2) Utada, A. S et al., "Dripping to jetting transitions in co-flowing liquid streams", *Phys. Rev. Lett.* 2007, 99, 094502

(3) Intl. Pat. Appl. WO 2013/141695

(4) Castro-Hernández, E. et al., "Microbubble generation in a co-flow device operated in a new regime", *Lab. Chip.* 2011, 11 (12), 2023-9

(5) R. Shih et al., "Flow-focusing regimes for accelerated production of monodisperse drug-loadable microbubbles toward clinical-scale applications", *Lab. Chip* 13, 4816-4826 (2013)

(6) Intl. Pat. Appl. WO 95/16467

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

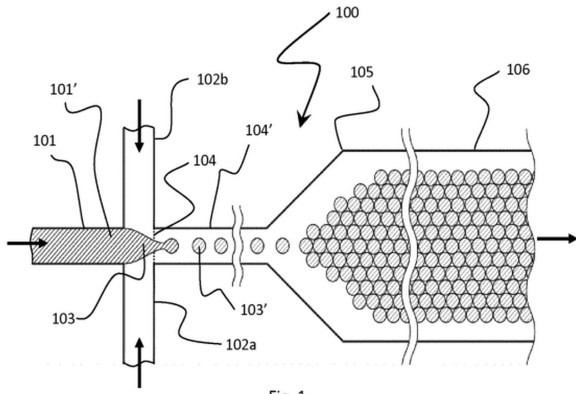


Fig. 1

【図 2】

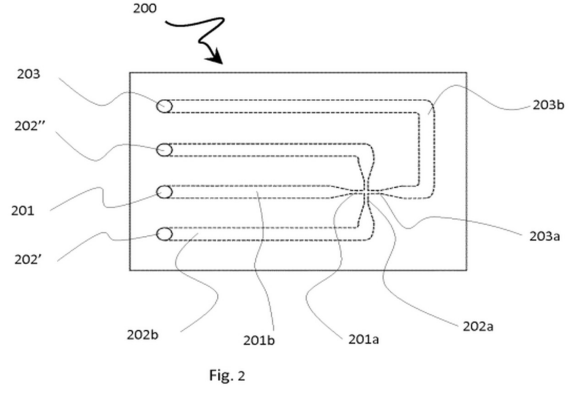


Fig. 2

【図 3】

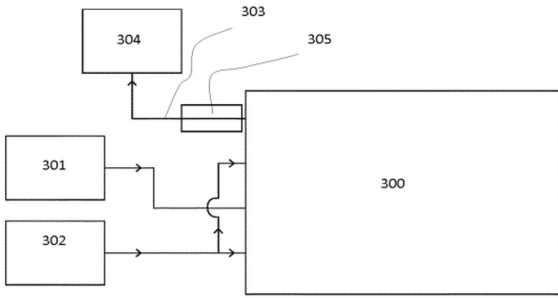


Fig. 3

【図 4】

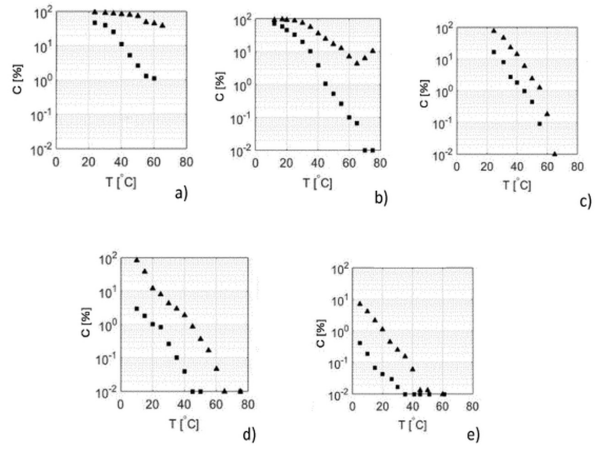


Fig. 4

10

20

30

40

50

【 5 】

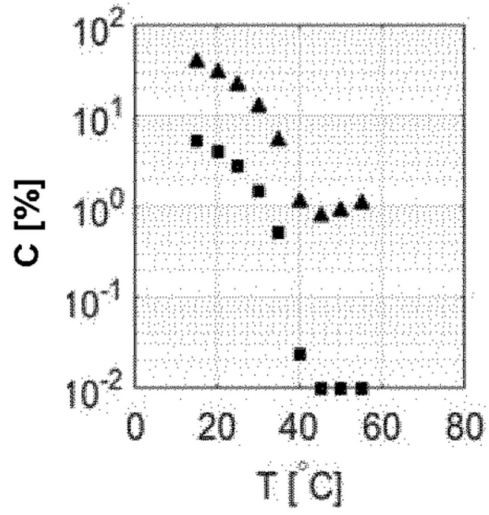


Fig. 5

【 6 】

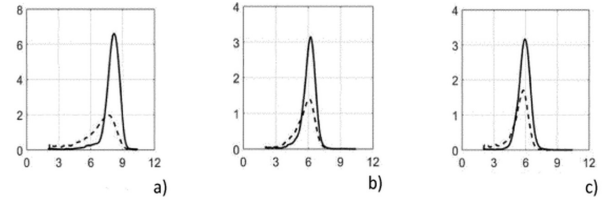


Fig. 6

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- コ・スイス・ソシエテ・アノニム内
 (72)発明者 フリンキング ピーター
 スイス国 1 2 2 8 プラン レ ズウアト ルート ド ラ ガレーズ 3 1 ブラッコ・スイス・ソ
 シエテ・アノニム内
- (72)発明者 ラッソ アンネ
 スイス国 1 2 2 8 プラン レ ズウアト ルート ド ラ ガレーズ 3 1 ブラッコ・スイス・ソ
 シエテ・アノニム内
- (72)発明者 ブッサ フィリップ
 スイス国 1 2 2 8 プラン レ ズウアト ルート ド ラ ガレーズ 3 1 ブラッコ・スイス・ソ
 シエテ・アノニム内
- (72)発明者 ゴー エマニュエル
 スイス国 1 2 2 8 プラン レ ズウアト ルート ド ラ ガレーズ 3 1 ブラッコ・スイス・ソ
 シエテ・アノニム内
- (72)発明者 シェルカウイ サミール
 スイス国 1 2 2 8 プラン レ ズウアト ルート ド ラ ガレーズ 3 1 ブラッコ・スイス・ソ
 シエテ・アノニム内
- 審査官 参鍋 祐子
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 0 9 8 9 3 7 (W O , A 1)
 特開昭 6 3 - 0 3 9 8 1 0 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 2 1 2 3 1 (U S , A 1)
 Lab Chip. , Vol.7(4) , 2007年 , pp.463-468
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 A 6 1 K 4 7 / 0 0
 A 6 1 K 9 / 0 0
 A 6 1 K 4 9 / 0 0
 P u b M e d