

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-117005

(P2016-117005A)

(43) 公開日 平成28年6月30日(2016.6.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
B O 1 J 13/04 (2006.01)	B O 1 J 13/04	4 B O 1 8
B O 1 F 7/32 (2006.01)	B O 1 F 7/32 A	4 C O 7 6
B O 1 F 15/06 (2006.01)	B O 1 F 15/06 Z	4 D O 7 6
B O 1 F 15/02 (2006.01)	B O 1 F 15/02 A	4 G O O 5
B O 1 D 1/00 (2006.01)	B O 1 F 15/02 C	4 G O 3 7
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-257283 (P2014-257283)	(71) 出願人	306037311
(22) 出願日	平成26年12月19日 (2014.12.19)		富士フイルム株式会社
			東京都港区西麻布2丁目26番30号
		(74) 代理人	110000109
			特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	杉山 享
			神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地
			富士フイルム株式会社内
		(72) 発明者	山田 直樹
			神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地
			富士フイルム株式会社内
		(72) 発明者	杉山 茂久
			神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地
			富士フイルム株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 リポソームの製造方法及びリポソーム製造装置

(57) 【要約】

【課題】設備化コストを削減することができ、かつ迅速な脱溶媒が可能なリポソームの製造方法、及び上記方法に使用するためのリポソーム製造装置を提供すること。

【解決手段】少なくとも1種の脂質が有機溶媒に溶解している油相と水相とを含む混合液を攪拌する攪拌工程、及び前記混合液から有機溶媒を蒸発させる蒸発工程を含む、リポソームの製造方法であって、前記蒸発工程において、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した有機溶媒を除去するリポソームの製造方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 種の脂質が有機溶媒に溶解している油相と水相とを含む混合液を攪拌する攪拌工程、及び前記混合液から有機溶媒を蒸発させる蒸発工程を含む、リボソームの製造方法であって、前記蒸発工程において、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した有機溶媒を除去するリボソームの製造方法。

【請求項 2】

前記攪拌工程及び前記蒸発工程をタンク中で行い、蒸発工程の開始時におけるタンク中の混合液の液水平面の幅の最も広い部分の長さ A と、液の深さの最も深い部分の長さ B との比率である A/B が、2 以上である、請求項 1 に記載のリボソームの製造方法。

10

【請求項 3】

前記攪拌工程及び前記蒸発工程をタンク中で行い、蒸発工程の開始時におけるタンク中の気体空間の水平面の幅の最も広い部分の長さ C と、前記気体空間の高さの最も長い部分の長さ D との比率である C/D が、3 以上である、請求項 1 又は 2 に記載のリボソームの製造方法：ここで前記気体空間とは、液面上を水平方向に流れている気体が占める空間を意味する。

【請求項 4】

タンクの容量が 10 L 以上 100 L 以下である、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載のリボソームの製造方法。

【請求項 5】

前記蒸発工程を、遠心式攪拌機を用いて攪拌しながら行う、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載のリボソームの製造方法。

20

【請求項 6】

遠心式攪拌機が 2 ～ 10 個の吐出口を有し、吐出口の開口面積合計 $\times$ 円周長で示される吐出量係数が $60 \text{ cm}^3 \sim 6000 \text{ cm}^3$ であり、遠心式攪拌機の回転数が 100 ～ 1500 rpm である、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載のリボソームの製造方法。

【請求項 7】

前記蒸発工程において、容器上部の中央部から気体を容器内に吸入し、容器上部の周辺部から気体及び凝結した有機溶媒を排出させる、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のリボソームの製造方法。

30

【請求項 8】

タンクと攪拌機とジャケットとを含むリボソーム製造装置であって、前記タンク内の空間の断面は円形状を有し、前記断面の円の大きさはタンクの高さに応じて変化していてもよく、タンク上部の蓋部の中心部からタンク内に攪拌機が挿入され、タンクの周囲にはタンク内の温度を制御するためのジャケットが設けられ、タンク上部の蓋部の中央部には、タンク内に気体を吸入するための吸入口が 1 個以上設けられ、タンク上部の蓋部の周辺部には、タンク内から気体及び凝結有機溶媒を排出するための排出口が 1 個以上設けられているリボソーム製造装置。

【請求項 9】

タンクの容量が 10 L 以上 100 L 以下である、請求項 8 に記載のリボソーム製造装置。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はリボソームの製造方法及びリボソーム製造装置に関する。本発明は、好適に医薬品用途として用いることのできるリボソームの製造方法及びリボソーム製造装置に関する。

【背景技術】

【0002】

リボソーム（以下、脂質小胞体とも呼ばれる）は、脂質を用いた脂質二重膜で形成される閉鎖小胞体であり、リボソームを分散している水溶液（外水相）と、その閉鎖小胞の空

50

間内に水相（内水相）を有する。リボソームは、バリア能、化合物保持能、生体適合性、粒径設定の自由度、易分解性、表面修飾性等の特徴を生かして、免疫センサー、人工赤血球、薬物送達システムのキャリアーなど多様な応用が検討されてきた。キャリアーの用途において、リボソームは、水溶性化合物、脂溶性低分子、高分子と幅広い物質を内包することができる。リボソームの製造法の一例としては、水相と油相とを攪拌装置内で攪拌して乳化し、その後に脱溶媒することにより製造する方法が挙げられる。

【0003】

特許文献1（段落番号0074）には、オイルベース溶液Aを水性溶液Bに添加した分散系を攪拌したのち、窒素でフラッシュし、さらに残留する塩化メチレンを蒸発させるため55で60分間保持してエマルジョンを調製することが記載されている。特許文献2（実施例9）には、エマルジョンを円筒形密閉容器に注ぎ室温で400rpmで攪拌すると同時に、中空系の内側に窒素ガスを1時間通気して容器内から塩化メチレンを除去することによりマイクロスフェア粒子を得ることが記載されている。特許文献3（段落番号0149）、特許文献4（特許請求の範囲第4項など）及び特許文献5においても、製造したエマルジョンについて溶媒除去を行うことが記載されている。同様に、特許文献6（実施例3）、特許文献7（実施例4）、特許文献8（段落0103）、特許文献9（実施例3）においても、製造したエマルジョン等から溶媒除去を行うことが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特表2005-505645号公報

【特許文献2】WO01/083594号公報

【特許文献3】特開2010-285438号公報

【特許文献4】特表平09-503225号公報

【特許文献5】特表平02-502460号公報

【特許文献6】特開平01-009931号公報

【特許文献7】特表2002-516260号公報

【特許文献8】特表2013-529677号公報

【特許文献9】特表2001-505224号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

リボソームの調製においては、乳化工程で微細化した分散物の再合一を防止し、粒径を安定化させるために、脱溶媒工程により液体中の溶媒を速やかに除去することが重要である。脱溶媒のためには温水ジャケット等による外部からの熱供給が必要であるが、調液スケールが大きくなると液体の体積当たりの伝熱面積が小さくなるため、熱供給量が十分でなく蒸発速度が低下してしまう。この結果、分散物の再合一が進み、リボソームの粒径を小さくすることができなくなる。

【0006】

また、速やかな脱溶媒のためには、蒸発した溶媒ガス及び水蒸気を気体状態のまま、脱溶媒容器外に速やかに排出する必要があるが、このためには大量のクリーンエア又は窒素（キャリアガス）が必要となり、これらを供給するための設備投資負担が過大となり、実用化の障害となっていた。キャリアガスの量を少なくするためにはキャリアガスを加温し飽和蒸気量を大きくすれば良いが、キャリアガスの加温設備の投資が必要となり、問題の解決にはならなかった。

【0007】

本発明は、設備化コストを削減することができ、かつ迅速な脱溶媒が可能なリボソームの製造方法、及び上記方法に使用するためのリボソーム製造装置を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、油相と水相とを含む混合液を攪拌する攪拌工程、及び上記混合液から有機溶媒を蒸発させる蒸発工程を含むリボソームの製造方法における上記蒸発工程において、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した有機溶媒を除去することによって、迅速に脱溶媒できることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

【 0 0 0 9 】

(1) 少なくとも 1 種の脂質が有機溶媒に溶解している油相と水相とを含む混合液を攪拌する攪拌工程、及び上記混合液から有機溶媒を蒸発させる蒸発工程を含む、リボソームの製造方法であって、上記蒸発工程において、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した有機溶媒を除去するリボソームの製造方法。

10

(2) 上記攪拌工程及び上記蒸発工程をタンク中で行い、蒸発工程の開始時におけるタンク中の混合液の液水平面の幅の最も広い部分の長さ A と、液の深さの最も深い部分の長さ B との比率である A / B が、2 以上である、(1) に記載のリボソームの製造方法。

(3) 上記攪拌工程及び上記蒸発工程をタンク中で行い、蒸発工程の開始時におけるタンク中の気体空間の水平面の幅の最も広い部分の長さ C と、上記気体空間の高さの最も長い部分の長さ D との比率である C / D が、3 以上である、(1) 又は (2) に記載のリボソームの製造方法：ここで上記気体空間とは、液面上を水平方向に流れている気体が占める空間を意味する。

(4) タンクの容量が 1 0 L 以上 1 0 0 L 以下である、(1) から (3) の何れかーに記載のリボソームの製造方法。

20

(5) 上記蒸発工程を、遠心式攪拌機を用いて攪拌しながら行う、(1) から (4) の何れかーに記載のリボソームの製造方法。

(6) 遠心式攪拌機が 2 ~ 1 0 個の吐出口を有し、吐出口の開口面積合計 $\times$ 円周長で示される吐出量係数が $6 0 \text{ cm}^3 \sim 6 0 0 0 \text{ cm}^3$ であり、遠心式攪拌機の回転数が 1 0 0 ~ 1 5 0 0 r p m である、(1) から (5) の何れかーに記載のリボソームの製造方法。

(7) 上記蒸発工程において、容器上部の中央部から気体を容器内に吸入し、容器上部の周辺部から気体及び凝結した有機溶媒を排出させる、(1) から (6) の何れかーに記載のリボソームの製造方法。

(8) タンクと攪拌機とジャケットとを含むリボソーム製造装置であって、上記タンク内の空間の断面は円形状を有し、上記断面の円の大きさはタンクの高さに応じて変化していてもよく、タンク上部の蓋部の中心部からタンク内に攪拌機が挿入され、タンクの周囲にはタンク内の温度を制御するためのジャケットが設けられ、タンク上部の蓋部の中央部には、タンク内に気体を吸入するための吸入口が 1 個以上設けられ、タンク上部の蓋部の周辺部には、タンク内から気体及び凝結有機溶媒を排出するための排出口が 1 個以上設けられているリボソーム製造装置。

30

(9) タンクの容量が 1 0 L 以上 1 0 0 L 以下である、(8) に記載のリボソーム製造装置。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、脱溶媒に必要なキャリア風（窒素又はクリーンエア）の使用量を削減でき、設備化コストを削減することができる。また本発明によれば、蒸発潜熱をミスト化で回収することで熱収支を効率化し、迅速な脱溶媒を実現できる。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 図 1 は、遠心式攪拌機の構成例を示す。

【 図 2 】 図 2 は、本発明のリボソーム製造装置の構成例の上面図を示す。

【 図 3 】 図 3 は、本発明のリボソーム製造装置の構成例の断面図を示す。

【 図 4 】 図 4 は、実施例で用いた乳化装置の構成を示す。

【 発明を実施するための形態 】

50

【 0 0 1 2 】

本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけではなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の所期の目的が達成されれば、本用語に含まれる。

また本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

本明細書において組成物中の各成分の量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する上記複数の物質の合計量を意味する。

【 0 0 1 3 】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明によるリポソームの製造方法は、少なくとも１種の脂質が有機溶媒に溶解している油相と水相とを含む混合液を攪拌する攪拌工程、及び上記混合液から有機溶媒を蒸発させる蒸発工程を含む、リポソームの製造方法であって、上記蒸発工程において、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した溶媒を除去する方法である。

【 0 0 1 4 】

乾燥技術及び脱溶媒技術の基本的な考え方としては、蒸発した溶媒ガス及び水蒸気は、飽和蒸気量以下を維持するのに十分な量及び温度のキャリアガスを吹き込むことにより系外に排出することが原則であり、飽和蒸気量を上回る条件下で脱溶媒する系は知られていない。従って、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した有機溶媒を除去することを含む本発明によるリポソームの製造方法は、発想自体が新規である。凝結した有機溶媒を除去することがこれまで発想されなかった理由としては、凝結した溶媒または水は、容器外に迅速に排出しないと、容器内壁又は排気ダクトで水滴化し還流してしまうため、脱溶媒効率が著しく低下することが懸念されたためであると考えられる。上記の通り、本発明の思想は、従来の基本原則とは正反対であり、それにより迅速な脱溶媒を達成できたことは全く予想外の有利な効果である。

【 0 0 1 5 】

即ち、本発明によれば、溶媒ガスおよび水蒸気の一部又は全部を、露点以下で凝結（ミスト化）した状態でキャリアガスに載せて物理的に排出することにより、飽和蒸気圧に制約されず、より少量のキャリアガスで溶媒を系外に排出することが可能である。この際、溶媒及び水が一旦蒸発した時に吸収された潜熱を、ミスト化時の発熱で回収することで、より少ないジャケットの熱供給で、迅速な脱溶媒が可能である。またキャリアガスの加熱設備も不要となった。

【 0 0 1 6 】

（リポソーム）

リポソームとは、脂質分子を含む脂質二重層から形成される脂質小胞体であり、具体的には、脂質分子の疎水性基と親水性基の極性に基づいて生じる脂質二重層により外界から隔てられた空間を有する閉鎖された脂質を含む小胞体を意味する。リポソームは、脂質を用いた脂質二重膜で形成される閉鎖小胞体であり、その閉鎖小胞の空間内に水相（内水相）を有する。内水相には、水等が含まれる。リポソームはシングルラメラ（単層ラメラ、ユニラメラ、二重層膜が一重）であっても、多層ラメラ（マルチラメラ、タマネギ状の構造をした多数の二重層膜で、個々の層は水様の層で仕切られている）であってもよいが、本発明では、医薬用途での安全性及び安定性の観点から、単層ラメラのリポソームであることが好ましい。

【 0 0 1 7 】

リポソームは、薬物を内包することのできるリポソームが好ましく、その形態は特に限定されない。「内包」とは、リポソームに対して薬物が内水相および膜自体に含まれる形態をとることを意味する。例えば、膜で形成された閉鎖空間内に薬物を封入する形態、膜自体に内包する形態などが挙げられ、これらの組合せでもよい。

【 0 0 1 8 】

リポソームの大きさ（平均粒子径）は特に限定されないが、球状またはそれに近い形態

10

20

30

40

50

をとることが好ましく、好ましくは100nm以下、より好ましくは30～70nm、さらに好ましくは40～60nm、特に好ましくは40～55nmである。なお、本発明において、「平均粒子サイズ」とは、動的光散乱法により測定されるリボソームの直径の体積平均値を意味する。

【0019】

リボソームの脂質二重層を構成する成分（膜成分）は、脂質から選ばれる。脂質として、水溶性有機溶媒及びエステル系有機溶媒の混合溶媒に溶解するものであれば任意に使用することができる。脂質として、具体的には、リン脂質、リン脂質以外の脂質、コレステロール類及びそれらの誘導体等が挙げられる。これらの成分は、単一種又は複数種の成分から構成されてよい。

10

【0020】

リン脂質としては、ホスファチジルコリン（レシチン）、ホスファジルグリセロール、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、ホスファチジイルノシトール、スフィンゴミエリン、カルジオリピン等の天然あるいは合成のリン脂質、又はこれらに水素添加したもの（例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC））等が挙げられる。これらのなかでも、水素添加大豆ホスファチジルコリンなどの水素添加されたリン脂質、スフィンゴミエリン等が好ましい。なお、本発明において、「リン脂質」とはリン脂質に修飾を加えたリン脂質誘導体も包含する。

【0021】

リン脂質以外の脂質としては、リン酸を含まない脂質が挙げられ、特に限定されないがリン酸部分をその分子内に有しないグリセロ脂質、リン酸部分をその分子内に有しないスフィンゴ脂質等が挙げられる。なお、本発明において、「リン脂質以外の脂質」とはリン脂質以外の脂質に修飾を加えたリン脂質以外の脂質の誘導体も包含する。

20

【0022】

リン脂質以外の脂質が塩基性官能基を含む場合、例えば、脂質に塩基性官能基を有する化合物が結合した物質である場合、脂質はカチオン化脂質と呼ばれる。カチオン化脂質は、例えば、リボソームの膜を修飾することが可能となり、標的部位である細胞との接着性等を高めることができる。

【0023】

コレステロール類としては、シクロペンタヒドロフェナントレンを基本骨格とし、その一部あるいはすべての炭素が水素化されているコレステロール及びその誘導体を挙げることができる。具体例としては、特に限定されないがコレステロールが挙げられる。平均粒子サイズが100nm以下に微細化していくと脂質膜の曲率が高くなる。リボソームにおいて配列した膜のひずみも大きくなるため、水溶性薬物は更に漏出しやすくなる。しかし、漏出性を抑制する手段として、脂質による膜のひずみを埋める（膜安定化効果）ために、コレステロールなどを添加することが有効である。

30

【0024】

リボソーム組成物において、コレステロール類の添加は、リボソームの膜のすきまを埋めるなどして、リボソームの膜の流動性を下げる作用をすると期待される。一般には、リボソームにおいて、コレステロール類の量は、脂質成分の合計（総脂質）mol中、通常50mol%程度までの量で含むことが望ましいとされている。

40

本発明では、リボソーム組成物の脂質成分の合計（リボソーム組成物に含まれる総脂質）mol中、好ましくはコレステロール類の含有率は10～35mol%であり、より好ましくは15～25mol%、より好ましくは17～21mol%である。

【0025】

リボソームには、上記の成分の他に、血中滞留性の改善のために親水性高分子等、膜構造の安定剤として脂肪酸、ジアセチルホスフェート等、抗酸化剤として α -トコフェロール等を加えてもよい。本発明では、医薬用途において静脈注射用途での使用が認められていない分散助剤などの添加剤、例えば、界面活性剤等を用いないことが好ましい。

【0026】

50

リポソームには、リン脂質、リン脂質以外の脂質、コレステロール類及びそれらの誘導体として、リン脂質、リン脂質以外の脂質、コレステロール類を親水性高分子で修飾することが含有することが好ましい。

【0027】

親水性高分子としては、特に限定されないがポリエチレングリコール類、ポリグリセリン類、ポリプロピレングリコール類、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ポリビニルピロリドン、合成ポリアミノ酸などが挙げられる。上記の親水性高分子は、それぞれ単独でまたは2種以上を組み合わせで使用することができる。

これらの中でも、製剤の血中滞留性の観点から、ポリエチレングリコール類、ポリグリセリン類、ポリプロピレングリコール類が好ましく、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリグリセリン(PG)、ポリプロピレングリコール(PPG)がより好ましく、ポリエチレングリコール(PEG)は最も汎用であり、血中滞留性を向上させる効果があり、好ましい。

【0028】

PEGの分子量は、特に限定されない。PEGの分子量は500~10,000ダルトンであり、好ましくは1,000~7,000ダルトン、より好ましくは2,000~5,000ダルトンである。

【0029】

リポソームでは、リポソームに含まれる主たる脂質とともに、PEGによって修飾された脂質(PEG修飾脂質)を用いることが好ましい。具体例として、例えば、1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-PEG(DSPE-PEG; 日本油脂製; 具体的には、1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-PEG2000、又は1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-PEG5000であることが好ましい。)、ジステアロイルグリセロール-PEG2000(日本油脂製)等が挙げられる。これらのPEG修飾脂質は、全脂質量に対して0.3~50質量%、好ましくは0.5~30質量%、より好ましくは1~20質量%含有するように添加すればよい。

【0030】

リポソームでは、水素添加大豆ホスファチジルコリン(リポソームに含まれる主たる脂質)、1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルエタノールアミン-PEG(主たる脂質と併用する脂質)の脂質の組合せが好ましい。

【0031】

リポソームでは、アニオンポリマー(ポリアニオン)を含まないことが好ましい。本発明では、内水相の浸透圧でリリース性をコントロールできるため、汎用性に優れ、リポソームに使用できる薬物が限定されることがないという利点を有する。

【0032】

(リポソームの製造方法)

本発明のリポソームの製造方法は、少なくとも1種の脂質が有機溶媒に溶解している油相と水相とを含む混合液を攪拌する攪拌工程、及び上記混合液から有機溶媒を蒸発させる蒸発工程を含み、上記蒸発工程において、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した有機溶媒を除去する方法である。

【0033】

乾燥固化工程を経ずに、有機溶媒に溶解した混合脂質を乳化することでリポソームを形成する乳化工程では、乳化する工程であれば限定されることはないが、好ましくは高せん断をかけ、有機溶媒を含む乳化工程で微粒子化する工程である。必要に応じて、乳化工程で用いた有機溶媒を蒸発させる(脱溶媒する)ことでリポソームを形成することができる。

【0034】

(油相)

油相として用いられる有機溶媒として、水溶性有機溶媒及びエステル系有機溶媒の混合溶媒を用いる。本発明では、有機溶媒として、クロロホルム、塩化メチレン、ヘキサン、又はシクロヘキサンといった有機溶媒を実質的に用いないことが好ましく、これらの有機

10

20

30

40

50

溶媒をまったく用いないことがより好ましい。

【0035】

水溶性有機溶媒は、特に限定されないが、水と任意に混じりあう性質をもつ有機溶媒であることが好ましい。水溶性有機溶媒は、具体的には、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、t-ブタノールなどのアルコール類、グリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール類などが挙げられる。これらのなかでも、アルコール類が好ましい。アルコールは、エタノール、メタノール、2-プロパノール、及びt-ブタノールから選ばれる少なくとも1種であることが好ましく、エタノール、2-プロパノール、t-ブタノールから選ばれる少なくとも1種であることがより好ましく、エタノールであることがさらに好ましい。

10

【0036】

エステル系有機溶媒は、特に限定されないが、有機酸およびアルコールの反応から得られるエステルであることが好ましい。エステル系有機溶媒は、具体的には、酢酸エチル、酢酸メチル、酢酸イソプロピル、酢酸t-ブチル、及びプロピオン酸メチルから選ばれる少なくとも1種であることが好ましく、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、プロピオン酸メチルがより好ましく、酢酸エチルがさらに好ましい。

【0037】

水溶性有機溶媒及びエステル系有機溶媒の混合比率は、特に限定されないが質量比で90:10~20:80程度、好ましくは70:30~25:75程度であればよい。水溶性有機溶媒及びエステル系有機溶媒の混合溶媒は、さらに水又は緩衝液など下記に述べる水性溶媒を含んでいてもよい。水性溶媒は、例えば1~30質量%の範囲で加えられていてもよい。混合溶媒のpHは、特に限定されないが、4~10程度の範囲が好ましく、6~9程度であることがより好ましい。エステル系有機溶媒にはこれら溶媒に可溶な各種薬物などの生理活性物質などを含んでいてもよい。

20

【0038】

脂質の濃度は、特に限定されず、適宜調整することが可能であるが、水溶性有機溶媒とエステル系有機溶媒の混合液を溶媒とする溶液として、40g/L~250g/L、好ましくは100g/L~200g/Lであればよい。

【0039】

30

(水相)

リポソームを製造する際に、膜成分を分散させる水相(水溶液)としては、水(蒸留水、注射用水等)、生理食塩水、各種緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合物(水性溶媒)が好ましく用いられる。緩衝液としては、有機系、無機系に限定されることはないが、体液に近い水素イオン濃度付近に緩衝作用を有する緩衝液が好適に用いられ、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、グッドバッファーなどがあげられる。水相のpHは特に限定されないが、5.0~9.0、好ましくは7.0~8.0であればよい。例えば、リン酸緩衝液(例えば、 $pH=7.4$)を用いることが好ましい。最終的にリポソームの内水相に含まれる水溶液は、リポソームを製造する際に、膜成分を分散させる水溶液であってもよいし、新たに添加される、水、生理食塩水、各種緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合物であってもよい。水相(水溶液)として用いる水は、不純物(埃、化学物質等)を含まないことが好ましい。

40

【0040】

(乳化工程)

乳化工程では、少なくとも1種の脂質が有機溶媒に溶解している油相と水相とを混合して脂質を含む水溶液を攪拌して乳化する。脂質が有機溶媒に溶解している油相及び水相を混合し攪拌し、乳化することで、油相及び水相がO/W型に乳化した乳化液が調製される。混合後、油相由来の有機溶媒の一部または全部を後述する蒸発工程によって除去することにより、リポソームが形成される。又は、油相中の有機溶媒の一部又は全部が攪拌・乳化の過程で蒸発して、リポソームが形成される。

50

【 0 0 4 1 】

攪拌する方法としては、粒子微細化のために、超音波、機械的せん断力が用いられる。また、粒子径の均一化のためには、一定の孔径のフィルターを通すエクストルーダー処理又はマイクロフレイザイザ処理を行うことができる。エクストルーダー等を用いれば、副次的に形成された多胞リボソームをばらして単胞リボソームにすることができる。本発明では、薬物をローディングしない状態のリボソームを、エクストリュージョン処理せずに次の工程に用いることが、製造工程の簡略化の観点から好ましい。

【 0 0 4 2 】

乳化は、タンク内で攪拌することによって行うことができる。タンクの容量は特に限定されないが、大きな製造スケールが好ましいという観点から、好ましくは10L以上100L以下であり、より好ましくは20L以上100L以下である。

10

【 0 0 4 3 】

乳化の際には、ポンプを用いて、混合物を循環させることができる。ポンプとしては、ターボ型ポンプ（遠心ポンプ、斜流ポンプ、軸流ポンプ）、容積形往復ポンプ（ピストンポンプ、プランジャーポンプ、ダイヤフラムポンプ）、容積形回転ポンプ（ギヤポンプ、ペーンポンプ、ねじポンプ）、チューブポンプなどを用いることができる。上記の中でも好ましくは、摺動面を持たない、チューブポンプ又はダイヤフラムポンプを使用することができる。特に好ましくは、大流量の確保が容易なダイヤフラムポンプである。

【 0 0 4 4 】

乳化は、乳化装置を用いて、混合物をタンク内で攪拌することが好ましい。乳化装置としては、インペラー式、のこぎり歯ブレード式、閉式ローター式、ローター/ステーター式、スタティックミキサー式、コロイドミル式、高圧ホモジナイザー式などを用いることができる。その中で好ましくは、タンク内でのパッチ処理に適したインペラー式、のこぎり歯ブレード式、閉式ローター式、ローター/ステーター式である。

20

特に好ましくは、微細化のために高速回転によって処理液内にジェット流を生じさせ、液と液または液と壁面のせん断力を十分発揮させることができる、ローター/ステーター式である。一例としては、断続ジェット流発生型乳化装置を用いることができる。

【 0 0 4 5 】

本発明では、攪拌の速度および時間を任意に選択することで、調製するリボソームの平均粒子サイズを制御することができる。安全性及び安定性を有するリボソームを得る観点において、脂質を含む水溶液に周速15m/sec以上のせん断を与えることが好ましい。せん断としては、限定されないが、具体的には、周速15m/sec以上35m/sec以下のせん断を与えることが好ましく、周速20m/sec以上35m/sec以下のせん断を与えることがより好ましく、周速23m/sec以上30m/sec以下のせん断を与えることがさらに好ましい。

30

【 0 0 4 6 】

（蒸発工程）

本発明の方法は、攪拌工程の混合液から有機溶媒を蒸発させる蒸発工程を含む。蒸発工程では、乳化工程で得られたリボソームを含む水溶液から有機溶媒を蒸発させる。蒸発工程とは、油相由来の有機溶媒の一部または全部を蒸発工程として強制的に除去する工程、及び油相中の有機溶媒の一部または全部が攪拌・乳化の過程で自然に蒸発する工程の少なくとも一つを含む。

40

【 0 0 4 7 】

蒸発工程における有機溶媒を蒸発させる方法は、溶媒の露点以下の気体を通気することによって凝結した有機溶媒を除去する方法である限り、特に限定されない。「溶媒の露点」における溶媒とは、有機溶媒と水とを含む、混合液中の全溶媒を意味する。

【 0 0 4 8 】

好ましくは、攪拌工程及び蒸発工程をタンク中で行い、蒸発工程の開始時におけるタンク中の混合液の液水平面の幅の最も広い部分の長さAと、液の深さの最も深い部分の長さBとの比率であるA/Bは2以上であり、より好ましくは3以上であり、さらに好ましくは3.5以上であり、特に好ましくは4以上である。

50

【 0 0 4 9 】

好ましくは、攪拌工程及び蒸発工程をタンク中で行い、蒸発工程の開始時におけるタンク中の気体空間の水平面の幅の最も広い部分の長さCと、気体空間の高さの最も長い部分の長さDとの比率であるC/Dが、脱溶媒開始時において2以上であり、より好ましくは3以上であり、さらに好ましくは3.5以上であり、特に好ましくは4以上である。

ここで気体空間とは、液面上を水平方向に流れている気体が占める空間を意味する。即ち、タンク容器の上部の蓋の形状に起因して局所的に空間の高さが、高くなったり、低くなる場合があるが、「液面上を水平方向に流れている気体が占める空間」とは、このような局所的な高さの変動は考慮することなく、気流状態の気体が占める空間を意味するものである。

10

【 0 0 5 0 】

上記の通り、A/Bを2以上とすること、及び/又はC/Dを2以上とすることにより、十分な伝熱面積及び気液界面面積を確保することができ、より迅速な脱溶媒を達成することが可能になる。

【 0 0 5 1 】

好ましくは、蒸発工程は、遠心式攪拌機を用いて攪拌しながら行うことができる。迅速な脱溶媒を図るためには伝熱係数を向上させることが有効であり、そのための手段としては攪拌を強化することが考えられる。しかし、攪拌を強化すると空気の巻き込みにより泡が発生してしまう。特に、A/Bが2以上であり、及び/又はC/Dが2以上であるタンクを使用する場合、水深が浅くなり空気の巻き込みが激しくなる。ここで、遠心式攪拌機を使用することにより、発泡を抑制しつつ攪拌を強化することが可能となることが見出された。即ち、遠心式攪拌機を使用することは、迅速な脱溶媒という観点から好ましい。

20

【 0 0 5 2 】

遠心式攪拌機の構造は、回転軸に近い吸入口と遠い吐出口が繋がって流路を形成する回転体である。攪拌の原理は、(1)攪拌体を回転する、(2)流路内に遠心力が作用する、(3)横方向に流体が吐出する、(4)縦流路が負圧になる、(5)下方に負圧吸引流が発生するである。

【 0 0 5 3 】

遠心式攪拌機としては、株式会社メデック製のM-Rev o(登録商標)等を使用することができる。M-Rev oの模式図を図1(メーカーホームページより引用)に示す。M-Rev oを回転させると吐出口(a)に遠心力が発生、(a)から横方向に流体を吐出する。それに伴い、吸入口(b)に吸引力が生じ、竜巻状のうず流(c)が発生する。縦流路が負圧となって下方に負圧吸引流が生じ、「プッシュ→プル」流が発生する。M-Rev oから攪拌流に脈動(パルス)が伝わり、攪拌流が全体に行き渡る。

30

【 0 0 5 4 】

遠心式攪拌機のローターの寸法としては直径70~200mmが好ましく、80~150mmがより好ましく、円周部に複数(例えば、2~10個)の吐出口を有するものが好ましい。ローターの攪拌能力の指標となる、吐出量係数(吐出口の開口面積合計×円周長)は好ましくは60cm³~6000cm³であり、より好ましくは200cm³~2000cm³である。

40

遠心式攪拌機の回転数は、好ましくは100~1500rpm(回転/分)であり、好ましくは200~1000rpmである、より好ましくは300~800rpmである。

偏心量はタンク半径を1とした場合、回転軸がタンク中心から0(=タンク中心)~0.8の位置に位置することが好ましい。但し、ローターとタンク内壁が接触しないことが必要である。

【 0 0 5 5 】

好ましくは、蒸発工程において、容器上部の中央部から気体を容器内に吸入し、容器上部の周辺部から気体及び凝結した有機溶媒を排出させることができる。上記の通り、中心から外周の方向に送風を行うことは、迅速な脱溶媒の観点から好ましい。

【 0 0 5 6 】

50

本発明では、有機溶媒を蒸発させる工程において、リボソームを含む水溶液に含まれる有機溶媒の濃度を、有機溶媒を蒸発させる工程の開始後から30分以内に、15質量%以下にすることが好ましい。

【0057】

本発明の製造方法を実施する際の液温は、適宜調整することが可能であるが、油相と水相との混合時の液温を使用する脂質の相転移温度以上とすることが好ましく、例えば、相転移温度が35～40の脂質を使用する場合、35以上70以下とすることが好ましい。

【0058】

本発明により得られたリボソームを含む水溶液は、リボソームに含まれなかった成分の除去、又は濃度や浸透圧の調整のために、遠心分離、限外ろ過、透析、ゲルろ過、凍結乾燥等の方法で後処理をしてもよい。

10

【0059】

得られたリボソームは、透析法、濾過法、エクストリュージョン処理等を用いて粒径を均一にすることができる。本発明のリボソーム製造方法では、薬物をローディングしない状態の空のリボソームを、エクストリュージョン処理をせずに調製することが好ましい。また、リボソーム内に内包された薬物と内包されない薬物とを分離するには、遠心分離法、透析法、ゲル濾過法等が利用できる。

【0060】

(リボソーム製造装置)

20

本発明のリボソーム製造装置は、タンクと攪拌機とジャケットとを含むリボソーム製造装置であって、上記タンク内の空間の断面は円形状を有し、上記断面の円の大きさはタンクの高さに応じて変化していてもよく、タンク上部の蓋部の中心部からタンク内に攪拌機が挿入され、タンクの周囲にはタンク内の温度を制御するためのジャケットが設けられ、タンク上部の蓋部の中央部には、タンク内に気体を吸入するための吸入口が1個以上設けられ、タンク上部の蓋部の周辺部には、タンク内から気体及び凝結有機溶媒を排出するための排出口が1個以上設けられているリボソーム製造装置である。なお攪拌機の挿入位置は、本明細書の段落番号0054に記載した偏心量の範囲内で、タンク中心から偏心してもよい。

【0061】

30

本発明のリボソーム製造装置の構成の一例の上面図を図2に示し、断面図を図3に示す。

タンク1を上面から見た場合の形状は、略円形状であり、即ち、タンク内の空間の断面は略円形状を有している。ここで、タンク内の空間の断面が表す円の大きさはタンクの高さに応じて変化していてもよい。図3に示す例においては、タンクの上半部における断面の円の大きさはほぼ一定であるのに対し、タンクの下半部における断面の円の大きさは、タンクの高さに応じて変化しており、タンクの高さが低い領域については、断面の円の大きさは小さくなっている。

【0062】

40

タンク上部の蓋部の中心部11からタンク内には、攪拌機15が挿入されている。攪拌機15は攪拌手段14によって作動する。

タンク1の周囲にはタンク内の温度を制御するためのジャケット22が設けられている。

タンク1の上部の蓋部の中央部(上記の中心部11の周辺の隣接した領域)には、タンク内に気体を吸入するための吸入口12が4個設けられている。また、タンク1上部の蓋部の周辺部(蓋部の外周に隣接した領域)には、タンク内から気体及び凝結有機溶媒を排出するための排出口13が4個設けられている。

図3における符号21は、液体を投入した際の液面(気液界面)を示す。

【0063】

(薬物ローディング工程)

50

本発明の方法で得られたリボソームには薬物を内包させることができる。薬物を内包させる薬物ローディング工程では、リボソームに水溶性薬物を封入させる場合、水和・膨潤させる水性媒体に薬物を溶解し、相転移温度以上の加熱、超音波処理又はエクストルージョン等の方法により薬物をリボソームの内水相に内包させることができる。また、脂質乳化時の水相に薬物を溶解させ内水相に内包させることもできる。

【0064】

リボソームに含まれる薬物は、リボソームに内包することのできる水溶性の薬物であればよく、具体的には、酵素、タンパク質、ペプチド、核酸（DNA、mRNA、siRNA、miRNA）、低分子化合物、糖類（オリゴ糖および多糖）、高分子化合物、抗腫瘍剤、抗菌剤、造影剤、抗酸化剤、抗炎症剤、美白剤、保湿剤、育毛剤等の生理活性又は薬理学的活性を有する水溶性の物質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。リボソームを薬物送達システムのキャリアーとして用いる場合、安定性の観点から、水溶性薬物は低分子化合物であることが好ましい。

10

【0065】

水溶性薬物としては、具体的には、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エビルビシンなどのアントラサイクリン系、シスプラチン、オキサリプラチンなどのシスプラチン系、パクリタキセル、ドセタキセルなどのタキサン系、ビンクリスチン、ビンブラスチンなどのピンカアルカロイド系、プレオマイシンなどのプレオマイシン系、シロリムスなどのシロリムス系の抗がん剤、メトトレキセート、フルオロウラシル、ゲムシタピン、シタラピン、ペメトレキセドなどの代謝拮抗剤等が挙げられる。これらのなかでも、ドキソルビシン、ゲムシタピン、ペメトレキセド等の水溶性薬物が好ましい。

20

【0066】

リボソームに内包した水溶性薬物は、リボソームの内水相に溶解状態で存在している。ここで、溶解状態とは、リボソームの体積に対して充填した薬物の量が、その内水相の組成液での薬物の飽和溶解度以下の場合、溶解状態で内包されたものとみなす。また、飽和溶解度以上においても、Cryo-TEM（クライオ透過型電子顕微鏡）で薬物結晶が観察されない、XRD（X線回折）測定で結晶格子に起因する回折パターンが観察されない場合は、脂質膜が作る物理化学的な環境による溶解促進や、一部薬物が脂質膜に取り込まれるなどして大部分が溶解していることを示し、溶解状態で内包されたものとみなす。また、リボソーム内部で固体物を形成させて、薬物を封入させるローディング方法により内包したものは、水溶性の高い薬物であっても、溶解状態ではない。

30

【0067】

溶解状態で内包させる水溶性薬物としては、水に対して1mg/ml以上の溶解度を持つものが好ましく、10mg/ml以上の溶解度を持つものがより好ましい。

【0068】

（無菌ろ過）

本発明のリボソームの製造方法によって得られるリボソームを含む水溶液を医薬組成物とするために、無菌ろ過を行うことが好ましい。ろ過の方法としては、中空糸膜、逆浸透膜、メンブレンフィルター等を用いて、リボソームを含む水溶液から不要な物を除去することができる。本発明では、特に限定されないが、滅菌できる孔径をもつフィルター（好ましくは0.2 μmのろ過滅菌フィルター）によってろ過することが好ましい。通常、ろ過工程において、ろ過滅菌フィルターへのリボソームが吸着又は凝集が発生することがある。しかし、本発明では、特定の平均粒子サイズ及び均一な粒子サイズ分布を有するリボソームが得られるため、ろ過を行う時に圧損などの影響が少ないという予想外の効果を有する。

40

【0069】

リボソームの変形による平均粒子サイズへの影響を防ぐために、無菌ろ過工程及び後述する無菌充填工程は、リボソームを構成する脂質の相転移温度以下で行うことが好ましい。例えば、脂質の相転移温度が50℃付近である場合、0～40℃程度が好ましく、より具体的には5～30℃程度で製造されることが好ましい。

50

【0070】

(無菌充填)

無菌ろ過の後に得られたリボソームを含む水溶液は、医療用途として無菌充填することが好ましい。無菌充填の方法は公知のものが適用できる。容器に無菌的に充填することで医療用として好適なリボソーム組成物が調製できる。

【0071】

本発明によって得られるリボソームを含む水溶液に、適宜、水性溶媒、添加剤等を加えてリボソームを含有する医薬組成物とすることができる。医薬組成物は、投与経路に関連して、医薬的に許容される等張化剤、安定化剤、酸化防止剤、及びpH調整剤の少なくとも一種を含んでもよい。

10

【0072】

等張化剤としては、特に限定されないが、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムのような無機塩類、グリセロール、マンニトール、ソルビトールのようなポリオール類、グルコース、フルクトース、ラクトース、またはスクロースのような糖類が挙げられる。

【0073】

安定化剤としては、特に限定されないが、例えば、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、またはスクロースのような糖類が挙げられる。

【0074】

酸化防止剤としては、特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、尿酸、トコフェロール同族体（例えば、ビタミンE、トコフェロール α 、 β 、 γ 、 δ の4つの異性体）システイン、EDTA等が挙げられる。安定化剤および酸化防止剤は、それぞれ単独でまたは2種以上組み合わせて使用することができる。

20

【0075】

pH調整剤としては、水酸化ナトリウム、クエン酸、酢酸、トリエタノールアミン、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムなどが挙げられる。

【0076】

医薬組成物は、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、PBS、塩化ナトリウム、糖類、生体内分解性ポリマー、無血清培地、医薬添加物として許容される添加物を含有してもよい。

30

【0077】

特に、医薬組成物に、硫酸アンモニウム、L-ヒスチジン、精製白糖、水酸化ナトリウム、塩酸などを含有することが好ましい。

40

【0078】

医薬組成物を充填する容器は、特に限定されないが、酸素透過性が低い材質であることが好ましい。例えば、プラスチック容器、ガラス容器、アルミニウム箔、アルミ蒸着フィルム、酸化アルミ蒸着フィルム、酸化珪素蒸着フィルム、ポリビニルアルコール、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリ塩化ビニリデン、等をガスバリア層として有するラミネートフィルムによるバック等が挙げられ、必要に応じて、着色ガラス、アルミニウム箔やアルミ蒸着フィルム等を使用したバック等を採用することで遮光することもできる。

【0079】

医薬組成物を充填する容器において、容器内の空間部に存在する酸素による酸化を防ぐ

50

ために、容器空間部および薬液中のガスを窒素などの不活性ガスで置換することが好ましい。例えば、注射液を窒素パブリングし、容器への充填を窒素雰囲気で行うことが挙げられる。

【0080】

医薬組成物の投与方法は、非経口的投与が好ましい。例えば、点滴などの静脈内注射（静注）、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、眼内注射、髄腔内注射を選択することができる。リボソーム組成物の具体的な投与方法としては、シリンジ、点滴による投与が挙げられる。

【0081】

医薬組成物に含まれる薬物の投与量は、通常、一日につき体重1kgあたり0.01mgから100mgの範囲で選ばれる。しかし、本発明のリボソーム組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

【実施例】

【0082】

以下、本発明を実施例にて詳細に説明する。しかし、本発明は実施例に何ら限定されるものではない。

【0083】

（実施例1）

a) 設備の準備

図2及び図3に構造を示すタンクを準備した。

遠心式攪拌機として株式会社メデック製のM-Revolution（登録商標）をタンクに装着して使用した。

タンクの形状は、水25.5kg及びエタノール7.8kg（合計で約32L）を投入した場合に、A/Bが4であり、C/Dが4となる形状である。

【0084】

b) 試験液の準備

試験液としては、水25.5kg及びエタノール7.8kgを使用した。

【0085】

c) 脱溶媒

水25.5kg及びエタノール7.8kgをタンクに投入した。タンクのジャケットに80℃の温水を循環させ、加温した。内温が70℃に到達したところで蒸発処理を開始した。遠心式攪拌機での攪拌を開始すると同時に、温度20℃のエアーを風量4.0Nm³/分で送風を開始した。

【0086】

なお、遠心式攪拌機のローターの形状は、直径10cmであり、円周部に直径1cmの吐出口を6個有している。遠心式攪拌機の回転数は600rpmとした。偏心量は、回転軸がタンク中心から65mm外側に位置させた。なおこのローターの攪拌能力の指標となる、吐出量係数（吐出口の開口面積合計×円周長）は、591cm³という値になる。

エアーは、タンク上部の吸入口から吸入し、タンク上部の排出口から排出させることにより、中心から外周の方向に送風を行った。

【0087】

10分後に蒸発処理を完了し、タンクから液体を回収した。回収した液体の質量を実測し、またエタノールの残存濃度をガスクロマトグラフィーにより測定することで、蒸発処理中の水及びエタノールの蒸発量を算出した。上記算出の結果を表1に示す。露点（計算値）は33℃である。

【0088】

（比較例1）

加温装置により風温を50℃とすること以外は、実施例1と同様に蒸発処理を行った。なお、加温装置としては、一次側に温水、二次側にキャリア（空気又は窒素）が通過する熱交換機を使用した。

10

20

30

40

50

水の蒸発量及びエタノールの蒸発量を算出した結果を表 1 に示す。露点（計算値）は 31 である。

【0089】

（比較例 2）

エアーの風量は $12 \text{ Nm}^3/\text{分}$ とすること以外は、実施例 1 と同様に蒸発処理を行った。

水の蒸発量及びエタノールの蒸発量を算出した結果を表 1 に示す。露点（計算値）は 14 である。

【0090】

（実施例 2）

10

タンクの形状を、水 25.5 kg 及びエタノール 7.8 kg （合計で約 33.3 L ）を投入した場合に、 A/B が 1 であり、 C/D が 4 となる形状であること以外は、実施例 1 と同様に蒸発処理を行った。

水の蒸発量及びエタノールの蒸発量を算出した結果を表 1 に示す。露点（計算値）は 26 である。

【0091】

（実施例 3）

タンクの形状を、水 25.5 kg 及びエタノール 7.8 kg （合計で約 33.3 L ）を投入した場合に、 A/B が 4 であり、 C/D が 2 となる形状であること以外は、実施例 1 と同様に蒸発処理を行った。

20

水の蒸発量及びエタノールの蒸発量を算出した結果を表 1 に示す。露点（計算値）は 27 である。

【0092】

（実施例 4）

送風の方向を、一方向としたこと以外は、実施例 1 と同様に蒸発処理を行った。

水の蒸発量及びエタノールの蒸発量を算出した結果を表 1 に示す。露点（計算値）は 27 である。

【0093】

（実施例 5）

遠心式攪拌機の代わりにパドル式攪拌機（羽の直径は 100 mm ）を使用し、回転数を 350 rpm としたこと以外は、実施例 1 と同様に蒸発処理を行った。

30

水の蒸発量及びエタノールの蒸発量を算出した結果を表 1 に示す。露点（計算値）は 30 である。

【0094】

上記の実施例及び比較例において、脱溶媒速度は以下の基準で判定した。評価 A から C は許容できる水準である。

A：エタノールの蒸発量が 100 g/分 以上

B：エタノールの蒸発量が 70 g/分 以上 100 g/分 未満

C：エタノールの蒸発量が 50 g/分 以上 70 g/分 未満

【0095】

40

各例の露点は以下の方法により算出した。

1) 蒸発量（水）、蒸発量（エタノール）、風量のそれぞれ実測値より、気体の状態方程式を用いて、水、エタノールの蒸気分圧を計算し、その合計を蒸気的全圧とした。

2) 気液平衡におけるアントワン式およびウィルソン式を用いて、1) で計算した蒸気全圧と、液組成の仕込みモル分率より、その状態における露点を算出した。

気液平衡の計算方法の詳細は、次の文献に従った。

「分離のための相平衡の理論と計算」75～76 ページ 大江修造著（講談社，2012 年）

「気液平衡データ集」35 ページ 大江修造著（講談社，1988 年）

【0096】

50

【表 1】

	実施例 1	比較例 1	比較例 2	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5
加温装置	なし	あり	なし	なし	なし	なし	なし
タンク形状 液部 A/B	4	4	4	1	4	4	4
タンク形状 気流部 C/D	4	4	4	4	2	4	4
送風	中心から外周	中心から外周	中心から外周	中心から外周	中心から外周	一方向	中心から外周
攪拌機	遠心式	遠心式	遠心式	遠心式	遠心式	遠心式	パドル式
風量 Nm ³ /分	4.0	4.0	12	4.0	4.0	4.0	4.0
風温度 °C	20	50	20	20	20	20	20
蒸発量(水) g/分	182	187	185	127	135	130	85
蒸発量(エタ ノール)g/分	106	110	107	75	78	76	51
露点°C	33	31	14	26	27	27	30
脱溶媒速度	A	A	A	B	B	B	C
設備投資負荷	許容可	許容不可	許容不可	許容可	許容可	許容可	許容可

10

20

【0097】

表 1 から分かるように、本発明の実施例 1 から 5 では、設備投資負荷のない条件下において許容できる脱溶媒速度を達成することができた。

【0098】

(実施例 6)

a) 乳化設備の準備

スリット外径 90 mm の回転部を有する、断続ジェット流発生型乳化装置 33 (エムテック社製クレアミックス (登録商標))、満水容量 26 L の乳化タンク 31、並びに脱泡タンク 34 と循環ポンプ 35 (直動ダイヤフラムポンプ E J L 1500 S 12 型、日機装 / L E W A 社製) とを含む循環経路 32 (循環経路の容量は 6 L) を図 4 に示すように組み合わせ、乳化設備を準備した。なお、循環経路の容量とは、脱泡タンクを含む循環経路全体の容量である。

30

【0099】

b) 油相の調製

水素添加大豆ホスファチジルコリン、コレステロールおよび N - (カルボニル - メトキシボリエチレングリコール 2000) - 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミンナトリウム塩 (以下、DSPE-PEG) を 57 / 38 / 5 のモル比となるように混合し、次いで有機溶媒 (エタノール) を加えて 70 °C に加温して脂質を溶解し油相とした。この際、油相中の脂質の濃度が 70 mmol / L となるように調製した。

40

【0100】

c) 水相の調製

177 mmol / L の硫酸アンモニウム水溶液を調製し、水相として乳化タンクに調製した。

【0101】

d) 乳化

c) で調製した水相を 70 °C に加温し、乳化装置を周速 15 m / 秒で運転し、循環ポンプを流速 20 L / 分で運転しながら、水相 / 油相 = 8 / 3 の容積比になるように b) で調

50

製した油相を添加した。添加後の総液量は32Lとなり、乳化タンク満水化した後、オーバーフローした6Lが、脱泡タンクを含む循環経路を循環した。また、乳化タンクの内圧は30kPaとした。この状態で、乳化装置の回転を周速30m/秒に上げ、30分間攪拌した。

【0102】

e) 脱溶媒

d) で作製した乳化液を、速やかに脱溶媒用タンク（実施例1で使用したものと同一）に移した。タンクのジャケットに80℃の温水を循環させ、加温するとともに蒸発処理を開始した。遠心式攪拌機（実施例1と同様の条件）での攪拌を開始すると同時に、温度20℃のエアーを風量4.0Nm³/分で送風を開始した。10分後に、ジャケットの温水の温度を60℃に、エアーの風量を3.0Nm³/分に変更した。開始から60分後に、遠心式攪拌機の回転数を450rpm、エアーの風量を1.4Nm³/分に変更した。さらに開始から4時間後に、遠心式攪拌機の回転数を300rpmに変更した。開始から6時間後に蒸発処理を完了し、タンクからリボソーム液を回収した。露点（計算値）は脱溶媒開始時において33℃である。

【0103】

（実施例7）

遠心式攪拌機の代わりに、パドル式攪拌機（羽の直径100mm）を使用し、回転数を脱溶媒開始時に350rpm、開始から60分後に150rpmにしたこと以外は、実施例6と同様にして、リボソーム液を調製し、回収した。露点（計算値）は脱溶媒開始時において33℃である。

【0104】

（動的光散乱法によるリボソームの平均粒子径の測定）

実施例6及び7で製造したリボソーム液を純水で40倍に希釈して、平均粒子径測定用試料とした。平均粒子径測定用試料の平均粒子径は、大塚電子株式会社製の粒径アナライザーFPAR-1000ASを用いて、体積平均粒子径として測定した。

【0105】

測定の結果を表2に示す。表2に示す通り、遠心式攪拌機又はパドル式攪拌機の何れを用いてもリボソームを製造することができるが、遠心式攪拌機を使用する実施例6の方がより小さい平均粒子径のリボソームを製造することができ、好ましいことが分かる。なお、実施例7では泡立ち易い脂質（DSPE-PEG）を使用しているために、パドル式攪拌機を使用する場合には泡が多くなり脱溶媒が遅れる傾向にある。

【0106】

【表2】

	実施例6	実施例7
加温装置	なし	なし
タンク形状 液部A/B	4	4
タンク形状 気流部C/D	4	4
送風	中心から外周	中心から外周
攪拌機	遠心式	パドル式
風量 Nm ³ /分	4.0～2.0	4.0～2.0
風温度℃	20	20
露点℃（脱溶媒開始時）	33	33
平均粒子径 nm	59	81

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

(実施例 8)

薬剤内包リボソームの調製

実施例 6 で調製した薬剤未封入リボソームをタンジェンシャルフローフィルトレーションによりリボソーム液の脂質濃度を $120 \sim 150 \text{ mmol/L}$ の範囲で濃縮しながら、リボソームの外水相を 0.09 質量%塩化ナトリウム水溶液に置換した。ここにゲムシタピン塩酸塩をリン酸緩衝液で加温溶解した薬剤溶液を添加し、約 70°C で 30 分加温した後、室温まで冷却した。その後、薬剤リボソーム混液を孔径 $0.2 \mu\text{m}$ の除菌用フィルターでろ過し、更にタンジェンシャルフローフィルトレーションにより薬剤リボソーム混液を 9.4 質量%スクロース / 10 mmol/L ヒスチジン水溶液で透析精製することで未封入のゲムシタピンを除去し、次にリボソームを孔径 $0.2 \mu\text{m}$ の滅菌フィルターでろ過することで無菌の平均粒子径 69 nm のゲムシタピン内封リボソーム液を得た。本発明により、医薬用途に使用可能な平均粒子径が 100 nm 以下と小さく、かつ単一の分散ピークを有するリボソームが製造できることを確認した。

10

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 0 8 】

本発明によれば、リボソームを大きな製造スケールにおいて製造することができる。本発明により製造されるリボソームは、医薬品、化粧品、食品など適用可能であり、特に医薬用途に有用である。

20

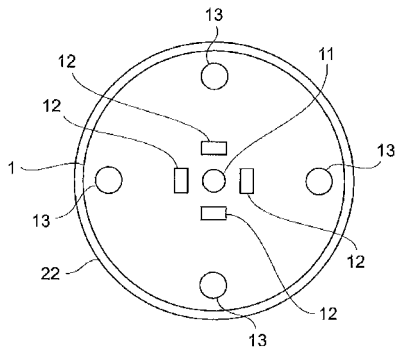
【 符号の説明 】

【 0 1 0 9 】

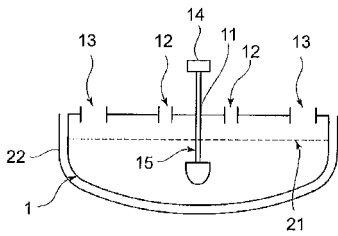
- 1 タンク
- 1 1 中心部
- 1 2 吸入口
- 1 3 排出口
- 1 4 攪拌手段
- 1 5 攪拌機
- 2 1 液面
- 2 2 ジャケット
- 3 1 乳化タンク
- 3 2 循環経路
- 3 3 乳化装置
- 3 4 脱泡タンク
- 3 5 ポンプ

30

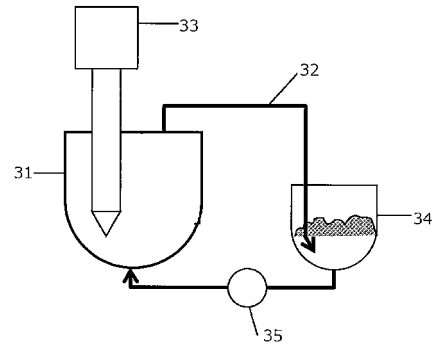
【 図 2 】



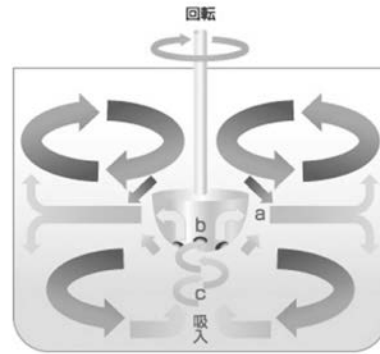
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 1 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
B 0 1 F	7/16	(2006.01)	B 0 1 D	1/00	Z	4 G 0 7 8	
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	B 0 1 F	7/16	F		
A 2 3 L	33/10	(2016.01)	A 6 1 K	9/127			
			A 2 3 L	1/30	Z		

- (72)発明者 大久保 陽平
 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士フイルムエンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 佐々木 高志
 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士フイルムエンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 石黒 哲
 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士フイルムエンジニアリング株式会社内

F ターム(参考) 4B018 MD14 ME14 MF02 MF14
 4C076 AA19 DD24 DD63 DD70 EE23 FF16 GG50
 4D076 AA01 AA14 AA24 BA50 CA02 CB01 CB03 CD12 DA10 EA08Y
 EA08Z EA12Y EA12Z FA03 FA11 HA11 HA15 JA03
 4G005 AA07 AB14 BA12 BB08 BB17 CA07 DB22X DC17Z DC56Z DD05Z
 DD07Z DD24Z DD58Z DD73Z EA01 EA03
 4G037 AA01 AA11 CA03 EA04
 4G078 AA02 AB20 BA05 CA01 DA30 DC06 EA03