

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-505761**(P2004-505761A)**(43) 公表日 **平成16年2月26日(2004.2.26)**(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

B 0 1 J 13/04

B 0 1 J 13/02

A

4 C 0 7 6

A 6 1 J 3/07

A 6 1 J 3/07

P

4 G 0 0 5

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 9/14

4 G 0 7 5

B 0 1 J 19/00

B 0 1 J 19/00

N

B 8 2 B 3/00

B 8 2 B 3/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 78 頁)

(21) 出願番号 特願2002-518933 (P2002-518933)

(86) (22) 出願日 平成13年8月15日 (2001.8.15)

(85) 翻訳文提出日 平成15年2月17日 (2003.2.17)

(86) 国際出願番号 PCT/US2001/025674

(87) 国際公開番号 W02002/013786

(87) 国際公開日 平成14年2月21日 (2002.2.21)

(31) 優先権主張番号 60/225, 525

(32) 優先日 平成12年8月15日 (2000.8.15)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/225, 620

(32) 優先日 平成12年8月15日 (2000.8.15)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500106802

ボード・オブ・トラスティーズ・オブ・ザ
・ユニバーシティ・オブ・イリノイ
アメリカ合衆国イリノイ州61801, ア
ーバナ, サウス・ライト・ストリート 5
06, ヘンリー・アドミニストレーション
・ビルディング 352

(74) 代理人 100109726

弁理士 園田 吉隆

(74) 代理人 100101199

弁理士 小林 義敦

(72) 発明者 キム, キェキョーン

アメリカ合衆国 イリノイ 61822,
シャンペーン, ブライトン コート 17
12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小粒子

(57) 【要約】

粒子形成方法は、液体を含有する流れを加速し；該流れを振動させて、粒子を形成することを含む。該粒子は、流れを形成するために使用されるノズルの径よりも小なる径を有し、ミクロンサイズ及びナノサイズの粒子の形成が可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一の液体を含む第一の流れを加速し；該第一の流れを振動させて、粒子を形成することを含む、粒子の形成方法。

【請求項 2】

粒子を固化させることを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

粒子がコア部とシェル部を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

粒子が複数のシェル部を有する、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

粒子が医薬組成物を含有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

コア部が医薬組成物を含有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

加速が、第一の流れを第二の流れに接触させることを含み、第二の流れが第二の液体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

第二の流れが第一の流れを囲繞する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

加速が第一の流れに電荷を印加することを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 10】

第二の流れが第一の流れを囲繞する第二の液体を含み、加速が第二の流れを加速することを更に含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

粒子がコア部とシェル部を有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

粒子が複数のシェル部を有する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

第一の液体をノズルを通過させることによって第一の流れを形成することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 14】

ノズルが粒子の平均径の $1/2$ よりも大なる径を有している、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

ノズルが少なくとも粒子の平均径を有している、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

粒子が大きくとも $100\text{ }\mu\text{m}$ の平均径である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

粒子が大きくとも $50\text{ }\mu\text{m}$ の平均径である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

粒子が 10 nm から $50\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有している、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 19】

粒子が $1\text{ }\mu\text{m}$ から $50\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有している、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

粒子が 50 から $100\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有し、粒子の 90% が粒子の平均径の 2% 以内である径を有している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

粒子が 1 から $50\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有し、粒子の 90% が粒子の平均径の $1\text{ }\mu\text{m}$ 以内である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

50

加速が、第一の流れを加速するための工程であり、振動が第一の流れを振動させるための工程である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

第一の液体を含む第一の流れを加速し；加速が第一の流れに電荷を印加することを含み、粒子がコア部とシェル部を有する、粒子の形成方法。

【請求項 2 4】

粒子を固化させることを更に含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

粒子が複数のシェル部を有する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

粒子が医薬組成物を含有する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】

第一の液体をノズルを通過させることによって第一の流れを形成することを更に含み、ノズルが粒子の平均径の少なくとも $1/2$ の径を有している、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

粒子が大きくとも $100\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有している、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 9】

粒子が 10 nm から $50\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有している、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 0】

50 から $100\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有する粒子であって、その 90% が粒子の平均径の 2% 以内である径を有している粒子。 20

【請求項 3 1】

粒子の 95% が、粒子の平均径の 1% 以内である径を有している、請求項 3 0 に記載の粒子。

【請求項 3 2】

1 から $50\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有する粒子であって、その 90% が粒子の平均径の $1\text{ }\mu\text{m}$ 以内である径を有している粒子。

【請求項 3 3】

粒子が $1\text{ }\mu\text{m}$ から $30\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有している、請求項 3 2 に記載の粒子。

【請求項 3 4】

粒子が $1\text{ }\mu\text{m}$ から $10\text{ }\mu\text{m}$ の平均径を有している、請求項 3 3 に記載の粒子。 30

【請求項 3 5】

粒子がコア部とシェル部を有している、請求項 3 0 に記載の粒子。

【請求項 3 6】

粒子が複数のシェル部を有している、請求項 3 5 に記載の粒子。

【請求項 3 7】

粒子が医薬組成物を含有する、請求項 3 0 に記載の粒子。

【請求項 3 8】

コア部が医薬組成物を含有する、請求項 3 5 に記載の粒子。

【請求項 3 9】

請求項 2 0 に記載の方法によって調製される、粒子。 40

【請求項 4 0】

請求項 2 1 に記載の方法によって調製される、粒子。

【請求項 4 1】

(i) 第一の液体の第一の流れを形成するための第一のノズルと、
(i i) 第一の流れと接触する第二の液体の第二の流れを形成するように配向された第二のノズルと、
(i i i) 第一の流れから粒子を形成するためのバイブレータとを具備する、粒子の形成装置。

【請求項 4 2】

10

20

30

40

50

第二のノズルが第一のノズルと同軸である、請求項 4 1 に記載の装置。

【請求項 4 3】

バイブレータが圧電変換器を含んでなる、請求項 4 1 に記載の装置。

【請求項 4 4】

第一のノズルが少なくとも $30\ \mu\text{m}$ の径を有している、請求項 4 1 に記載の装置。

【請求項 4 5】

第一のノズルが少なくとも $100\ \mu\text{m}$ の径を有している、請求項 4 1 に記載の装置。

【請求項 4 6】

(i) 第一の液体の第一の流れを形成するための第一のノズルと、

(i i) 第一の流れに電荷を印加するための電荷源と、

(i i i) 第一の流れから粒子を形成するためのバイブレータとを具備する、粒子の形成装置。

【請求項 4 7】

電荷源が整流器と変圧器を具備する、請求項 4 6 に記載の装置。

【請求項 4 8】

バイブレータが圧電変換器を含んでなる、請求項 4 6 に記載の装置。

【請求項 4 9】

第一のノズルが少なくとも $30\ \mu\text{m}$ の径を有している、請求項 4 6 に記載の装置。

【請求項 5 0】

第一のノズルが少なくとも $100\ \mu\text{m}$ の径を有している、請求項 4 6 に記載の装置。

【請求項 5 1】

(i v) 第一の流れを囲繞する第二の液体の第二の流れを形成するための、第一のノズルを囲繞する第二のノズルを更に具備する、請求項 4 6 に記載の装置。

【請求項 5 2】

(i) 第一の液体の第一の流れを形成するための手段と、

(i i) 第一の流れを加速するための手段と、

(i i i) 第一の流れを振動させるための手段とを具備する、粒子の形成装置。

【請求項 5 3】

第一の流れを加速するための手段が第二のノズルである、請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 4】

第一の流れを加速するための手段が電荷源である、請求項 5 2 に記載の装置。

【請求項 5 5】

(i) 第一の液体の第一の流れを形成するための第一のノズルと、

(i i) 第一の流れを囲繞する第二の液体の第二の流れを形成するための、第一のノズルを囲繞する第二のノズルと、

(i i i) 第一及び第二の流れの少なくとも一に電荷を印加するための電荷源とを具備する、粒子の形成装置。

【請求項 5 6】

電荷源が整流器と変圧器を具備する、請求項 5 5 に記載の装置。

【請求項 5 7】

第一のノズルが少なくとも $30\ \mu\text{m}$ の径を有している、請求項 5 5 に記載の装置。

【請求項 5 8】

第一のノズルが少なくとも $100\ \mu\text{m}$ の径を有している、請求項 5 5 に記載の装置。

【請求項 5 9】

請求項 4 1 に記載の装置で粒子を形成することを含む、粒子の形成方法。

【請求項 6 0】

請求項 4 6 に記載の装置で粒子を形成することを含む、粒子の形成方法。

【請求項 6 1】

請求項 5 2 に記載の装置で粒子を形成することを含む、粒子の形成方法。

【請求項 6 2】

10

20

30

40

50

請求項 55 に記載の装置で粒子を形成することを含む、粒子の形成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願)

本出願は 2 件の仮出願、「生物医学的応用のための厳密に制御されたポリマーの製造」と題される Kye k y o o n K i m と D a n i e l W . P a c k の 2000 年 8 月 15 日出願の仮出願番号第 60 / 225525 号；及び「ミクロン及びサブミクロン範囲の均一な中実及び中空球状粒子及び制御されたサイズ、電荷、化学組成及び化学量論のかかる粒子をフィールド注入帯電 (F I E L D - I N J E C T I O N C H A R G I N G) 及び電気流体力学的噴霧法を用いて製造するための装置及び方法」と題される Kye k y o o n K i m の 2000 年 8 月 15 日出願の仮出願番号第 60 / 225620 号の優先権を主張し；その双方を出典明示によりここに取り込む。

10

【0002】

(背景)

バイオテクノロジーの急速な進歩により数多くのタンパク質及びペプチド治療薬が発見されるに至っており、その多くは最近市場に出たか、もしくは現在、米国食品医薬品庁の規制による審査下にある。しかし、伝統的な小分子医薬とは異なり、タンパク質及びペプチドは一般に経口投与ができない；注射又は注入が必要となることがしばしばである。更に、その脆性と短いインヴィヴォ半減期のために、その医薬が長い時間にわたって局所的又は全身的に送達され得る生体分解性ポリマー手段 (d e v i c e) ヘタンパク質を封入することが、これらの問題に対して有力で熱心に研究されている解決策である。様々なポリマーを含んでなる生体分解性ミクロスフィアは、製造が比較的簡単であることと注射針を通してインヴィヴォで様々な位置に容易に投与できることから、最も研究されている手段である。

20

【0003】

沈殿法、噴霧法、相分離法及び乳化法を含む、幾つかのミクロスフィア製造方法が記載されている。乳化及び噴霧法によるアプローチがベンチスケールと工業的規模の双方で一般的に使用されている。スフィアサイズ及びサイズ分布は再現性があるが制御性に乏しいことが多い。平均径の 25 ~ 50 % の標準偏差となることも珍しくはない。

【0004】

スフィアサイズ及びサイズ分布の制御は徐放薬物送達に対して幾つかの重要な意味を持っている。例えば、典型的には、所望の放出速度と投与経路をもたらす理想的なスフィアサイズが存在する。「小さすぎる」スフィアは封入効率が悪く、注射部位から移動するおそれがあり、その送達物を不当に速く放出してしまうおそれがある。「大きすぎる」スフィアは注射針を容易には通過しないおそれがある。よって、一般的な製造方法によって得られる典型的に多分散性のスフィアは濾過又は篩にかけて所望のサイズ範囲の粒子に分離しなければならず、その範囲を外れるポリマー及び薬剤構成スフィアは廃棄される。

30

【0005】

およそ 1 - 5 μ m の径の均一なミクロスフィアは、マクロファージや樹状細胞のような専門の抗原提示細胞 (A P C s) の受動的なターゲティングに対して理想的である。同様に、10 ~ 20 μ m 径のミクロスフィアは、化学的塞栓形成による腫瘍組織の屈曲毛細血管床のターゲティングに使用されうる。厳密なミクロスフィアの製造が可能になるシステムによりそのような用途に対する至適サイズを特定することができ、商業的な製造と臨床的な実施化に対して効果的な途を提供しうる。

40

【0006】

徐放性薬物送達技術において長い間達成することが望まれてきた目標は、封入化合物の放出速度を精確に制御することができることであり、ミクロスフィアサイズが放出キネティクスの主たる決定因子である。大きなスフィアは一般に封入化合物をよりゆっくりとより長い時間をかけて放出するが、その他の性質 (ポリマー分子量、初期ポロシティ、スフィア内の薬剤分布等々) は変わらない。一定の (すなわちゼロ次の) 放出速度が好ましいこ

50

ともよくあるが、変動する薬剤放出速度も多くの重要な効能に対して有効である。例えば、抗生物質を断続的に高用量にするとバクテリアの耐性の発生を緩和し、またワクチンを不連続的に投与するとしばしば免疫応答を亢進する。

【0007】

薬剤放出速度を制御する方法は、(i)ポリマー化学成分(無水物、エステル類等々)及びモノマー比率の選択、(ii)ポリマーへ薬剤を結合させること、(iii)ミクロスフィア製剤化のパラメータを変化させ、それによって得られる粒子の物理特性を変化させること、及び(iv)スフィアサイズと分布を操作することである。後者の研究の成功は比較的広いミクロスフィアのサイズ分布によって制約されていた。

【0008】

近年、制御された均一のサイズを持つ生体分解性ポリマーミクロスフィアの製造について幾つかの報告がなされた(P. Sansdrap及びA. J. Moes, Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. Int. J. Pharm. 98(1993) 157-164; B. G. Amsden及びM. Goosen, An examination of the factors affecting the size, distribution, and release characteristics of polymer microbeads made using electrostatics. J. Control. Release 43(1997) 183-196; K. Shiga, N. Muramatsu及びT. Kondo, Preparation of poly(D, L-lactide) and copoly(lactide-glycolide) microspheres of uniform size. J. Pharm. Pharmacol. 48(1996) 891-895; B. Amsden, The production of uniformly sized polymer microspheres. Pharm. Res. 16(1999) 1140-1143; 及びN. Leelarasamee, S. A. Howard, C. J. Malanga及びJ. K. H. Ma, A method for the preparation of polylactic acid microcapsules of controlled particle size and drug loading. J. Microencapsul. 5(1988) 147-157)。しかしながら、これらの方法の何れも狭いサイズ分布を維持しながら薬物送達に適したサイズ範囲(～1-100 µm)の粒子を製造することはできなかった。また、これらの過去の方法は商業的な利用のためにスケールアップすることは難しいと思われる。

【0009】

中空スフィアの製造方法は、N. K. Kim, K. Kim, D. A. Payne及びR. S. Upadhye, "Fabrication of hollow silica aerogel spheres by a droplet generation method and sol-gel processing", J. Vac. Sci. Technol. A., vol. 7, no. 3 pp. 1181-1184 (1989) 及びK. Kim, K. Y. Jang及びR. S. Upadhye, "Hollow silica spheres of controlled size and porosity by sol-gel processing", J. Am. Ceram. Soc., 74:8, pp. 1987-1992, (1991)に開示されている。

【0010】

静電噴霧法は、K. Kim及びR. J. Turnbull, "Generation of charged drops of insulating liquids by electrostatic spraying", J. Appl. Phys., vo

10

20

30

40

50

l . 4 7 , n o . 5 , p p . 1 9 6 4 - 1 9 6 9 , M a y 1 9 7 6 , K i m 等の米国特許第 5 3 4 4 6 7 6 号及び K i m 等の米国特許第 6 0 6 0 1 2 8 号に開示されている。

【 0 0 1 1 】

中空スフィアを製造するために考案された過去に開発された方法は、液相中に異なった物質を含む 2 つの同軸に取付けられたノズル（内側ノズルの物質もまた気体であり得る）がスムーズな円筒状の噴流をつくりだし、その噴流が音波励起によって均一な液滴に破壊されるデュアルノズル法を用いている。（後記の N . K . K i m 等 , " F a b r i c a t i o n o f h o l l o w s i l i c a a e r o g e l s p h e r e s b y a d r o p l e t g e n e r a t i o n m e t h o d a n d s o l - g e l p r o c e s s i n g " 及び後記の K . K i m 等 , " H o l l o w s i l i c a s p h e r e s o f c o n t r o l l e d s i z e a n d p o r o s i t y b y s o l - g e l p r o c e s s i n g " を参照のこと）。この方法で作製可能な最小の液滴は外側ノズルの開口のおよそ二倍である。これは、言い換えると、均一な中実及び中空の小サイズ（約 50 μ m 未満の径）のスフィア、特にサブミクロンの範囲のスフィアの製造には現実的な困難が伴うことを示している。その理由は、ノズルの開口が小さくなればなる程、ノズルが詰まってしまう機会が大きくなるためであり、特に封入される医薬化合物がスフィア形成液中に微粒子として懸濁される場合はしかりである。この問題は、使用される物質が粘稠性の場合には更に深刻になる。

10

【 0 0 1 2 】

ノズルタイプの装置から微小液滴を噴霧するための過去の方法では、典型的に得られる最小スフィアサイズはノズル開口のサイズに制約される。通常、ノズル開口より液滴を小さくすることはできない；典型的には液滴径はノズル径の 1 ~ 4 倍である。このために所望のスフィアサイズが減少すると幾つかの困難を生じる。一つの問題は、サイズが減少するとノズル自体の製造がより困難になることである。これは、ノズルのアレイ（おそらくは 1 0 0 0 - 2 0 0 0 ）を通して液滴を形成する必要がある大規模な製造方法の場合は特にしかりである。第二の制約は、流体を小ノズルを通して送り込むのに必要な圧力から生じる。必要とされる圧力は

20

$$p = 8 \mu L Q / R^4$$

（ここで、 p はノズルにおける圧力損失であり、 μ は流体の粘度であり、 L はノズルの「流路」の長さであり、 Q はノズルを通過する流体の体積流量であり、 R はノズル開口の半径である）によって与えられる。よって、必要とされる圧力は R^{-4} のスケールである。~ 5 μ m 径の微小液滴を製造することを望む場合は、従来の方法は 5 μ m 以下の径のノズルを必要とする。例えば、1 mL / 分の流量と 1 0 0 センチポアズ（水より 1 0 0 倍粘性がある）の流体粘度で、5 μ m 径のオリフィスは、~ 1.1×10^{10} Pa（~ 1 1 0 0 0 0 a t m）の揚程を必要とする。これは明らかに不可能な高压である。 $\mu \sim 1$ c p の水でさえ 1 mL / 分で 5 μ m 径のノズルを通して送り込むのに 1 1 0 0 a t m の圧力を必要とする。よって、5 μ m 径のノズルを通して任意の液体を実際に送り込むには、できるとしても、特別な装置を必要とする。

30

【 0 0 1 3 】

小スフィアを形成する伝統的な方法の他の問題は、プラスミド D N A のような封入されるある種の化合物は剪断力によって損傷を受けることである。損傷は剪断力と剪断場において費やされる時間の積に依存する。パイプを流れる流体に対するこの積の平均値は、

40

$$(\quad) a v g = 1 6 / 3 \cdot (L / D)$$

（ここで、 L はパイプ長であり D はパイプ直径である）によって与えられる。ノズルのオリフィスはパイプとして近似できる。しかし、入口効果は剪断速度を増加させる傾向があり、これはこの式が低い推定値を与えることを意味する。しかし、の値はおよそオリフィス直径に逆比例する。よって、1 0 0 から 5 μ m とノズル径を減少させると 2 0 の係数で任意の封入化合物になされる損傷を増大させる。

【 0 0 1 4 】

50

米国特許第 6 1 1 6 5 1 6 号は、エアゾールをつくり出す安定化された毛細管微小噴流を記述している。微小噴流は液体流の回りに気体を強制的に送り込むことによって形成されている。正しい条件下では、好ましくは 90% 又はそれ以上が同じ径 $\pm 3\%$ から 30% を持つミクロンサイズのエアゾールが製造される。

【0015】

簡単な概要

小径オリフィスを通して材料を送り込み、ついで音響タイプの波を用いて上記液体を振動させることによって、ミクロン及びナノサイズの球状粒子を製造することがこの発明の目的である。

小径オリフィスを通して材料を送り込み、更なる下方への力を加えることによって、ミクロン及びナノサイズの球状粒子を製造することがまたこの発明の目的であり、該下方への力は、電気流体力学的方法か、第一の液体よりも速い速度で液体に隣接し平行な第二の液体の何れかを含む。上記の方法で音響タイプの波動を用いてミクロン及びナノサイズの球状粒子を製造することがまたこの発明の目的である。

10

二つの同軸に取り付けられたノズルの一方又は他方を通して通過させられる内部及び外部液体を使用して、内部液体（又は気体）を同軸に含む外側液体の滑らかな円筒噴流をつくり出すことによって、中空のミクロン及びナノサイズの球状粒子を製造することがこの発明の更なる目的である。この噴流は更に音波によって破壊されて均一な液滴にされうる。

【0016】

ミクロ及びナノスフィアを製造するための上記方法の何れかを使用することによってミクロ及びナノスフィアを硬化させるための新規な方法を提供することがこの発明のまた更なる目的であり、使用されるノズル又は透孔は水性浴の表面下に配され、最少の変形でスフィアを硬化させることが可能になる。

20

ヒトの医療治療のための及び治療用価値のある生物医学的組成物として有用な、上記の方法の何れかによって封入される治療用化合物を製造することがこの発明のまた更なる目的である。

制御されたサイズ、シェル厚及びシェル数で、徐放薬物送達システムを含むヒト及び動物のための生物医学的用途に有用な異なった物質を含有する異なったシェルを持つ多シェルのミクロ及びナノスフィアを製造することがこの発明のまたその他の目的である。

【0017】

30

身体の所望の細胞、組織又は領域への受動的な又は能動的なターゲティングを含む生物医学的応用のための、上述のタイプ及び他のタイプのミクロ及びナノスフィアを製造することがこの発明のまた更なる目的である。

生物医学的な応用のため、特に徐放薬物送達システムのために正確に制御されたサイズ及びサイズ分布のミクロ及びナノスフィア粒子を製造するための装置と方法を提供することがこの発明の更なる目的である。

所望のサイズ、化学組成及び化学量論の安定したミクロ及びナノスフィアを製造することがこの発明の更なる目的である。

制御された徐放薬物送達システムを含む生物医学的用途のための制御されたサイズのミクロ及びナノスフィアを製造することがこの発明の更なる目的である。

40

制御された徐放薬物送達システムを含む生物医学的用途のための制御されたサイズの中空のミクロ及びナノスフィアを製造することがまたこの発明の更なる目的である。

これらの目的とその他の目的が以下に更に詳細に記載されるこの発明において提供される。

【0018】

第一の側面では、本発明は、第一の液体を含む第一の流れを加速し；該第一の流れを振動させて、粒子を形成することを含む、粒子の形成方法である。

第二の側面では、本発明は、第一の液体を含む第一の流れを加速することを含む、粒子の形成方法である。加速は第一の流れに電荷を印加することを含む。粒子はコア部とシェル部を有する。

50

第三の側面では、本発明は、50から100 μm の平均径を有する粒子である。粒子の90%は粒子の平均径の2%以内である径を有している。

第四の側面では、本発明は1から50 μm の平均径を有する粒子である。粒子の90%は粒子の平均径の1 μm 以内である径を有している。

第五の側面では、本発明は、上記方法によって調製された粒子である。

第六の側面では、本発明は、(i)第一の液体の第一の流れを形成するための第一のノズルと、(ii)第一の流れと接触する第二の液体の第二の流れを形成するように配向された第二のノズルと、(iii)第一の流れから粒子を形成するためのバイブレータとを具備する、粒子の形成装置である。

【0019】

第七の側面では、本発明は、(i)第一の液体の第一の流れを形成するための第一のノズルと、(ii)第一の流れに電荷を印加するための電荷源と、(iii)第一の流れから粒子を形成するためのバイブレータとを具備する、粒子の形成装置である。

第八の側面では、本発明は、(i)第一の液体の第一の流れを形成するための手段と、(ii)第一の流れを加速するための手段と、(iii)第一の流れを振動させるための手段とを具備する、粒子の形成装置である。

第九の側面では、本発明は、(i)第一の液体の第一の流れを形成するための第一のノズルと、(ii)第一の流れを囲繞する第二の液体の第二の流れを形成するための、第一のノズルを囲繞する第二のノズルと、(iii)第一及び第二の流れの少なくとも一に電荷を印加するための電荷源とを具備する、粒子の形成装置である。

第十の側面では、本発明は上記の装置で粒子を形成することを含む、粒子の形成方法である。

【0020】

(詳細な説明)

本発明は、小径オリフィスを通して材料を送り込み、音波タイプの波で上記液体を振動させることによって、好ましくは球形の、ミクロン及びナノサイズの粒子が製造される方法に関し、流体の速度は液体の後の圧力によって作り出される速度を越えて増加する。ノズル径は製造される粒子よりも大きくできる。例えば、5 μm の液滴は更に大きなノズル、例えば100 μm 径のノズルから調製することができる。粒子は周囲の液体中に形成され、変形を防止するのに役立つ。

【0021】

非常に小さい粒子を形成するのに必要な圧力は本発明によって大きく低減される。例えば、1 mL / 分で100 μm 径のノズルを通して送り込まれる100 c pの溶液は $\sim 68000 \text{ Pa}$ ($\sim 0.67 \text{ atm}$)のみのポンプ圧を必要とするか、又はグリセリン ($\mu \sim 500 \text{ c p}$)のような粘性のある溶液を15 atmの揚程で5 mL / 分で100 μm 径ノズルを通して送り込むことができる。これらの圧力は高圧液体クロマトグラフィーシステムで一般的に提供されるもののように、市販の高圧ポンプで容易に得られる。更に、剪断力は与えられた粒子径に対して大きく低減され、非常に小さいノズルの場合に遭遇する困難がまた解消される。本発明の側面は、出典明示によりここに取り込まれる「Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions」J. Controlled release 73(1): 59 - 74 (2001年5月18日)に記載されている。

【0022】

本発明はまた小径オリフィスを通して材料を送り込み、更なる下方への力を加えることによってミクロン及びナノサイズの球状粒子が製造される方法に関し、上記下方への力は第一の液体より大なる速度で液体に隣接し平行となる第二の液体流又は電気流体学的技術の何れかを含む。音波タイプの波をまた上記方法で用いることができる。ここで使用される場合、「粒子」という用語には液体粒子(液滴)と固体粒子の双方が含まれる。

本発明は更に内部及び外部液体が二つの同軸に取付けられたノズルの一方又は他方を通し

10

20

30

40

50

て流通させられて、内部の液体（又は気体）を同軸に含む外側液体のスムーズな円筒噴霧流をつくり出す、中空のマイクロ及びナノサイズの球形粒子を製造する方法に関する。この噴霧流は更に音波波により均一な液滴に破壊することができる。

【0023】

本発明は更にマイクロ又はナノスフィアを硬化させるための新規な方法であって、上記スフィアを製造するために使用されるノズル又はオリフィスが水性浴の表面下に配されて、最小の変形のスフィアの硬化を可能にする方法を提供する。

この発明は更に生物医学的組成物として有用な上記方法の何れかによって封入される治療化合物を提供する。

【0024】

本発明の一実施態様は、非常に小さい均一な中実、中空又は多殻スフィアを製造するために「電気流体力学的噴霧法」及び「デュアルノズル法」を独立して又は組み合わせて用いる。中空及び多殻マイクロ及びナノスフィアの製造を可能にする電気流体力学的噴霧法は新しい。この方法は、任意の他の現存する方法で本質的につくり出すことが困難なマイクロメートル及びナノメートルサイズの中実及び多殻スフィアを製造するのに特に適している点で新規で非常に有用である。更に、非常に均一なスフィア、特に中空及び多殻スフィア中への治療化合物の封入は新規で、他の現存する方法によって製造されるスフィアを使用して得ることができない精確に制御された放出速度を持つ徐放及び標的薬物送達のために非常に有用である。

【0025】

この発明の装置と方法は様々な生物医学的応用に対して特に有用である第二の材料の球形シェル中に第一の材料を封入することを可能にする。

この発明の装置と方法はまた内部ノズルを通しての第一の材料の供給を阻止することによって第二の材料のみの中実スフィアの製造を可能にする。

この発明の他の独特で新規の側面は、この方法を、得られるマイクロ及びナノスフィアの電気極性（中性、陽性又は陰性）を選択するために使用することができることである。

【0026】

この概念は二種以上の材料を含有する多殻スフィアを製造するように拡大適用することができる。本発明により50又は100 μm 径より小さい非常に小さい多殻スフィアを製造することが可能になるという事実は、それを薬物送達システム（DDS）を含む応用に特に有用なものとする。DDS以外の数多くの応用もまた可能である。

本発明はまた制御されたサイズ、殻厚、電荷、化学組成物及び化学量論の中実又は中空の均一なマイクロ及びナノスフィアを提供する。そのようなスフィアは生物医学分野で多くの独特の用途を有している。

【0027】

本発明は材料を小径オリフィスを通して送り込み、ついで音波タイプの波で上記液体を振動させて、マイクロ及びナノサイズの球状粒子を製造する方法に関する。

本発明は更に小径オリフィスを通して材料を送り込み、更なる下方への力を上記液体に加えてオリフィスを通して液体を移送することを含むマイクロ及びナノサイズの球状粒子を製造する方法に関する。更なる下方への力は、スフィア形成液体より大なる速度で液体に隣接し平行となる第二の液体流又は電気流体力学的技術でありうる。これらの方法は更に音波タイプの波の付加によって変形され得る。

【0028】

本発明は更に内部及び外部液体を含有する中空のマイクロ及びナノサイズの球形粒子を製造する方法に関し、内部及び外部液体は二つの同軸に取付けられたノズルの一方又は他方を通して流通させられ、スムーズな円筒噴霧流が上記外部液体の内部に内部液体（又は気体）を同軸に含む外側液体からつくり出される。この噴霧流は音波波により均一な液滴に破壊することができる。中空スフィアの半径と厚みのサイズと比は外部及び内部液体の相対流量、ノズルの相対サイズ、ノズルの相対位置及び音波励起の振幅と周波数を変えることにより、制御される。

10

20

30

40

50

【0029】

この方法は、浴液の表面張力が中空スフィアの球状形状と完全性を保持するのに役立つので中空スフィアの半径と厚みの間が大きな比の中空スフィアを製造することを更に容易にする。

本発明はマイクロ及びナノスフィアを製造するための上記方法の何れかを利用することによってマイクロ及びナノスフィアを硬化させる方法に更に關し、利用されるノズル又はオリフィスは水性浴の表面下に配されて、最小の変形のスフィアの硬化を可能にする。上記のノズルタイプの任意のものが本発明のこの実施態様で作用する。

【0030】

この発明は更に医療的治療のためにヒトに与えられる上記方法の何れかによって封入される治療化合物に更に關する。 10

本発明はデュアルノズルシステムと電気流体力学的概念を使用してミクロン及びナノサイズの球状粒子を製造することを含むマイクロ及びナノスフィアを製造するための方法に關する。

この発明は更にデュアルノズルシステムの内部ノズルにおいて非常に鋭い皮下タイプの針を使用して、半導体及び生物医学用途として有用な中実、中空及び多殻ミクロン及びナノサイズの粒子を製造することに関する。

【0031】

この発明は更に均一な中実、中空及び多殻ミクロン及びナノサイズの粒子であって、中空か満たされたものを含有する新規な生物医学的組成物に關する。 20

この用途において、スフィア、ビーズ及び粒子という用語は置き換え可能に使用されて、本発明のマイクロ及びナノスフィアを記述する。また「中空」という用語はコア部が空か気体を含んでいることを示すために使用される。「多殻」という用語は、コア部が液体（水性、油等々）か又は他のポリマーのような固体である粒子を含む。「中空」及び「多殻」という用語は本出願において別々に使用されるが、これらの用語は他方を含んでいると読まなければならない。

【0032】

ミクロン及びナノサイズのスフィアの製造の必要性が生物医学産業において存在する。精確に制御されたサイズ、サイズ分布及び形態（例えば中空、多殻、中実、多孔性等々）を持つスフィアを形成する能力は幾つかの非常に重要な用途を、特にバイオテクノロジー分野で有している。この方法により多くの薬物送達法を可能にし、及び／又は有意に改善する。 30

【0033】

この発明の一実施態様は、生物医学的用途、特に徐放性薬物送達システムのために精確に制御されたサイズ、サイズ分布及び形態の中実、中空及び多殻マイクロ及びナノ粒子を製造するための装置と方法に關する。この発明はまた第一の材料を含有する新規なマイクロ及びナノスフィアに關する。この発明は更に第2の材料を封入する第一の材料の新規な中空のマイクロ及びナノスフィアに關する。

この発明の他の実施態様は、生物医学的応用、特に徐放性薬物送達システムのための精確に制御されたサイズ、サイズ分布及び形態のマイクロ及びナノ粒子を製造する装置と方法に關する。 40

【0034】

この発明の実施態様により小径オリフィスを通して液体材料（例えば有機溶媒に溶解したポリマー、ポリマー溶融物等々）を送り込むことによって粒子又はスフィアの形成を可能にし、小径オリフィスは数ミリメートルから約1ミクロンの径とできる。オリフィスは500nm径と更に小さくすることができる。オリフィスを流出する液体流は制御された周波数と振幅で装置を振動又は揺動させることによって液滴に破壊される。

振動又は揺動は例えば波発生器によって駆動される圧電変換器によって達成することができる。機械的励起は、流れを均一な液滴の列に破壊する周期的不安定性を生じる液体噴流に沿って音波エネルギー波を発すると考えられている。 50

【 0 0 3 5 】

液滴サイズはオリフィス径、溶液流量、振動周波数及び振幅によって決まる。よって、これらの4種のパラメータを変えることによって液滴サイズを制御することができる。更に、固定されたオリフィスを持つ装置が与えられると、液滴サイズはオリフィス開口よりも僅かに大きい最小サイズからオリフィス開口の少なくとも10倍の最大までの範囲内で変化させることができる。

このアプローチ法は音波強さが低いので一般的な超音波ノズルよりも改善され、周波数と溶液流量の間の適合性をしっかりと制御することができる。

【 0 0 3 6 】

この発明の更に他の実施態様では、スフィアサイズは、オリフィスを通して液体噴流を「引き込む」更なる下方への力を用い、オリフィスの径より噴流サイズを低減させることによって更に制御することができる。一例は電氣的力が作用して、液体噴流、そして得られる液滴の径を低減させる電気流体力学的方法である。電気流体力学的方法は、例えばバッテリーで、あるいは家庭の電流を変換する変圧器と整流器でノズルが液体中に直接に高電圧を印加することによって液体中に所望の極性の電荷を注入することによって作動させられる。外方に向けられた電氣的張力がノズル開口の荷電液体メニスカスに生じ、より小さい液滴をノズルから落下させる（「ドリップモード」）。理論によって制約されるものではないが、液滴サイズが低減するこの理由は、協働してノズルから液体を引き出すように作用している重力と電氣的な力の2つの力が存在する一方、表面張力がノズルに液体を保持するためであると信じられている。注入される電荷の量が増加すると、それによって電氣的張力が増加し、やがて重力及び表面張力に勝って液滴サイズを低減する。ある閾値を越えての電荷注入の更なる増加によって、ノズルから液体を文字通り引き抜く非常に強力な電氣的張力が生じて薄い荷電した液体噴流が形成され、これが（「噴流モード」と呼ばれる）かなり均一な液滴に破壊される。噴流モードは、電荷注入が更に増加すると、単一噴流から複数噴流モードまで変化する。

10

20

【 0 0 3 7 】

使用される更なる下方への力の他の例は、スフィア形成液体よりも大なる速度で、スフィア形成液体と隣接して平行なオリフィスを通過する分離した液体流（典型的には非混和性）である。スフィア形成液体は液液界面における流体抵抗によって引き込まれる。スフィア形成噴流は二つの流れの線形速度の差に比例する係数だけ径が減少する。

30

【 0 0 3 8 】

この発明の方法は更に変形させて、異なった材料の二以上の同心のスフィアからなる「中空」又は多殻粒子を生じさせることができる。例えば薬剤を含有する水相を囲繞するポリマーシェールからなるスフィアを生産することができる。このようなスフィアは2つの同軸に取付けられたノズルを用いることからなるデュアルノズル法を使用して形成することができる。ノズルの一方又は他方に二つの液体を通過させることによって、その内部に他の液体（又は気体）を同軸に含む一液体のスムーズな円筒噴流を生じさせることができる。ついで噴流は上述されたように、音波を使用して均一な液滴に破壊することができ、「中空」又は多殻スフィアが得られる。スフィアの半径と厚みの間の比とサイズは、外部及び内部流体の相対流量、ノズルの相対サイズ、ノズルの相対位置及び音波励起の振幅と周波数を変えることによって制御することができる。

40

【 0 0 3 9 】

この発明の他の実施態様は、スフィアの均一性を保持することを可能にしながらマイクロ及びナノスフィアの新規な硬化を可能にする。装置から落下する液滴はスフィアを構成する材料のタイプに依存して幾つかの標準的な方法の任意のものによって硬化させてマイクロスフィアを形成することができる。重要な考慮事項は、スフィアの捕集、硬化（相転換）及び乾燥の間、均一なサイズ又は所望のサイズを維持することである。ノズルを流出する液滴が空気中を通過して落下させられ、ついで、例えば有機溶媒が抽出されることになる液体浴（しばしば水性又は液体窒素）中に入る場合、液体表面とのスフィアの衝突がスフィアの形態を変形させ、あるいは完全に破壊さえしうる。本発明の他の実施態様は従来のこの

50

固有の問題を解消するもので、実施態様は、オリフィスを水性浴の表面下に配し、それによって表面との衝突を避ける。ついでスフィアは攪拌されて、有機溶媒が効果的に抽出される。しかし、攪拌は穏やかでなければならない；通常の攪拌速度では余りに剪断力を生じさせすぎ、粒子を破壊し、サイズ分布を台無しにする。これは、他の噴霧法が液体／空気界面の下に配されたノズルを用いていないので、新しいことであると考えられる。

【0040】

一実施態様では、本発明は中空である非常に小さい均一なスフィアを製造するためにデュアルノズル法と組み合わせて電気流体力学的噴霧法を利用する。所望のサイズ、化学組成及び化学量論のミクロ及びナノスフィアは、流量制限場注入静電噴霧法 (flow - limited field injection electrostatic spraying) (FFESS) と命名されたこの新規な方法によって最も安定した形で製造することができる。この実施態様は中空スフィア製造技術と静電噴霧技術の基礎的な考え方を組み合わせている。中空スフィア製造法は、N. K. Kim, K. Kim, D. A. Payne 及び R. S. Upadhye, 「Fabrication of hollow silica aerogel spheres by a droplet generation method and sol-gel processing」J. Vac. Sci., Technol. A., vol. 7, no. 3 pp. 1181 - 1184 (1989) 及び K. Kim, K. Y. Jang 及び R. S. Upadhye, 「Hollow silica spheres of controlled size and porosity by sol-gel processing」J. Am. Ceram. Soc., 74: 8, pp. 1987 - 1992, (1991) に開示されている。静電噴霧法は、K. Kim 及び R. J. Turnbull, 「Generation of charged drops of insulating liquids by electrostatic spraying」J. Appl. Phys., vol. 47, no. 5, pp. 1964 - 1969, May 1976, Kim 等の米国特許第 5344676 号及び Kim 等の米国特許第 6060128 号に開示されている。この実施態様では、本発明は電気流体力学的噴霧法の概念を導入することによって上記の困難性を解消している。スムーズな液体噴流を均一な中空液滴に破壊するために機械的な力だけが利用される通常の中空スフィア製造法と異なり、本発明のこの実施態様は作動液体の荷電をつくりだし、得られた電氣的張力を利用して液体噴流のサイズをノズル開口のサイズ以下にうまく低減させる。これは、次に、液体噴流の破壊から生じる液滴のサイズを低減する。このようにして、50 μm 径より小さい、非常に小さい異なった材料を含む均一な多殻スフィアを製造することができる。本発明のこの特定の能力により、制御された薬剤放出又は薬物送達システムを含む多くの求められている生物医学用途の要求に一致する選択材料を含む球状シェル部にナノメートルサイズの粒子を封入することが可能になる。外部の球状シェルの厚みを制御する能力とそれを構成する材料がまた薬剤放出速度の制御のための様々なシナリオの製剤化を容易にする。同じ方法が、異なった材料の二以上の層を持つ小さな多殻球状粒子の製造を可能にする二以上のノズルを含む同軸ノズルにも当てはまることは強調されなければならない。

【0041】

本発明の粒子は非常に狭いサイズ分布を有しうる。好ましくは、粒子の少なくとも 90 % が平均粒子径の 2 % 以内、好ましくは 1 % 以内の径を有している。あるいは、粒子の好ましくは少なくとも 95 % が平均粒子径の 10 % 以内、より好ましくは 5 % 以内、更により好ましくは 2 % 以内、最も好ましくは 1 % 以内の径を有している。あるいは、好ましくは、粒子の少なくとも 95 % が平均粒子径の 10 % 以内、より好ましくは 5 % 以内、更により好ましくは 2 % 以内、最も好ましくは 1 % 以内の径を有している。あるいは、好ましくは、粒子の少なくとも 98 % が平均粒子径の 10 % 以内、より好ましくは 5 % 以内、更により好ましくは 2 % 以内、最も好ましくは 1 % 以内の径を有している。あるいは、好ましくは、粒子の少なくとも 99 % が平均粒子径の 10 % 以内、より好ましくは 5 % 以内、更により好ましくは 2 % 以内、最も好ましくは 1 % 以内の径を有している。ここに使用する

ところの、粒子についての「径」及び「平均径」という用語は数平均径を意味する。

【0042】

好ましくは多くとも50 μm 、より好ましくは1 μm から50 μm 、最も好ましくは1 μm から30 μm の平均径を持つ粒子の狭いサイズ分布を記述する他の方法は、平均径の特定の長さ内にある径を持つパーセントによる。好ましくは、粒子の90%が粒子の平均径の1 μm 以内、より好ましくは粒子の平均径の0.5 μm 以内、最も好ましくは粒子の平均径の0.1 μm 以内である径を有している。あるいは、好ましくは、粒子の95%が粒子の平均径の1 μm 以内、より好ましくは粒子の平均径の0.5 μm 以内、最も好ましくは粒子の平均径の0.1 μm 以内である径を有している。

【0043】

この発明は、生物医学用途、特に徐放性薬物送達システムのための精確に制御されたサイズ及びサイズ分布のミクロ及びナノ粒子を製造するための装置と方法に関する。この発明はまた第一の材料を含有する、新規なミクロ及びナノスフィアに関する。この発明は更に第二の材料を封入する第一の材料の新規な中空のミクロ及びナノスフィアに関する。この発明は生物医学用途、特に徐放性薬物送達システムのための精確に制御されたサイズ及びサイズ分布のミクロ及びナノ粒子を製造するための装置と方法に関する。

【0044】

この発明は更に半導体及び生物医学的用途として有用な中空及び多殻ミクロン及びナノサイズの粒子を製造するための、デュアルノズルシステムの内部ノズルでの非常に鋭い皮下タイプの針の使用に関する。

例示的には、粒子又はスフィアの形成は、液体材料（例えば有機溶媒に溶解したポリマー、ポリマー溶融物等々）を小さなオリフィス（数ミリメートルから10マイクロメートルの径）を通して押し出すことによってなされる。オリフィスを流出する液体流は制御された周波数と振幅で装置を振動又は揺動させることによって液滴に破壊される。

振動又は揺動は、例えば波発生器によって駆動される圧電変換器によって達成することができる。機械的励起が液体噴流と共に音波エネルギーの波を生じ、周期的な不安定性を発生させ、それが流れを液滴の列に破壊するものと考えられる。

【0045】

本発明の更に他の実施態様は治療化合物に関する。治療化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、核酸、多糖類、脂質、ステロイド類並びに有機及び無機医薬化合物等々）を様々な方法でスフィア中に封入することができる。液相において可溶性である化合物は単に溶解させることができる。非可溶性の材料は小粒子の形態で液体中に懸濁させることができる。あるいは、非可溶性材料は不混和性相に溶解させ、液滴形成前にスフィア形成液体と乳化させることができる。例えば、タンパク質は水性緩衝溶液中に溶解させることができる一方、ポリマー（スフィア形成材料）は塩化メチレン又は酢酸エチルのような有機溶媒に溶解させることができる。水性及び有機溶液は混合し、ホモジナイズし、続いて液滴形成液体になる油中水型エマルジョンを形成することができる。

【0046】

この発明の一実施態様は生体分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）を使用する。PLGAは薬物送達のためのよく研究されたポリマーであり、多くのインヴィヴォでの応用に対してFDAの承認を受けている。しかし、その技術はポリ（オルトエステル）、ポリ（無水物）、ポリ（ホスホエステル）、ポリ（ホスファゼン）等を含む他の材料に一般化することができる。

この発明の実施に有用なオリフィスの非限定的な例は、テーパノズル、キャピラリチューブ、平板中の簡単な孔部、又はこれらのタイプの何れかの複数のオリフィスのアレイさえからなる。

【0047】

粒子の形成に有用な材料の非限定的な例には、ポリエステル（例えばポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）及びポリ（乳酸・グリコール酸共重合体）、ポリ（乳酸・リジン共重合体）、ポリ（乳酸・リジングラフト重合体）、ポリ無水物（例えば、ポリ（脂肪酸二量体

10

20

30

40

50

）、ポリ（フマル酸）、ポリ（セバシン酸）、ポリ（カルボキシフェノキシプロパン）、ポリ（カルボキシフェノキシヘキサン）、これらのモノマーのコポリマー等々）、ポリ（無水物・イミド共重合体）、ポリ（アミド）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（イミノカーボネート）、ポリ（ウレタン）、ポリ（オルガノファスファゼン）、ポリ（ホスフェート）、ポリ（エチレンビニルアセテート）及び他のアシル置換セルロースアセテート及びその誘導体、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（カーボネート）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（アクリレート）、ポリアセタール、ポリ（シアノアクリレート）、ポリ（スチレン）、ポリ（塩化ビニル）、ポリ（フッ化ビニル）、ポリ（ビニルイミダゾール）、クロロスルホン化ポリオレフィン、ポリエチレンオキシド及びそのコポリマー及び混合物が含まれる。

10

【0048】

薬物送達の他の用途に対しては、出発前駆物質が液相又は溶液中にある限り、スフィアは、ポリマー（例えばポリスチレン）から金属、無機物（シリカ）、低温化学物質（冷凍水素）までの実質的に任意の材料から形成することができる。

本発明によって得ることができるスフィアは約1ナノメートルから約1ミリメートルの範囲である。薬物送達システムのためには、約10nmから約100ミクロンまでのサイズが可能である。本出願を通じて使用されるところのスフィア又はスフィア群という用語は、1のアスペクト比を持つ粒子に限るものではなく、むしろ完全な球体から有意に逸脱した粒子を含む。好ましくは、粒子は1から10、より好ましくは1から2のアスペクト比を有する。

20

【0049】

ナノという用語は約1から約1000ナノメートルの範囲のサイズを定める。マイクロという用語は約1から約1000ミクロンの範囲のサイズを定める。

二成分ビードの外部シェル厚は用途に応じてビード半径の約99%からビード半径の約1%でありうる。しかし、外部シェルの最小の達成可能な厚みは中空ビードの全サイズとそれを構成する材料の性質に依存するであろう。達成可能な絶対最小厚は数分子層の厚みよりも大きくなければならない。

【0050】

この発明のスフィアは多くの可能な生物医学用途を持つ。

ファゴサイトーシスの受動的ターゲティング。

30

免疫系細胞、特にマクロファージと樹状細胞（*dendrocytes*）が免疫の標的である。これらの「専門の（*professional*）」抗原提示細胞（*APCs*）がワクチン成分へ所望のT細胞応答を誘発し得る。*APCs*は典型的には1から10 μ mの範囲の粒子のファゴサイトーシスを行うことができる；体の細胞の殆どの他のタイプはそのような大きな粒子を内部化できない。ワクチン成分を含むこのサイズの範囲の粒子を作製することによって、ワクチンの*APCs*への送達を受動的にターゲティングできる。現在の技術でこのサイズの粒子の形成は可能であるが、有意に広いサイズ分布を持つもののみである。我々の方法はスフィアの本質的に100%が所望のサイズであるワクチン封入ミクロスフィアを生産することを可能にする。*APC*ターゲティングは、大きすぎるか小さすぎるスフィア中で高価なワクチン成分を浪費しないで最適化することができる。

40

【0051】

毛細血管塞栓。

血管サイズは体中で変わり、最も小さい血管は毛細血管である。腫瘍組織は典型的には急速に増殖している癌細胞に栄養を送る特に屈曲した毛細血管床を示す。腫瘍組織をターゲティングする一つのアプローチ法は、あるサイズのマイクロスフィアに封入された治療化合物を、それらが狭い毛細血管にとどまることができるように送達することである。マイクロスフィアはついで腫瘍に栄養を供給している動脈内に注入される。大きすぎるスフィアはより大きな血管にとどまようになり、治療化合物は全ての腫瘍に到達することが阻止されうる。小さすぎるスフィアは腫瘍を通過し、他の健全な組織に治療化合物を送達するおそれがある；多くの抗癌剤がもちろん細胞毒性であるため深刻な問題である。精確なサイ

50

ズのスフィアを製造する我々の能力により、最も小さい毛細血管にとどまるスフィアの数
を、従って所望の位置に送達される治療化合物の量を最大にすることが可能である。

【0052】

ナノスフィアによるターゲティング。

1 μm 径未満の生体分解性ポリマースフィア（ナノ粒子又はナノスフィア）は薬物送達
において幾つかの特定の用途を有している。例えば、150 nm 径未満の粒子は細胞の多く
の異なったタイプによるレセプター媒介エンドサイトーシスの標的とされ得る。ナノ粒子
はまた経口投与に有用であり、その場合、粒子は腸上皮を横断してM細胞とPeyerパ
ッチに取り上げられうる。大きすぎる粒子は取り上げられることが少なく、小さすぎる粒
子は殆ど治療化合物を含んでいない。生体分解性ポリマーのナノ粒子の形成のための最も
現代的な方法は、多くのものがあるが、粒子サイズの変動が大きくなる。例えば、位相反
転ナノカプセル化法は、ポリマーと薬物が溶媒（例えば塩化メチレン）に溶解され、続い
て非溶媒相（例えば石油エーテル）に注がれるが、100から5000 nmの粒子を生じ
る。最大の変動が平均サイズの数パーセントで粒子サイズを制御する我々の能力は最適な
ナノ粒子ターゲティングを可能にする。

10

【0053】

中実ミクロスフィアからの薬物放出速度の制御。

多くの徐放性薬物送達システムは生体分解性ポリマーから形成されたミクロスフィアから
なる。ミクロスフィアに封入された治療用化合物は、体内の水性環境下で、最も頻繁には
加水分解によって、ポリマーが腐食されると、放出される。薬物放出速度はポリマー組成
、ポリマー分子量、ミクロスフィアポロシティ等々を含む幾つかのファクターに依存する
。しかし、重要なパラメータはスフィアサイズである。一般に、より大きな表面積/体積
を持つより小さいスフィアが大きいスフィアよりもより速やかに浸食し治療化合物を放出
する。

20

【0054】

スフィアサイズ分布を精確に制御する能力により、我々は薬物放出速度の類を見ない制御
ができる。液体流量、振動周波数及び振幅を変えることにより、スフィアサイズを制御す
ることができる。更に、これららのパラメータを連続的にかつ円滑に変えることにより、
予め定めたサイズ分布をつくり出すことができる。薬物放出速度はスフィアサイズ分布に
依存するので、所望の放出速度プロファイル（例えばゼロ次放出、脈動放出等々）を与
える適切なサイズ分布をついで決定することができる。

30

【0055】

複合コア/シェル微小粒子の製造。

複数ノズル法を用いて、二以上の異なった材料の複合粒子を製造することができる。薬物
送達のためのコア/シェル微小粒子は過去に製造されているが、不混和性コア及びシェル
相を持つもののみである。また、スフィアサイズとシェル厚の制御は劣っていた。シェル
厚とスフィア径の優れた制御は可能である。二相は：ポリマーシェル内の気体コア；ポリ
マーシェル内の薬物含有水性コア（シェルはまた第二の又は同じ化合物を封入可能である
）；第二の又は同じ化合物を封入する（同じ又は異なった材料の）ポリマーシェル内に薬
物化合物を封入するポリマーコアを含みうる。このような粒子は新規で有用な薬物放出速
度プロファイルをつくり出しうる。

40

【0056】

マイクロシェルからの薬物放出速度の制御。

疎水性ポリマーミクロスフィア中への水溶性化合物の封入には典型的には薬物/水性相が
ポリマー/油相で乳化される複エマルジョン法が必要となる。油中水型エマルジョンを形
成するのに必要な物理的力と水/油界面との薬物の接触は治療タンパク質及び核酸を含む
薬物化合物へ損傷を及ぼし得る。マイクロシェルへの封入は、物理的力が用いられず水/
油界面の面積が大きく低減されるので、この問題を軽減できる。

【0057】

最も重要なことには、マイクロシェルは徐放性薬物放出速度のための前例のない機会を提

50

示する。我々の方法はスフィアの径とポリマーシェルの厚みの双方の精確な制御を可能にする。生体分解性ポリマーのマイクロシェル、特に表面腐食ポリマー（例えばポリ無水物）から構成されたものからの薬物放出は、ひとたび腐食がシェルの完全性のある臨界最小状態まで低減させると、一度の「破裂（burst）」で生じることが予想される。粒子集団中でシェル厚と任意の与えられたシェル厚のマイクロシェルの数を連続して変えることによって、実際に如何なる所望の薬物放出速度プロフィールでも生じさせることができる。

【0058】

ナノシェルの製造。電気流体力学的方法とデュアルノズル法の組み合わせによりポリマーナノシェルの製造が可能になる。上述のように、実質的に任意の化合物を粒子の内部相に封入することができる。DNA（又は他の核酸）を封入すると、遺伝子移送に特に有用な「人工ウイルス」粒子を製造することができる。

本発明によって封入／放出され得る医薬化合物には、限定されるものではないが、核酸、タンパク質及びペプチド類、ホルモン類及びステロイド類、化学療法剤、NSAIDs、ワクチン成分、鎮痛薬、抗生物質、抗鬱薬等々が含まれる。

この発明の実施に有用な核酸には、限定されるものではないが、DNA、RNA、ペプチド-核酸、オリゴヌクレオチドで、安定性を改善するために修飾されたもの（例えばホスホロチオエート、アミノホスホネート又はメチルホスホネート）が含まれる。

【0059】

この発明の実施に有用なタンパク質及びペプチド類には、限定されるものではないが、ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、エリスリポイエチン、トロンボポイエチン、組織プラスミノゲン活性化因子と誘導体、インスリン、モノクローナル抗体（例えば抗ヒト上皮成長因子レセプター2（ハーセプチン）、抗CD20（リツキシマブ）、抗CD18、抗血管内皮成長因子、抗IgE、抗CD11a）及びその誘導体、一本鎖抗体断片、ヒトデオキシリボヌクレアーゼI（ドルナーゼアルファ、ブルモザイム）、1型インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子、ロイテナイズホルモン放出ホルモン阻害ペプチド、酢酸ロイプロリド、エンドスタチン、アングリオスタチン、ブタ第VII因子固着因子、インターフェロンアルファコン-1、パンクレリパーゼ（膵酵素）等々が含まれる。

【0060】

この発明の実施に有用なホルモン類及びステロイド類（コルチコステロイド類）には、限定されるものではないが、酢酸ノルエチンドロン、エチニルエストラジオール、プロゲステロン、エストロゲン、テストステロン、プレドニゾン等々が含まれる。

この発明の実施に有用な化学療法剤には、限定されるものではないが、タクソール（パクリタキセル）、ビンブラスチン、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン等々が含まれる。

【0061】

この発明の実施に有用なNSAIDsには、限定されるものではないが、ピロキシカム等々が含まれる。

この発明の実施に有用なワクチン成分には、限定されるものではないが、ヘパタイティスB、ポリオ、麻疹、おたふく風邪、風疹、HIV、ヘパタイティスA（例えばハブリックス）等々が含まれる。

この発明の実施に有用な鎮痛薬には、限定されるものではないが、アスピリン、アセトアミノフェン、イブプロフェン、ナプロキセンナトリウム等々が含まれる。

【0062】

この発明の実施に有用な抗生物質には、限定されるものではないが、アモキシシリン、ペニシリン、サルファ剤、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クラリスロマイシン、シプロフロザシン、テルコナゾール、アジスロマイシン等々が含まれる。

この発明の実施に有用な抗鬱薬には、限定されるものではないが、ゾロフト、フルオキセチン（プロザック）、パロキセチン（パキシル）、シタロプラム、ベンラファキシン、フ

10

20

30

40

50

ルボキサミンマレアート、塩酸イミプラミン、リチウム、ネファゾドン等々が含まれる。

【0063】

本発明の実施のために有用な他の生物薬剤学的化合物には、限定されるものではないが、シルデナフィル（パイアグラ）、アシクロビル、ガンシクロビル、フェキソフェニジン、セレコキシブ（セレブレックス）、ロフェコキシブ（ヴィオックス）、アンドロステンジオン、クロロキン、ジフェンヒドラミンHCl、ブスピロン、ドキサゾシンメシレート、ロラタジン、クロルニフィン、グルコン酸亜鉛、酢酸亜鉛、ヒドロコルチゾン、ワルファリン、インディナビルサルフェート、リドカイン、ノバカイン、エストラジオール、酢酸ノルエチンドロン、メドロキシプロゲステロン、デキシフェンフルラミン、デキストロアンフェタミン、ドキシサイクリン、サリドマイド、フルチカゾン、フルダラピンホスフェート、エタネルセプト、メトフォルミンヒドロクロリド、ヒアルロン酸塩、テトラゾシンヒドロクロリド、ロペラミド、イボガイン、クロナゼパム、ケタミン、ラミブジン（3TC）、イソトレチノイン、ニコチン、メフロキン、レボフロキサシン、アトルバスタチン（リピトール）、硝酸ミコナゾール（モニスタート）、リトナビル、ファモチジン、シムバスタチン（ゾコール）、シブトラミンHClモノヒドリド、オフロキサシン、ランゾプロゾール、ラロキシフェン（エピスタ）、サナミビル（レレンザ）、オセルタミビルホスフェート、4-フェニル酪酸ナトリウム塩、クロルプロマジン、ネビラピン、ジドブジン、セチリジンヒドロクロリド（ジルテック）等々が含まれる。

10

【0064】

この発明の実施のために更に使用することができる材料は、全てその全体がここに出典明
示により取り込まれるPhysician's Desk Reference 2000
, 54版, ISBN: 1563633302、AHFS 99 Drug Information, Amer. Soc. of Health System, ISBN: 1
879907917及び米国特許第5019400号に見出すことができる。

20

本発明のスフィアはそこに封入される他の材料を有し得る。本発明のスフィア内に封入可
能な材料は、塩、金属、糖、界面活性剤、酸、塩基、安定剤及び放出増強剤（release enhancing agents）からなる群から選択される。

この発明のスフィアは外側シェル内に、コア内に、各シェル中に個々に、又は同軸シェルの
様々なレベルに封入されて材料（例えばポリマー、生物医学的化合物及びその他の成分）
を含有しうる。

30

この発明の実施態様は選択されたポリマー（類）及び医薬化合物（群）の均一な混合物を
含む。

【0065】

この発明の一側面は本発明の実施を可能にする装置である。該装置は供給材料の流量、注
入電荷、及び温度の制御のための、及び得られる中空又は多層液滴の可視的な特徴付けの
ための適切な機器に接続された同軸の複数ノズルシステムを具備しており、そしてその全
てがコンピュータによって制御される。この装置は特に興味のあるある種のスフィアを製
造するのに最も適したプロセス条件を最適にするコンピュータによって制御することがで
き、該機器により望まれる複数シェルスフィアを製造することが可能になる。このような
システムは制御されたサイズ、シェル厚、化学組成及び化学量論の複数シェルスフィアを
製造するための完全な実験装置として開発できる。あるいはそのようなシステムはある種
の外部ユーザーの望まれる要求に合致することができるスフィアを製造する中央設備で操
業されうる。

40

本発明の装置の実施態様を図7に示す。該装置10は溶液20が通過して、噴流14を形
成するノズル12を有する。非溶媒液体の搬送流れ18は噴流の回りを流れ、噴流の速度
を増加させる。振動が誘導されて、この場合は、増幅器22を介して周波数発生器24に
よって駆動される圧電変換器16を使用して、噴流を離散させて粒子にする。粒子は捕集
フラスコ26に収集されうる。

【0066】

本発明の装置の他の実施態様を図8に示す。該装置28は溶液20が通過するノズル12

50

を有する（噴流は図示せず）。ノズルは捕集フラスコ26内に収容された搬送液体30内にある。電荷源32がノズルに付設されて、流出する噴流に電荷を印加し、その速度を増加させる。別法として、鋭い針を電荷源に付設し、液体中に挿入して、流出する噴流に電荷を印加してもよく；複数ノズル（及び複数液体）の場合には、針を最も応答性のよい液体に配されうる。接地用金属板を捕集部位に含めてもよい。好適には、噴流には振動がまた誘導され、噴流の粒子への離散を制御する。

【0067】

（実施例）

ここに記載する実施例はこの発明の様々な実施態様を例証するものであり、決して限定することを意図するものではない。

10

実施例1 - 均一な中実PLGAミクロスフィアの製造

PLGAを酢酸エチル（50mg/ml）に溶解し、溶液を2-3ml/分と変化する流量で60 μ mの孔部を通して送り込んだ。同時に、音波励起周波数を14から70kHzの範囲で変えた。自由落下スフィアをストロボランプで照らし、画像を10 \times 顕微鏡対物レンズとCCDカメラを使用してビデオテープにとった。図1に示されるように、65から120 μ mのサイズの均一なスフィアが製造された（最小のスフィアサイズは孔径よりもほんの僅かだけ大であることに留意のこと）。スフィアサイズは、ポリマー溶液の流量が増加し、また超音波周波数を減じると増加した。

同じ方法を使用してであるが孔径、ポリマー溶液流量及び超音波周波数を変えて、15～500 μ mの広い範囲にわたって均一なスフィアが形成された。ミクロスフィアは1%ポリ（ビニルアルコール）水溶液中での溶媒抽出/蒸発によって硬化させた。一定量のミクロスフィア懸濁液を顕微鏡カバースリップ上に配して光学顕微鏡によって画像化した。図2に示した代表的な画像は単一調製物内のスフィア径の均一性とこの簡単な装置を使用してミクロスフィアが得られるサイズ範囲を示している。ミクロスフィアは自然に六方最密アレイとして組み込まれた；六角形パターンとサイズの均一性はカバースリップ上の全サンプルにわたって広がっている。

20

【0068】

スフィア集団のサイズ分布をCOULTERマルチサイザ（BECKMAN INSTRUMENTS）を使用して測定した。図3A及びBに示されているように、分布は非常に狭い。ピーク幅は機器の較正に使用された商業的サイズ標準のものと同様である。図3Cは、流量を瞬時に増大させて、実験を通して音波周波数を中程度にシフトダウンし、粒径を73から82 μ mに移行させることにより、サイズ分布を操作することができる能力を示している。図3Dに示された分布を得るには、流量をマニュアルで増加させ、各回の減少倍数の条件を操作して、音波周波数を減少させた。パラメータをマニュアルで操作したので、分布はスムーズではないが、それにもかかわらず、予め決められたミクロスフィアサイズ分布を実際に得ることができることを示している。

30

【0069】

実施例2 - 小スフィアサイズのPLGAの調製

この基礎的方法によって得ることができる最小のスフィア径はノズルのサイズによって支配される。オリフィスサイズを～30 μ mを越えて減少させることは幾つかの理由から問題がある。第一に、例えば毛細管を引き抜くことによるノズルの再現性のある製造はサイズが減少するにつれてますます難しくなる。第二に、非常に小さいノズルは凝集したポリマー又は異物ダスト粒子によって簡単に詰まり、装置全体の注意深い洗浄と溶液の濾過が必要となる。これらは単にシステムの注意深い工業的技術を用いることで解消しうる技術的問題である。しかし、困った問題は、小オリフィスを通して粘性のあるポリマー溶液を通過させることはオリフィス径が減少するにつれてますます難しくなり、より大なる剪断力を生じることである。よって、電気水力学的噴霧法で約30 μ m未満の径のミクロスフィアを製造することが探求された。

40

【0070】

電気水力学的装置はPLGA粒子のサイズを減少させる。これらの予備実験では、PLG

50

A / アセトン溶液を $800\text{ }\mu\text{m}$ ノズルに通した。図 4 A に示されるように、加えられた電荷の不存在下では、ノズルから出る液滴は数ミリメートルの径であり、およそノズル径の 4 倍である。しかし、ノズルへの増加電位が加えられると、液滴サイズが速やかに減少し、最後には $\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 径の PLGA 粒子を生じる (図 4 B - D)。更に電荷を増大させると、ポリマー溶液を微細ミストとして放出させ、個々の粒子を我々の既存のイメージ化装置を使用して観測するには小さすぎる「マルチ - ジェットモード」の粒子スプレーを生じた。

【0071】

我々の大ざっぱな非最適化装置を用いてでも得ることができる小スフィアサイズを実証するために、PLGA 粒子を電気水力学的方法を使用してより小さい ($100\text{ }\mu\text{m}$) ガラスノズルから作り出した。粒子を二つの異なった方法によって捕集した。 $\sim 3 - 30\text{ }\mu\text{m}$ 径のスフィアを、液体窒素浴中にそれらを落下させて、スフィアを凍らせ、続いて冷エタノール中で溶媒を抽出することによって、収集した。およそ 10 及び $5\text{ }\mu\text{m}$ 径のスフィアを図 5 A 及び B にそれぞれ示す。 $3\text{ }\mu\text{m}$ から 100 nm 径までの小スフィアを、流れの下に配されたシリコン EM スタブ上に捕集し、続いて SEM によってイメージ化した (図 5 C 及び D)。スフィアは僅かな最小の乾燥時間の後でスタブへの落下中に捕捉されたので、スフィアは個別に分離したものではなかった。むしろ、ポリマー / 溶媒の液滴はシリコン表面で凝集する傾向があった。しかし、粒子サイズと球形はこのイメージであきらかである。最も重要なことは、スフィアがおよそ $1\text{ }\mu\text{m}$ の径で、有意な割合がナノメートル範囲であることである。更に、音波励起はこの実験では使用されず、得られたスフィアは完全には均一ではない。しかしながらサイズ分布はかなり均一であるように見える。これらスフィアは比較的大きなノズルと初期の実験設定で製造されたので、この方法のより洗練したバージョンを使用してサブミクロンのスフィアを一貫して生じさせることができることはほぼ疑いがない。

【0072】

実施例 3 - 薬剤の封入

最後に、モデル化合物ローダミン B を使用するポリマーミクロスフィア内に薬剤を封入する能力を証明した。そのフリーの塩基形態のローダミン B を 1 、 3 及び 5% (質量薬剤 / 質量ポリマー) の理論負荷で PLGA / 酢酸エチル溶液に溶解させた。上記実施例に記載された手順を使用して均一な 35 、 50 及び $65\text{ }\mu\text{m}$ 径のミクロスフィアを製造し、硬化させ、捕集した。ローダミンの存在は粒子の均一性に観察できる効果はなかった。ローダミンの封入 ($\sim 70\%$ 効率) を蛍光顕微鏡によって確認した (図 6 の右)。ローダミン B は PBS 中 37°C で $7 - 10$ 日のインキュベーションの過程にわたってスフィアから放出される。放出速度は、予想されたようにスフィアが小さい場合により速い (図示せず) か、より多くの薬剤を含んでいた (図 6 の左)。

【0073】

実施例 4 - 油コアを含む PLG ポリマーシェルの製造

コア材料を移送する内部ノズル ($100\text{ }\mu\text{m}$ 孔) とシェル材料を移送する「外部」ノズル ($250\text{ }\mu\text{m}$ 孔) を有するデュアルノズルシステムはコア / シェル流の加速のための非溶媒流れを生じさせる第三のノズルの内部に配した。この場合、キャノーラ油を内部ノズルを通して送り込んだ。PLG を塩化メチレン (50 mg / mL) に溶解させ、シェル材料を移送する「外部」ノズルを通して送り込んだ。ある場合には粒子のシェルの画像化し、モデル医薬を封入する能力を証明するために少量のローダミン B ($\sim 1\%$) を PLG 相に溶解させた。水中 1% (wt / wt) PVA の溶液をコア / シェル流の回りに第三ノズルから流れさせてこの流れを狭くし、得られる粒子が塩化メチレン抽出と粒子硬化のための水性非溶媒浴に入るのを容易にした。所望の粒子サイズに応じて様々な周波数でノズルを音響的に励起させた ($0 - 50\text{ kHz}$)。

【0074】

全体の粒子サイズ、シェル厚及びコア半径は独立に操作した。 1% PVA 流の速度を変えることによって、個々の粒子の全体直径を調節した。 1% PVA 流の速度を増大させると

、コア及びシェル流の加速が生じ、全体の粒子サイズを減少させる。実施例 1 に記載されたように音波励起周波数を変えることにより全体の粒子サイズの更なる調節が可能であり、双方のパラメータ（すなわち、1 % P V A 流の速度と音波励起周波数）を調節して所望の粒子サイズを達成した。また、油（コア）及び P L G（シェル）流の流量の注意深い調節により、様々なコア半径又はシェル厚を有する粒子を得た。P L G 流の流量を変化させて、変わらないコア半径と変化する制御シェル厚を有するシェルを製造した。他のパラメータを一定に保ちながら油の流れの流量を変えることにより、変わらないシェル容積と制御されたコア半径を有するシェルを製造した。このようにして、制御可能で明確に定まった全体サイズとコア半径に対するシェル厚の比を示すコア / シェル粒子を製造することができる。この場合、流れの相対流量並びに音波励起周波数を調節することによって、3 ~ 3 5 μm の範囲にわたって制御された均一のシェル厚を有する直径 2 0 ~ 7 0 μm の範囲の均一な粒子を製造した。

10

【0075】

粒子サイズ分布とアスペクト比を光学顕微鏡と封入ローダミン B の蛍光検出によって実証した。サイズ分布は中実粒子を製造する場合に得られる分布に匹敵することが見出された（図 3）。また、粒子は共焦点蛍光顕微鏡を使用して光学断片によって実証したところ、与えられたサンプルにわたって一致した均一のシェル厚とコア半径を有していた。

【0076】

よって、本発明に従って、本明細書において前述した目的と利点を十分に満たす方法が提供されたことは明らかである。本発明をその様々な特定の実施例と実施態様によって説明したが、本発明はそれらに限定されるものではなく、多くの代替例、変更、及び変形が前述の記載に鑑みて当業者には明らかであると理解される。従って、そのような代替例、変更、及び変形の全てを本発明の精神及び広い範囲内に入るものとして包含することが意図されている。

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 はストロボランプで照らした自由落下スフィアを示しており、画像は 1 0 \times 顕微鏡対物レンズと C C D カメラを用いてビデオテープにとられた。

【図 2】図 2 は 1 5 ~ 5 0 0 μm の単一の調製物内のスフィア径の均一性を示している。

【図 3】図 3 A 及び B は C O U L T E R マルチサイザーを使用して測定したスフィア集団のサイズ分布を示している。図 3 C は流量と音波周波数を瞬時に変えることによるサイズ分布を操作する能力を実証している。図 3 D は連続的に変わるサイズ分布を生じさせる能力を実証している。

30

【図 4】図 4 は、電気流体学的装置が P L G A / 酢酸エチル粒子のサイズを減少させることを実証している。図 4 D は増加した電圧をノズルへ印加した場合を実証している。

【図 5】図 5 A 及び B は、おおざっぱな最適化されていない装置を用いた場合でも得ることができる小スフィアサイズを実証している。図 5 C 及び D は 3 μm 以下の捕集小スフィアを実証している。

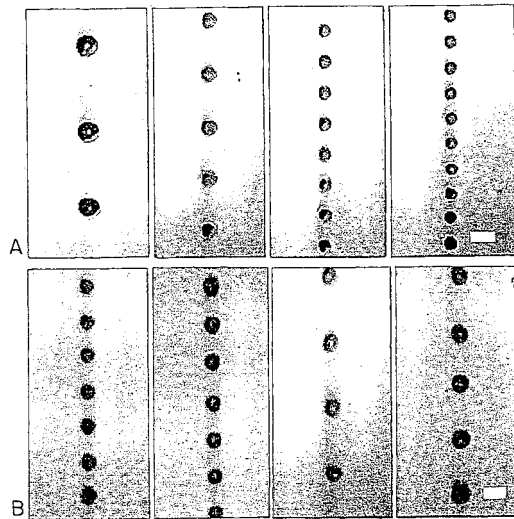
【図 6】図 6 はモデル化合物、ローダミン B を用いてポリマーミクロスフィア内に薬物を封入する能力を蛍光顕微鏡測定により実証している。図 6 はまた P B S 中 3 7 °C での 7 ~ 1 0 日のインキュベーションの過程にわたってのスフィアからのローダミン B の放出を実証している。放出速度はスフィアがより多くの薬物を含む場合、予想以上に速やかであった。

40

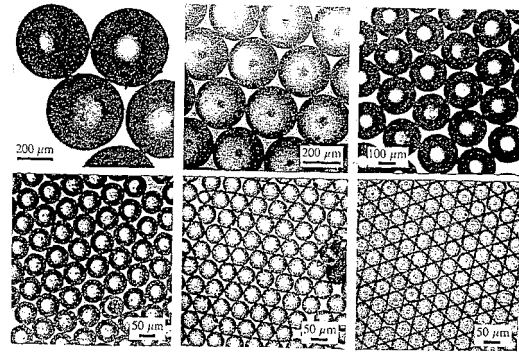
【図 7】図 7 は本発明の装置の一実施態様を示す。

【図 8】図 8 は本発明の装置の他の実施態様を示す。

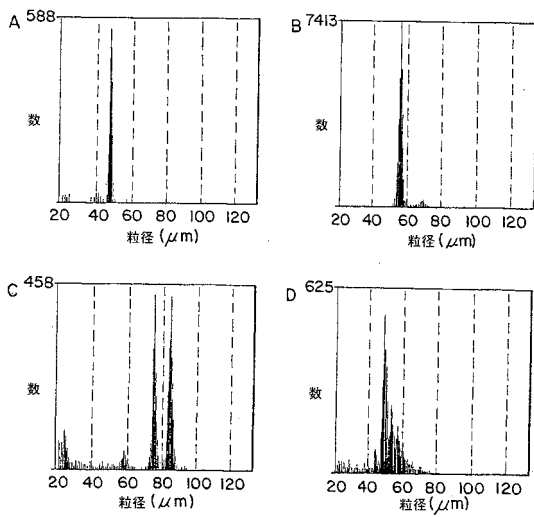
【 図 1 】



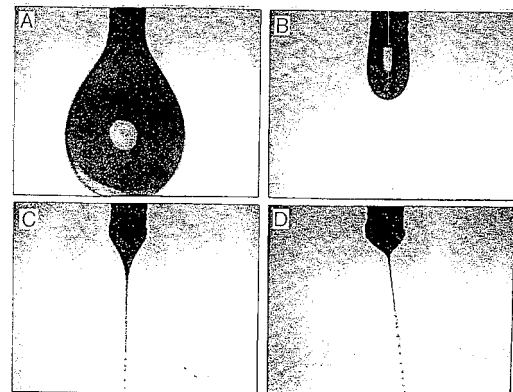
【 図 2 】



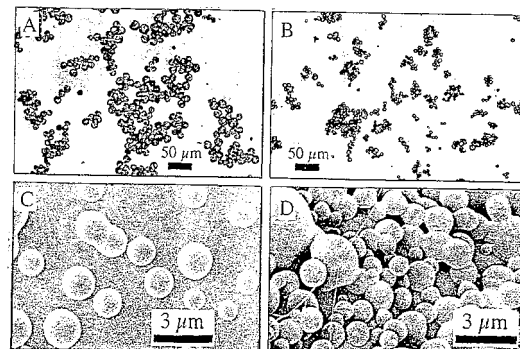
【 図 3 】



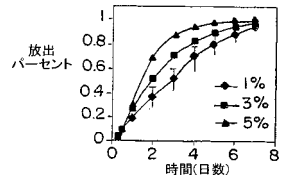
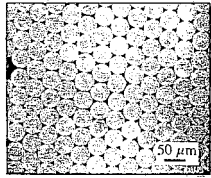
【 図 4 】



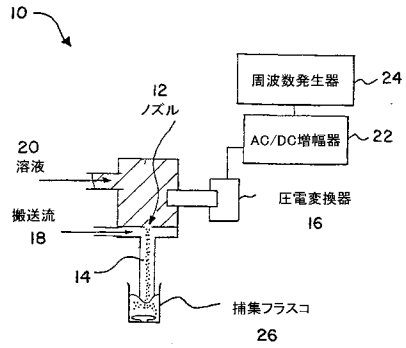
【 図 5 】



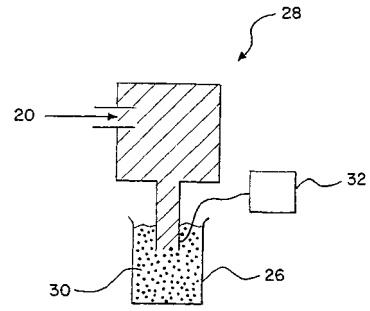
【図6】



【図7】



【図8】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/13786 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K 9/00**
- (21) International Application Number: PCT/US01/25674
- (22) International Filing Date: 15 August 2001 (15.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/225,525 15 August 2000 (15.08.2000) US
60/225,620 15 August 2000 (15.08.2000) US
- (71) Applicant: **BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS** (US/US); 352 Henry Administration Building, 506 S. Wright, Urbana, IL 61801 (US).
- (72) Inventors: **KYEKYOON, Kim**; 1712 Brighton Court, Champaign, IL 61822 (US); **PACK, Daniel, W.**; 3105 Goldmedal Drive, Champaign, IL 61822 (US); **BERKLAND, Cory, J.**; 1001 Country Squire, Urbana, IL 61801 (US).
- (74) Agent: **RAUCH, Paul, E.**; Brinks Hofer Gilson & Lione, P.O. Box 10087, Chicago, 60618 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/13786 A2

(54) Title: MICROPARTICLES

(57) Abstract: A method of forming particles comprises accelerating a stream comprising a liquid; and vibrating the stream, to form particles. The particles may have a diameter that is smaller than the diameter of the nozzle used to form the stream, allowing for the formation of micro- and nano-sized particle.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-1-

MICROPARTICLES

RELATED APPLICATIONS

The present application claims the benefit of two provisional applications, Provisional application serial number 60/225,525 filed August 15, 2000, to Kyekyoon Kim and Daniel W. Pack, entitled "PRECISE, CONTROLLED POLYMER FABRICATION FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS"; and Provisional application serial number 60/225,620 filed August 15, 2000, to Kyekyoon Kim, entitled "APPARATUS AND METHOD FOR FABRICATION OF UNIFORM SOLID AND HOLLOW SPHERICAL PARTICLES IN THE MICRON- AND SUBMICRON-RANGE AND SUCH PARTICLES OF CONTROLLED SIZES, ELECTRICAL CHARGES, CHEMICAL COMPOSITIONS AND STOICHIOMETRIES USING FIELD-INJECTION CHARGING AND ELECTROHYDRODYNAMIC SPRAYING"; both of which are hereby incorporated by reference.

BACKGROUND

Rapid advances in biotechnology have led to the discovery of numerous protein and peptide therapeutics, many of which have recently reached the marketplace or are currently under regulatory review by the United States Food and Drug Administration. Unlike traditional small-molecule drugs, however, proteins and peptides generally cannot be administered orally; injection or infusion is most often required. Further, because of their fragility and short *in vivo* half-lives, encapsulation of proteins in biodegradable polymeric devices, from which the drug can be delivered, locally or systemically, for a prolonged period of time, has been a promising and intensely studied solution to these problems. Biodegradable microspheres comprising a variety of polymers have been the most studied devices due to relatively simple fabrication and facile administration to a variety of locations *in vivo* through a syringe needle.

Several methodologies for microsphere fabrication have been described, including precipitation, spraying, phase separation, and emulsion techniques. The

emulsion and spraying approaches have been commonly used both at the bench and industrial scales. Sphere size and size distribution are reproducible but often poorly controllable. Standard deviations equal to 25-50% of the mean diameter are not uncommon.

Control of sphere size and size distribution has several important implications for controlled-release drug delivery. For example, there typically is an ideal sphere size that provides a desired release rate and route of administration. Spheres that are "too small" exhibit poor encapsulation efficiency, may migrate from the site of injection, and may exhibit undesirably rapid release of their payload. Spheres that are "too large" may not easily pass through a syringe needle. Thus, the typically polydisperse spheres generated by conventional fabrication techniques must be filtered or sieved to isolate particles within the desired size range, and the polymer and drug composing spheres outside that range are wasted.

Uniform microspheres approximately 1-5 μm in diameter would be ideal for passive targeting of professional antigen-presenting cells (APCs) such as macrophages and dendritic cells. Similarly, microspheres 10-20 μm in diameter could be used to target the tortuous capillary bed of tumor tissues by chemo-embolization. A system capable of precise microsphere fabrication could allow the optimal size for such applications to be identified and provide an efficient route to commercial manufacture and clinical implementation.

A long-sought goal for controlled-release drug delivery technologies is the ability to precisely control the release rate of encapsulated compounds, and microsphere size is a major determinant of release kinetics. Larger spheres generally release encapsulated compounds more slowly and over longer time periods, other properties (polymer molecular weight, initial porosity, drug distribution within the sphere, etc.) being equal. A constant (i.e., zero-order) release rate is often preferred, while variable drug release rates can be beneficial for many important indications. For example, intermittent high doses of antibiotics may alleviate evolution of resistance in bacteria, and discontinuous administration of vaccines often enhances the immune response.

Methods to control drug release rate include (i) choice of polymer chemistry (anhydrides, esters, etc.) and comonomer ratios, (ii) conjugating the drug to the polymer, (iii) varying the microsphere formulation parameters, and thus the physical characteristics of the resulting particles, and (iv) manipulating the sphere size and distribution. The success of the latter studies was limited by the relatively broad microsphere size distributions.

In recent years, there have been several reports of the fabrication of biodegradable polymer microspheres with controlled, uniform size (P. Sansdrap and A. J. Moes, Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int. J. Pharm.* 98 (1993) 157-164; B. G. Amsden and M. Goosen, An examination of the factors affecting the size, distribution, and release characteristics of polymer microbeads made using electrostatics. *J. Control. Release* 43 (1997) 183-196; K. Shiga, N. Muramatsu and T. Kondo, Preparation of poly(D,L-lactide) and copoly(lactide-glycolide) microspheres of uniform size. *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 891-895; B. Amsden, The production of uniformly sized polymer microspheres. *Pharm. Res.* 16 (1999) 1140-1143; and N. Leelarasmee, S. A. Howard, C. J. Malanga and J. K. H. Ma, A method for the preparation of polylactic acid microcapsules of controlled particle size and drug loading. *J. Microencapsul.* 5 (1988) 147-157). However, none of these methods was successful in generating particles in a size range appropriate for drug delivery (~1-100 μm) while maintaining narrow size distributions. In addition, these previous methods appear to be difficult to scale-up for commercial applications.

Hollow sphere fabrication techniques are disclosed in N.K. Kim, K. Kim, D.A. Payne, and R.S. Upadhye, "Fabrication of hollow silica aerogel spheres by a droplet generation method and sol-gel processing," *J. Vac. Sci., Technol. A.*, vol. 7, no. 3 pp. 1181-1184 (1989) and K. Kim, K.Y. Jang and R.S. Upadhye, "Hollow silica spheres of controlled size and porosity by sol-gel processing," *J. Am. Ceram. Soc.*, 74:8, pp. 1987-1992, (1991).

Electrostatic spraying technique is disclosed in K. Kim and R.J. Turnbull, "Generation of charged drops of insulating liquids by electrostatic spraying,"

J. Appl. Phys., vol. 47, no. 5, pp. 1964-1969, May 1976, U.S. Patent No. 5,344,676 to Kim et al., and U.S. Patent No. 6,060,128 to Kim, et al.

Previously developed techniques designed to fabricate hollow spheres employ a dual-nozzle scheme in which two coaxially mounted nozzles carrying different materials in liquid phase (the material in the inner nozzle could also be a gas) produce a smooth cylindrical jet which, in turn, is broken up into uniform droplets by an acoustic excitation. (See N. K. Kim, et al., "Fabrication of hollow silica aerogel spheres by a droplet generation method and sol-gel processing," *infra* and K. Kim et al., "Hollow silica spheres of controlled size and porosity by sol-gel processing," *infra*). The smallest drops that can be made with this method are roughly twice as large as the opening of the outer nozzle. This in turn indicates practical difficulties associated with fabricating uniform solid and hollow spheres of small sizes (less than about 50 μm in diameter) especially spheres in the submicron-size range. The reason is that the smaller the nozzle opening, the greater the chances for it to get plugged up, especially if the pharmaceutical compounds to be encapsulated are suspended as a particulate in the sphere-forming liquid. This problem becomes worse when the materials being used are viscous.

With previous technologies for spraying microdroplets from nozzle-type devices, the minimum sphere size typically obtainable is limited by the size of the nozzle opening. Usually, it is not possible to make drops smaller than the nozzle opening; typically, droplet diameters are 1-4 times the diameter of the nozzle. This presents several difficulties as the desired sphere size decreases. One problem is that fabrication of the nozzles themselves becomes more difficult as size decreases. This is especially true for large-scale fabrication methods in which it is necessary to form droplets through arrays of nozzles (perhaps 1000-2000). A second limitation stems from the pressure needed to pump fluids through small nozzles. The pressure required is given by

$$\Delta P = \frac{8\mu L Q}{\pi R^4}$$

-5-

where Δp is the pressure drop across the nozzle, μ is the viscosity of the fluid, L is the length of the nozzle "passage", Q is the volumetric flow rate of the fluid passing through the nozzle, and R is the radius of the nozzle opening. Thus, the pressure required scales with R^{-4} . If one wishes to make microdroplets of $\sim 5 \mu\text{m}$ diameter, traditional methods may require a nozzle with a diameter of $5 \mu\text{m}$ or less. For example, at a flow rate of 1 mL/min and a fluid viscosity of 100 centipoise (100 -times more viscous than water), a $5\text{-}\mu\text{m}$ diameter orifice would require a pump head of $\sim 1.1 \times 10^{10} \text{ Pa}$ ($\sim 110,000 \text{ atm}$). This is clearly an impossibly high pressure. Even water, $\mu \sim 1 \text{ cp}$, requires a pressure of $1,100 \text{ atm}$ to be pumped through a $5\text{-}\mu\text{m}$ diameter nozzle at 1 mL/min . Thus, pumping virtually any liquid through a nozzle of $5\text{-}\mu\text{m}$ diameter would require special equipment, if it could be done at all.

Another problem with traditional methods of forming small spheres is that some compounds to be encapsulated, such as plasmid DNA, may be damaged by shear forces. Damage depends on the product of the shear rate, γ , and the time spent in the shear field, θ . The average value of this product for a fluid flowing through a pipe is given by

$$(\gamma\theta)_{\text{avg}} = 16/3 \cdot (L/D)$$

where L is the length of the pipe and D is the pipe diameter. The orifice of a nozzle can be approximated as a pipe. However, entrance effects will tend to increase the shear rate meaning this equation will give a low estimate. Regardless, the value of $\gamma\theta$ is approximately inversely proportional to the diameter of the orifice. Thus, decreasing the nozzle diameter from 100 to $5 \mu\text{m}$ would increase the damage done to any encapsulated compound by a factor of 20 .

U.S. Patent No. 6,116,516 describes stabilized capillary microjets, that produce aerosols. The microjets are formed by forcing a gas around a liquid

stream. Under the correct conditions, micron-sized aerosols are produced, where preferably 90% or more have the same diameter plus/minus 3% to 30%.

BRIEF SUMMARY

It is an object of this invention to produce micro-and nano-sized spherical particles by pumping material through a small orifice and then shaking said liquid with an acoustic type-wave.

It is also an object of this invention to produce micro-and nano-sized spherical particles by pumping a material through a small orifice and adding an additional downward force, said downward force comprising either electrohydrodynamic technique or a second liquid stream adjacent and parallel to the liquid at a velocity greater than the first liquid. It is also an object of this invention to produce uniform micro-and nano-sized spherical particles by using acoustic type waves with the above process.

It is a further object of this invention to produce hollow micro-and nano-sized spherical particles by utilizing an inside and outside liquid that are passed through one or the other of two coaxially mounted nozzles to produce a smooth cylindrical jet of the outside liquid coaxially containing the inside liquid (or gas). This jet can be further broken into uniform droplets by acoustic waves.

It is yet a further object of this invention to provide a novel process for hardening micro-and nano-spheres by utilizing any of the above processes for producing micro-and nano-spheres, wherein the nozzle or orifice utilized is placed beneath the surface of an aqueous bath, to allow hardening of the spheres with a minimum of deformation.

It is still a further object of this invention to produce therapeutic compounds, encapsulated by any of the above techniques useful as biomedical compositions for medical treatment of humans and therapeutic value.

It is yet another object of this invention to produce multi-shelled micro-and nano-spheres of controlled sizes, shell thicknesses and number of shells with different shells comprising different materials useful for biomedical applications for humans and animals including controlled-release drug delivery systems.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-7-

It is still a further object of this invention to produce micro- and nano-spheres of the types described above, and other types, for biomedical applications including passive or active targeting to desired cells, tissues or regions of the body.

It is a further object of this invention to provide an apparatus and process for producing micro- and nano-spherical particles of precisely controlled sizes and size distributions for biomedical applications, especially controlled-release drug delivery systems.

It is a further object of this invention to produce stable micro- and nano-spheres of a desired size, chemical composition and stoichiometry.

It is a further object of this invention to produce micro- and nano-spheres of controlled sizes for biomedical applications including controlled-release drug delivery systems.

It is yet a further object of this invention to produce hollow micro- and nano-spheres of controlled sizes for biomedical applications including controlled-release drug delivery systems.

These and other objects are provided in this invention which is described in more detail hereafter.

In a first aspect, the present invention is a method of forming particles, comprising accelerating a first stream comprising a first liquid; and vibrating the first stream, to form particles.

In a second aspect, the present invention is a method of forming particles, comprising accelerating a first stream comprising a first liquid. The accelerating comprises applying charge to the first stream. The particles comprise a core and a shell.

In a third aspect, the present invention is particles having an average diameter of 50 to 100 μm . Ninety percent of the particles have a diameter that is within 2% of an average diameter of the particles.

In a fourth aspect, the present invention is particles having an average diameter of 1 to 50 μm . Ninety percent of the particles have a diameter that is within 1 μm of an average diameter of the particles.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-8-

In a fifth aspect, the present invention is particles, prepared by the above method.

In a sixth aspect, the present invention is an apparatus for forming particles, comprising (i) a first nozzle, for forming a first stream of a first liquid, (ii) a second nozzle, oriented for forming a second stream of a second liquid in contact with the first stream, and (iii) a vibrator, for forming particles from the first stream.

In a seventh aspect, the present invention is an apparatus for forming particles, comprising (i) a first nozzle, for forming a first stream of a first liquid, (ii) a charge source, for applying charge to the first stream, and (iii) a vibrator, for forming particles from the first stream.

In an eighth aspect, the present invention is an apparatus for forming particles, comprising (i) means for forming a first stream of a first liquid, (ii) means for accelerating the first stream, and (iii) means for vibrating the first stream.

In a ninth aspect, the present invention is an apparatus for forming particles, comprising (i) a first nozzle, for forming a first stream of a first liquid, (ii) a second nozzle surrounding the first nozzle, for forming a second stream of a second liquid surrounding the first stream, (iii) a charge source, for applying charge to at least one of the first and second streams.

In a tenth aspect, the present invention is a method of making particles, comprising forming particles with the above apparatuses.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 displays free-falling spheres illuminated with a strobe lamp and the images were captured on videotape using a 10x microscope objective and a CCD camera.

Figure 2 illustrates the homogeneity of sphere diameters within a single preparation from 15-500 μm .

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-9-

Figures 3A and B show the size distribution of sphere populations measured using a COULTER multisizer.

Figure 3C demonstrates the ability to manipulate size distributions by instantaneously changing the flow rate and acoustic frequency.

Figure 3D demonstrates the ability to generate continuously varying size distributions.

Figure 4 demonstrates that the electrohydrodynamic apparatus reduces the size of PLGA/ethyl acetate particles.

Figure 4D demonstrates application of an increasing potential to the nozzle.

Figures 5A and B demonstrate the small sphere size obtainable even with crude, non-optimized apparatus.

Figures 5C and D demonstrate collected smaller spheres from 3 μm down.

Figure 6 demonstrates the ability to encapsulate drugs within the polymer microspheres using a model compound, rhodamine B, via fluorescence microscopy.

Figure 6 also demonstrates the rhodamine B release from spheres over the course of 7-10 days of incubation in PBS and 37°C. The release rate was faster when spheres contained more drug as would be expected.

Figure 7 illustrates an embodiment of an apparatus of the present invention.

Figure 8 illustrates another embodiment of an apparatus of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention relates to a process wherein micro-and nano-sized particles, preferably spherical, are produced by pumping material through a small orifice and then shaking said liquid with an acoustic type-wave, where the velocity of the fluid is increased beyond the velocity produced by pressure behind the liquid. The nozzle diameter may be larger than the particles produced. For example, 5- μm droplets can be prepared from a much larger nozzle, for example a nozzle of 100 μm diameter. The particles are formed within a surrounding liquid, helping to prevent deformation.

The pressures needed to form very small particles are greatly reduced with the present invention. For example, a 100-cp solution pumped through a 100- μ m diameter nozzle at 1 mL/min would require a pump pressure of only ~68,000 Pa (~0.67 atm), or a solution as viscous as glycerin (μ ~500 cp) can be pumped through a 100- μ m diameter nozzle at 5 mL/min with a pump head of 15 atm. These pressures are easily obtained with commercial high-pressure pumps such as those commonly supplied with high-pressure liquid chromatography systems. Furthermore, the shear forces are greatly reduced for a given particles size, and the difficulties encountered with very small diameter nozzles are also eliminated. Aspects of the invention are described in "Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions" J. Controlled Release 73(1):59-74 (May 18, 2001), hereby incorporated by reference.

The present invention also relates to a process wherein micro-and nano-sized spherical particles are produced by pumping a material through a small orifice and adding an additional downward force, said downward force comprising either electrohydrodynamic technique or a second liquid stream adjacent and parallel to the liquid at a velocity greater than the first liquid. Acoustic type waves can also be utilized with the above process. As used herein, the term "particle" includes both liquid particle (droplets) and solid particles.

The present invention further relates to a process for producing hollow micro-and nano-sized spherical particles wherein an inside and outside liquid are passed through one or the other of two coaxially mounted nozzles to produce a smooth cylindrical jet of the outside liquid coaxially containing the inside liquid (or gas). This jet can be further broken into uniform droplets by acoustic waves.

The present invention further provides a novel process for hardening micro-and nano-spheres wherein the nozzle or orifice utilized to produce said spheres is placed beneath the surface of an aqueous bath, to allow hardening of the spheres with a minimum of deformation.

This invention still further provides therapeutic compounds, encapsulated by any of the above techniques useful as biomedical compositions.

One embodiment of the present invention employs "Electrohydrodynamic Spraying" and "Dual-nozzle Method" independently or in combination to produce very small uniform solid, hollow or multi-shell spheres. The incorporation of electrohydrodynamic spraying to enable fabrication of hollow and multi-shell micro-and nano-spheres is new. This technique is novel and very useful in that it is particularly suited to fabricating micrometer-and nanometer-size hollow and multi-shell spheres which would be essentially impossible to create with any other existing techniques. Further, encapsulation of therapeutic compounds in very uniform spheres, and especially in hollow and multi-shelled spheres, is novel and very useful for controlled-release and targeted drug delivery with precisely controlled release rates which can not be obtained using spheres fabricated by other existing techniques.

The apparatus and method of this invention allow for the encapsulation of a first material in a spherical shell of a second material which will be particularly useful for various biomedical applications.

The apparatus and method of this invention also allows for the production of solid spheres of only the second material by blocking the supply of the first material through the inner nozzle.

Another unique and novel aspect of this invention is that this approach can be utilized to choose the electrical polarity (neutral, positive or negative) of the resulting micro-and nano-spheres.

This concept can be extended to fabricate multi-shell spheres comprising more than two kinds of materials. The fact that the invention allows one to produce very small multi-shell spheres smaller than 50 or 100 μm in diameter makes it particularly useful in applications involving drug delivery systems (DDS). Numerous applications other than the DDS should also be possible.

The instant invention also provides for solid or hollow uniform micro-and nano-spheres of controlled sizes, shell thicknesses, electrical charges, chemical compositions and stoichiometries. Such spheres have many unique applications in the biomedical field.

The instant invention relates to a process for making micro-and nano-sized spherical particles comprising pumping a material through a small orifice and then shaking said liquid with an acoustic type-wave to produce micro-and nano-sized spherical particles.

The instant invention further relates to a process for making micro-and nano-sized spherical particles comprising pumping a material through a small orifice and adding an additional downward force to said liquid to pull the liquid through the orifice. The additional downward force can be an electrohydrodynamic technique or a second liquid stream, adjacent and parallel to the liquid, at a velocity greater than the sphere forming liquid. These processes can be further modified by the addition of acoustic type waves.

The instant invention further relates to a process for making hollow micro-and nano-sized spherical particles comprising an inside and outside liquid, wherein the inside and outside liquid are passed through one or the other of two coaxially mounted nozzles, wherein a smooth cylindrical jet is generated of the outside liquid coaxially containing the inside liquid (or gas) inside of said outside liquid. This jet can be broken into uniform droplets by acoustic waves. The size and ratio between the radius and thickness of the hollow spheres is controlled by varying the relative flow rates of the outer and inner liquids, the relative sizes of the nozzles, the relative positioning of the nozzles, and the amplitude and frequency of the acoustic excitation.

This method further facilitates fabrication of hollow spheres of large ratios between the radius and thickness of the hollow spheres since the surface tension of the bath liquid helps retain the spherical shape and integrity of the hollow spheres.

The instant invention further relates to a process for hardening micro-and nano-spheres by utilizing any of the above processes for producing micro-and nano-spheres, wherein the nozzle or orifice utilized is placed beneath the surface of an aqueous bath, to allow hardening of the spheres with a minimum of deformation. Any of the above nozzle types work with this embodiment of the invention.

This invention further relates to therapeutic compounds, encapsulated by any of the above techniques given to humans for medical treatment.

The instant invention relates to a process for the production of micro and nano-spheres comprising the use of the dual nozzle system and the electrohydrodynamic concept to produce micro and nano-sized spherical particles.

This invention further relates to the use of a very sharp hypodermic type needle in the inner nozzle of the dual nozzle system, to produce solid, hollow and multi-shell micro- and nano-sized particles useful as semi-conductors and biomedical applications.

This invention further relates to novel biomedical compositions comprising uniform solid, hollow and multi-shell micro- and nano-sized particles, hollow and filled.

In this application the terms spheres, beads and particles are used interchangeably to describe the micro-and nano-spheres of the instant invention. Also, the term "hollow" is used to indicate that the core is empty or contains a gas. The term "multi-shell" includes particles wherein the core is a liquid (aqueous, oil, etc...) or a solid such as another polymer. Although the terms "hollow" and "multi-shell" are utilized differently in the instant application, these terms should be read as including the other.

A need exists in the biomedical industry for the production of micro-and nano-sized spheres. The ability to form spheres with precisely controlled sizes, size distributions and morphologies (e.g. hollow, multi-shelled, solid, porous, etc.) has several very important applications, especially in the field of biotechnology. This methodology will allow and/or significantly improve upon many drug delivery technologies.

One embodiment of this invention relates to an apparatus and process for producing solid, hollow and multi-shell, micro-and nano-particles of precisely controlled sizes, size distributions and morphologies for biomedical applications, especially controlled-release drug delivery systems. This invention also relates to novel micro-and nano-spheres, comprising a first material. This invention further

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-14-

relates to novel hollow micro-and nano-spheres of a first material encapsulating a second material.

Another embodiment of this invention relates to an apparatus and process for producing micro-and nano-particles of precisely controlled sizes, size distributions and morphologies for biomedical applications, especially controlled-release drug delivery systems.

An embodiment of this invention allows for particle or sphere formation by pumping a liquid material (e.g., polymer dissolved in organic solvent, polymer melts, etc.) through a small orifice wherein the small orifice can be from several millimeters to about 1 micrometer in diameter. The orifice can even be as small as 500 nm in diameter. The stream of liquid exiting the orifice is broken into droplets by vibrating or shaking the device at a controlled frequency and amplitude.

The vibration or shaking can be achieved by, for example, a piezoelectric transducer driven by a wave generator. It is believed that the mechanical excitation launches a wave of acoustic energy along the liquid jet generating periodic instabilities that, in turn, break the stream into a train of uniform droplets.

Droplet size is determined by the orifice diameter, the solution flow rate, the vibration frequency and amplitude. Thus, by varying these four parameters droplet size can be controlled. Furthermore, given an apparatus with a fixed orifice, droplet size can be varied within a range from a minimum size slightly larger than the orifice opening to a maximum at least 10-times the orifice opening.

This approach represents an improvement over conventional ultrasonic nozzles as the acoustic wave intensity is lower and one can tightly control the match between the frequency and solution flow rate.

In yet another embodiment of this invention, sphere size can be further controlled by employing an additional downward force that will 'pull' the liquid jet through the orifice, reducing the jet size below the diameter of the orifice. One example is an electrohydrodynamic technique in which electrical forces act to reduce the diameter of the liquid jet and the resulting droplets. The electrohydrodynamic technique is activated through injection of charge of desired

polarity into the liquid by applying a high voltage either to the nozzle or directly into the liquid, for example, with a battery, or with a transformer and a rectifier to convert household current. Outwardly directed electrical tension forces result at the charged liquid meniscus of the nozzle opening, enabling a smaller drop to fall from the nozzle (the "drip mode"). Not to be bound by theory, the reason for this reduction in drop size is believed to be that there are two forces present, gravitational and electrical, that are working together to pull the liquid off of the nozzle, while surface tension forces hold the liquid at the nozzle. As the amount of charge injected increases, the electrical tension forces accordingly increase, eventually dominating the gravitational and surface-tension forces and reducing the drop size. Further increase in charge injection beyond a certain threshold value results in very powerful electrical tension forces that literally pull the liquid out of the nozzle to form a thin charged liquid jet, which in turn breaks up into fairly uniform droplets (known as the "jet mode"). Jet mode changes from single-jet to multi-jet mode as charge injection is further increased.

Another example of an additional downward force employed is a separate liquid stream (typically immiscible) through the orifice, adjacent and parallel to the sphere-forming liquid, at a velocity greater than the sphere-forming liquid. The sphere-forming liquid is pulled along by the drag forces at the liquid/liquid interface. The sphere-forming jet is reduced in diameter by a factor that is proportional to the difference in linear velocities of the two streams.

The technique of this invention can be further modified to generate "hollow" or multi-shell particles comprised of two or more concentric spheres of different materials. Spheres consisting of a polymer shell surrounding a drug-containing aqueous phase, for example, can be generated. Such spheres can be formed using the dual nozzle method which consists of utilizing two coaxially mounted nozzles. By passing the two liquids through one or the other of the nozzles, a smooth cylindrical jet of one liquid coaxially containing another liquid (or gas) inside of it can be generated. The jet can then be broken into uniform droplets using acoustic waves, as described above, resulting in the "hollow" or multi-shell spheres. The size and the ratio between the radius and thickness of the

spheres can be controlled by varying the relative flow rates of the outer and inner fluids, the relative sizes of the nozzles, the relative positioning of the nozzles and the amplitude and frequency of the acoustic excitation.

Another embodiment of this invention allows for the novel hardening of micro- and nano-spheres while allowing the spheres to retain their uniformity. Droplets falling from the apparatus can be hardened to form micro-spheres by any of several standard methods depending on the type of material comprising the spheres. An important consideration is maintaining the uniform size or desired size distribution during sphere collection, hardening (phase inversion) and drying. If the droplets exiting the nozzle are allowed to fall through the air and then enter a liquid bath (often aqueous or liquid nitrogen) where the organic solvent is to be extracted, for example, the impact of the spheres with the liquid surface may deform, or even completely disrupt the sphere morphology. Another embodiment of the instant invention overcomes this inherent problem in the art, wherein the embodiment is a method in which the orifice is placed beneath the surface of an aqueous bath, thus avoiding the impact with the surface. The spheres are subsequently agitated to allow the organic solvent to be efficiently extracted. But the agitation must be gentle; normal stirring speeds cause too much shear force and break the particles, ruining the size distribution. This is believed to be novel since other spraying methods do not utilize a nozzle placed below a liquid/air interface.

In one embodiment the instant invention utilizes electrohydrodynamic spraying in combination with a dual nozzle method to produce very small uniform spheres which are hollow. Micro- and nano-spheres of desired size, chemical composition and stoichiometry can be produced in the most stable manner through this novel process, named flow-limited field injection electrostatic spraying (FFESS). This embodiment combines the basic ideas of hollow sphere fabrication technique and the electrostatic spraying technique. Hollow sphere fabrication technique is disclosed in N.K. Kim, K. Kim, D.A. Payne, and R.S. Upadhye, "Fabrication of hollow silica aerogel spheres by a droplet generation method and sol-gel processing," *J. Vac. Sci., Technol. A.*, vol. 7, no. 3 pp. 1181-1184 (1989)

and K. Kim, K.Y. Jang and R.S. Upadhye, "Hollow silica spheres of controlled size and porosity by sol-gel processing," *J. Am. Ceram. Soc.*, 74:8, pp. 1987-1992, (1991). Electrostatic spraying technique is disclosed in K. Kim and R.J. Turnbull, "Generation of charged drops of insulating liquids by electrostatic spraying," *J. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 5, pp. 1964-1969, May 1976, U.S. Patent No. 5,344,676 to Kim et al., and U.S. Patent No. 6,060,128 to Kim, et al. In this embodiment, the present invention overcomes the above difficulties by incorporating the concept of electrohydrodynamic spraying. Unlike the usual hollow spheres fabrication techniques in which only mechanical forces are utilized to breakup a smooth liquid jet into uniform hollow droplets, this embodiment of the present invention creates charging of the working liquid and utilizes the resulting electrical tension forces to reduce the size of the liquid jet well below the size of the nozzle opening. This, in turn, reduces the size of the droplets that result from breakup of the liquid jet. In this way one can fabricate uniform multi-shell spheres containing different materials that are very small: smaller than 50 μm in diameter. This particular capability of the present invention should enable one to encapsulate nano-meter-size particles inside a spherical shell comprising a chosen material which coincides with the requirements of many sought after biomedical applications involving controlled drug release or drug delivery systems. The ability to control the thickness of and the material comprising the outer spherical shell should also facilitate formulation of a variety of scenarios for the control of drug release dynamics. It must be emphasized that the same method applies to coaxial nozzles containing more than two nozzles allowing for fabrication of small multi-shell spherical particles with two or more layers of different materials.

The particles of the present invention may have a very narrow size distribution. Preferably, at least 90% of the particles have a diameter that is within 2%, more preferably within 1%, of the average particle diameter. Alternatively, preferably at least 95% of the particles have a diameter that is within 10%, more preferably within 5%, even more preferably within 2%, and most preferably within 1%, of the average particle diameter. Alternatively, preferably, at least

95% of the particles have a diameter that is within 10%, more preferably within 5%, even more preferably within 2%, and most preferably within 1%, of the average particle diameter. Alternatively, preferably, at least 98% of the particles have a diameter that is within 10%, more preferably within 5%, even more preferably within 2%, and most preferably within 1%, of the average particle diameter. Alternatively, preferably, at least 99% of the particles have a diameter that is within 10%, more preferably within 5%, even more preferably within 2%, and most preferably within 1%, of the average particle diameter. As used herein, the term "diameter" and "average diameter", in the context of particles, means number average diameter.

Another way to describe a narrow size distribution, preferably with particles have an average diameter of at most 50 μm , more preferably 1 μm to 50 μm , most preferably 1 μm to 30 μm , is by the percent that have a diameter that is within a specific length of the average diameter. Preferably, 90% of the particles have a diameter that is within 1 μm of the average diameter of the particles, more preferably within 0.5 μm of the average diameter of the particles, most preferably with 0.1 μm of the average diameter of the particles. Alternatively, preferably 95% of the particles have a diameter that is within 1 μm of the average diameter of the particles, more preferably within 0.5 μm of the average diameter of the particles, most preferably with 0.1 μm of the average diameter of the particles.

This invention relates to an apparatus and process for producing micro- and nano-particles of precisely controlled sizes and size distributions for biomedical applications, especially controlled-release drug delivery systems. This invention also relates to novel micro- and nano-spheres, comprising a first material. This invention further relates to novel hollow micro- and nano-spheres of a first material encapsulating a second material.

This invention relates to an apparatus and process for producing micro- and nano-particles of precisely controlled sizes and size distributions for biomedical applications, especially controlled-release drug delivery systems.

This invention further relates to the use of a very sharp hypodermic type needle in the inner nozzle of the dual nozzle system, to produce solid, hollow and multi-shell micro- and nano-sized particles useful as semi-conductors and biomedical applications.

Illustratively, particle or sphere formation is accomplished by pumping a liquid material (e.g., polymer dissolved in organic solvent, polymer melts, etc.) through a small orifice (several millimeters to 10 micrometers in diameter). The stream of liquid exiting the orifice is broken into droplets by vibrating or shaking the device at a controlled frequency and amplitude.

The vibration or shaking can be achieved by, for example, a piezoelectric transducer driven by a wave generator. It is believed that the mechanical excitation launches a wave of acoustic energy along the liquid jet generating periodic instabilities that, in turn, break the stream into a train of droplets.

Yet another embodiment of this invention relates to therapeutic compounds. Therapeutic compounds (e.g. peptides, proteins, nucleic acids, polysaccharides, lipids, steroids and organic and inorganic pharmaceutical compounds and the like) can be encapsulated in the spheres by a variety of techniques. Compounds that are soluble in the liquid phase can simply be dissolved. Non-soluble materials can be suspended in the liquid in the form of small particles. Alternatively, non-soluble materials can be dissolved in an immiscible phase and emulsified with the sphere-forming liquid prior to droplet formation. For example, a protein can be dissolved in an aqueous buffer solution while a polymer (the sphere-forming material) can be dissolved in an organic solvent such as methylene chloride or ethyl acetate. The aqueous and organic solutions can be mixed and homogenized to form a water-in-oil emulsion that subsequently becomes the droplet-forming liquid.

An embodiment of this invention utilizes the biodegradable polymer poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA). PLGA is a well-studied polymer for drug delivery and is FDA-approved for a number of *in vivo* applications. The techniques can, however, be generalized to other materials including

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-20-

poly(orthoesters), poly(anhydrides), poly(phosphoesters), poly(phosphazenes) and others.

Nonlimiting examples of orifices useful for the practice of this invention consist of tapered nozzles, capillary tubes, simple holes in a flat plate, or even an array of multiple orifices of any of these types.

Nonlimiting examples of materials useful for particle formation include polyesters (such as poly(lactic acid), poly(glycolic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid)), poly(lactic acid-co-lysine), poly(lactic acid-graft-lysine), polyanhydrides (such as poly(fatty acid dimer), poly(fumaric acid), poly(sebacic acid), poly(carboxyphenoxy propane), poly(carboxyphenoxy hexane), copolymers of these monomers and the like), poly(anhydride-co-imides), poly(amides), poly(ortho esters), poly(iminocarbonates), poly(urethanes), poly(organophosphazenes), poly(phosphates), poly(ethylene vinyl acetate) and other acyl substituted cellulose acetates and derivatives thereof, poly(ϵ -caprolactone), poly(carbonates), poly(amino acids), poly(acrylates), polyacetals, poly(cyanoacrylates), poly(styrenes), poly(vinyl chloride), poly(vinyl fluoride), poly(vinyl imidazole), chlorosulfonated polyolefins, polyethylene oxide and copolymers and blends thereof.

For applications outside of drug delivery, spheres can be made of virtually any material from polymers (e.g., polystyrene) to metals to inorganics (silica) to cryogenics (frozen hydrogen) so long as the starting precursors are in a liquid phase or solution.

Spheres which can be generated by the instant invention range from about one nanometer to about one millimeter. For drug delivery applications, sizes from about 10 nm to about 100 microns are possible. The term sphere or spheres, as used throughout the application, is not limited to particles having an aspect ratio of 1, but rather includes particles which deviate significantly from perfect spheres. Preferably the particles have an aspect ratio of 1 to 10, more preferably 1 to 2.

The term nano- defines a size in the range of from about 1 to about 1000 nanometers. The term micro- defines a size in the range of from about 1 to about 1000 microns.

The outer shell thickness of a two component bead could be from about 99% of the bead radius to about 1% of the bead radius depending on the application. However, a minimum achievable thickness of the outer shell will depend on the total size of the hollow bead and the properties of the material comprising it. The absolute minimum thickness achievable should be greater than that of a few molecular layers.

The spheres of this invention have many possible biomedical uses.

Passive targeting of phagocytosis. Cells of the immune system, especially macrophages and dendrocytes, are targets for immunization. These "professional" antigen-presenting cells (APCs) can elicit a desired T-cell response to vaccine components. APCs are typically capable of phagocytosis of particles in the range of 1 to 10 μm ; most other types of cells in the body cannot internalize such large particles. By generating in this size range particles containing vaccine components, one can passively target delivery of the vaccine to APCs. Current technologies allow formation of particles of this size, but only with significantly broad size distributions. Our methodology allows generation of vaccine-encapsulating microspheres in which essentially 100% of the spheres are of the desired size. APC targeting can be optimized with no waste of expensive vaccine components in spheres that are too large or too small.

Capillary embolization. Blood vessel size varies throughout the body with the smallest vessels being the capillaries. Tumor tissues typically exhibit particularly tortuous capillary beds that feed the rapidly growing cancer cells. One approach to targeting tumor tissues is to deliver a therapeutic encapsulated in microspheres of a size such that they can become lodged in narrow capillaries. The microspheres are then injected into an artery feeding the tumor. Spheres which are too large will become lodged in larger vessels and the therapeutic may be blocked from reaching all of the tumor. Spheres which are too small will pass through the tumor and could deliver the therapeutic to other healthy tissue; a serious problem since many anti-cancer agents are, of course, cytotoxic. Our ability to generate spheres of a precise size will allow us to maximize the number

of spheres lodged in the smallest capillaries and therefore, the amount of therapeutic delivered to the desired location.

Targeting by nano-spheres. Biodegradable polymer spheres less than 1 μm in diameter (nano-particles or nano-spheres) have several specific applications in drug delivery. For example, particles less than 150 nm in diameter can be targeted for receptor-mediated endocytosis by many different types of cells. Nanoparticles are also useful for oral administration wherein the particles can traverse the intestinal epithelium and be taken up by the M-cells and Peyer's patches. Particles that are too large are poorly taken up, particles that are too small contain little therapeutic. Most current methods for biodegradable -polymer nanoparticle formation, of which there are many, result in wide variations in particle size. For example, phase inversion nanoencapsulation, in which polymer and drug are dissolved in a solvent (e.g., methylene chloride) and subsequently poured into a non-solvent phase (e.g., petroleum ether), results in particles of from 100 to 5000 nm. Our ability to control particle size with a maximum variation of a few percent around the average size will allow optimal nanoparticle targeting.

Control of drug release rate from solid microspheres. Many controlled-release drug delivery systems consist of microspheres formed from biodegradable polymers. Therapeutic compounds encapsulated in the microspheres are released as the polymer erodes, most often by hydrolysis, in the aqueous environment within the body. The drug release rate depends on several factors including polymer composition, polymer molecular weight, microsphere porosity, etc. A critical parameter, however, is sphere size. In general, smaller spheres with larger surface area/volume erode and release the therapeutic more quickly than larger spheres.

The ability to precisely control sphere size distribution gives us unprecedented control over drug release rates. By varying liquid flow rate, vibration frequency and amplitude, sphere size can be controlled. Furthermore, by continuously and smoothly varying these three parameters, pre-defined size distributions can be generated. Since drug release rate depends on sphere size

distribution, an appropriate size distribution that will provide a desired release rate profile (e.g., zero-order release, pulsatile release, etc.) can then be determined.

Fabrication of composite core/shell microparticles. With the multi-nozzle methodology, composite particles of two or more different materials can be fabricated. Core/shell micro-particles for drug delivery have been produced previously, but only with immiscible core and shell phases. In addition, control of sphere size and shell thickness was poor. Fine control of shell thickness and sphere diameter are possible. The two phases could comprise: a gas core within a polymer shell; a drug-containing aqueous core within a polymer shell (the shell could also encapsulate a second or the same compound); a polymer core encapsulating a drug compound within a polymer shell (of the same or different material) encapsulating a second or the same compound. Such particles could produce novel and useful drug-release rate profiles.

Control of drug release rate from microshells. Encapsulation of water-soluble compounds in hydrophobic polymer microspheres typically requires a double-emulsion method in which a drug/aqueous phase is emulsified with a polymer/oil phase. The physical forces necessary for forming the water-in-oil emulsion and contact of the drug with the aqueous/oil interface can be damaging to drug compounds including therapeutic proteins and nucleic acids. Encapsulation in microshells can alleviate this problem as no physical forces are employed and the aqueous/oil interface is greatly reduced in area.

More importantly, microshells present an unprecedented opportunity for controlling drug release rate. Our methodology allows precise control of both the diameter of the sphere and the thickness of the polymer shell. Drug release from biodegradable-polymer microshells, especially those composed of surface-eroding polymers (e.g., polyanhydrides), would be expected to occur in one "burst" once erosion has reduced the shell integrity to some critical minimum. By continuously varying in a particle population the shell thicknesses and the number of microshells of any given shell thickness, virtually any desired drug release rate profile can be generated.

Fabrication of nanoshells. Combination of the electrohydrodynamic and dual-nozzle methodologies will allow fabrication of polymer nanoshells. As above, virtually any compound can be encapsulated in the interior phase of the particle. If DNA (or other nucleic acids) are encapsulated, "artificial virus" particles that may be particularly useful for gene delivery can be produced.

Pharmaceutical compounds which can be encapsulated/released by the instant invention include but are not limited to nucleic acids, proteins and peptides, hormones and steroids, chemotherapeutics, NSAIDs, vaccine components, analgesics, antibiotics, anti-depressants, and the like.

Nucleic acids useful for the practice of this invention include but are not limited to DNA, RNA, peptide-nucleic acids, oligonucleotides, modified to improve stability (e.g., phosphorothioates, aminophosphonates or methylphosphonates).

Proteins and peptides useful for the practice of this invention include but are not limited to human growth hormone, bovine growth hormone, erythropoietin, thrombopoietin, tissue plasminogen activator and derivatives, insulin, monoclonal antibodies (e.g., anti-human epidermal growth factor receptor2 (Herceptin), anti-CD20 (Rituximab), anti-CD 18, anti-vascular endothelial growth factor, anti-IgE, anti-CD 11a) and their derivatives, single-chain antibody fragments, human deoxyribonuclease I (dornase alfa, Pulmozyme), type-1 interferon, granulocyte colony-stimulating factor, leutenizing hormone releasing hormone inhibitor peptides, leuprolide acetate, endostatin, angiostatin, porcine factor VIII clotting factor, interferon alfacon-1, pancrelipase (pancreatic enzymes) and the like.

Hormones and steroids (corticosteroids) useful for the practice of this invention include but are not limited to norethindrone acetate, ethinyl estradiol, progesterone, estrogen, testosterone, prednisone and the like.

Chemotherapeutics useful for the practice of this invention include but are not limited to taxol (Paclitaxel), vinblastine, cisplatin, carboplatin, tamoxifen and the like.

NSAIDs useful for the practice of this invention include but are not limited to piroxicam and the like.

Vaccine components useful for the practice of this invention include but are not limited to Hepatitis B, polio, measles, mumps, rubella, HIV, hepatitis A (e.g., Havrix) and the like.

Analgesics useful for the practice of this invention include but are not limited to aspirin, acetaminophen, ibuprofen, naproxen sodium and the like.

Antibiotics useful for the practice of this invention include but are not limited to amoxicillin, penicillin, sulfa drugs, erythromycin, streptomycin, tetracycline, clarithromycin, ciprofloxacin, terconazole, azithromycin and the like.

Anti-depressants useful for the practice of this invention include but are not limited to Zoloft, fluoxetine (Prozac), paroxetine (Paxil), citalopram, venlafaxine, fluvoxamine maleate, imipramine hydrochloride, lithium, nefazodone and the like.

Other biopharmaceutical compounds useful for the practice of the instant invention include but are not limited to sildenafil (Viagra), acyclovir, gancyclovir, fexofenidine, celecoxib (Celebrex), rofecoxib (Vioxx), androstenedione, chloroquine, diphenhydramine HCl, buspirone, doxazosin mesylate, loratadine, clomiphene, zinc gluconate, zinc acetate, hydrocortisone, warfarin, indinavir sulfate, lidocaine, novocaine, estradiol, norethindrone acetate, Medroxyprogesterone, dexfenfluramine, Dextroamphetamine, Doxycycline, thalidomide, fluticasone, fludarabine phosphate, etanercept, metformin hydrochloride, hyaluronate, tetrazocin hydrochloride, loperamide, ibogaine, clonazepam, ketamine, lamivudine (3TC), isotretinoin, nicotine, mefloquine, levofloxacin, atorvastatin (Lipitor), miconazole nitrate (Monistat), ritonavir, famotidine, simvastatin (Zocor), sibutramine HCl monohydrate, ofloxacin, lansoprazole, raloxifene (Evista), zanamivir (Relenza), oseltamivir phosphate, 4-phenylbutyric acid sodium salt, chlorpromazine, nevirapine, zidovudine, cetirizine hydrochloride (Zyrtec) and the like.

Materials which can further be utilized for the practice of this invention can be found in *Physician's Desk Reference 2000*, 54th Edition, ISBN: 1563633302,

AHFS 99 Drug Information, Amer. Soc. of Health System, ISBN: 1879907917 and U.S. Patent No. 5,019,400 all incorporated herein by reference in their entirety.

The spheres of the instant invention can have other materials incorporated therein. Materials which can be incorporated into the spheres of the instant invention are selected from the group consisting of salts, metals, sugars, surface active agents, acids, bases, stabilizers and release enhancing agents.

The spheres of this invention can comprise materials incorporated (such as polymers, biopharmaceutical compounds and other ingredients) into the outer shell, into the core, in each shell individually or at various levels of the concentric shells.

An embodiment of this invention comprises a heterogenous mixture of the selected polymer(s) and pharmaceutical compound(s).

One aspect of this invention is an apparatus that will allow practicing of the present invention. The apparatus comprises coaxial multi-nozzle systems connected to appropriate instruments for the control of flow rates of the feed materials, injection charge, and temperature, and for visual characterization of the resulting hollow or multi-layered drops, all of which are in turn controlled by a computer. This apparatus can be controlled by a computer which optimizes processing conditions most suitable for fabricating certain spheres of particular interest and would allow the instruments to produce the multi-shell spheres desired. Such a system can be developed as a complete experimental apparatus for fabricating multi-shell spheres of controlled size, shell thicknesses, chemical composition and stoichiometry. Or such a system may be operated at a central facility to produce spheres that can meet the desired requirements of certain outside users.

An embodiment of an apparatus of the present invention is illustrated in Figure 7. The apparatus **10** includes a nozzle **12** through which the solution **20** passes, forming a jet **14**. A carrier stream **18** of a non-solvent liquid flows around the jet, increasing the velocity of the jet. Vibrations are induced to breakup the jet into particles, in this case using a piezoelectric transducer **16** driven by a

frequency generator 24 through an amplifier 22. The particles may be collected in a collection flask 26.

Another embodiment of an apparatus of the present invention is illustrated in Figure 8. The apparatus 28 includes a nozzle 12 through which the solution 20 passes (the jet is not illustrated). The nozzle is within a carrier liquid 30 held within a collection flask 26. A charge source 32 is attached to the nozzle to charge the exiting jet, increasing its velocity. Alternatively, a sharp needle may be attached to the charge source, and inserted into the liquid, to charge the exiting jet; in the case of multiple nozzles (and multiple liquids), the needle may be placed in the most responsive liquid. A ground plate may be included at the collection site. Preferably, vibrations are also induced in the jet, to control the breakup of the jet into particles.

EXAMPLES

The examples herein are illustrations of various embodiments of this invention and are not intended to limit it in any way.

Example 1 - Fabrication of uniform solid PLGA microspheres

PLGA was dissolved in ethyl acetate (50 mg/ml) and the solution was pumped through a 60- μ m orifice at varying flow rates from 2-3 ml/min. Simultaneously, the acoustic excitation frequency was varied from 14 to 70 kHz. The free-falling spheres were illuminated with a strobe lamp and the images were captured on videotape using a 10x microscope objective and a CCD camera. As shown in Figure 1, spheres that are homogenous in size from 65 to 120 μ m have been fabricated (note that the minimum sphere size is only slightly larger than the orifice diameter). The sphere size increased with increasing polymer solution flow rate and decreasing ultrasound frequency.

Uniform spheres have been formed over a wide range, from 15-500 μ m, using the same technique, but varying the orifice diameter, polymer solution flow rates and ultrasound frequency. The microspheres were hardened by solvent extraction/evaporation in an aqueous solution of 1% poly(vinyl alcohol). Aliquots

of the microsphere suspension were placed on a microscope cover slip and imaged by light microscopy. The representative images shown in Figure 2 illustrate the homogeneity of sphere diameters within a single preparation and the size range over which microspheres are obtained using this simple apparatus. The microspheres spontaneously assembled into hexagonal close-packed arrays; the hexagonal pattern and size uniformity extended over the entire sample on the cover slip.

The size distribution of the sphere populations was measured using a COULTER multisizer (BECKMAN INSTRUMENTS). As shown in Figures 3A and B, the distributions are very narrow. The peak width is similar to that of the commercial size standard used to calibrate the instrument. Figure 3C demonstrates the ability to manipulate size distributions by instantaneously stepping up the flow rate and shifting down the acoustic frequency mid-way through the experiment, causing the particle diameter to shift from 73 to 82 μm . To generate the distribution shown in Figure 3D, the flow rates were manually increased and the acoustic frequency decreased, maintaining each set of conditions for decreasing times. Because the parameters were varied manually, the distribution is not smooth, but it nevertheless shows that pre-defined microsphere size distributions, can in fact be generate.

Example 2 – Preparing PLGA of smaller sphere size

The minimum sphere diameter obtainable with this basic technique is governed by the size of the nozzle. Decreasing the orifice size beyond $\sim 30 \mu\text{m}$ is problematic for several reasons. First, reproducible fabrication of the nozzles, by pulling capillaries for example, is increasingly difficult as the size decreases. Second, very small nozzles are easily clogged by aggregated polymer or foreign dust particles, and careful washing of all equipment and filtering of solutions is required. These are simply technical problems that could be overcome with careful engineering of the system. A confounding problem, however, is that passing the viscous polymer solutions through the small orifices becomes increasingly difficult and generates larger shear forces as the orifice diameter is

decreased. Thus, the electrohydrodynamic spraying technique has been explored to produce microspheres less than about 30 μm in diameter.

The electrohydrodynamic apparatus reduces the size of PLGA particles. In these preliminary experiments, a PLGA/acetone solution was passed through an 800 μm nozzle. As shown in Figure 4A, in the absence of an applied charge, the drops exiting the nozzle were several millimeters in diameter, approximately four times the nozzle diameter. As an increasing potential to the nozzle was applied, however, the drop size quickly decreased, ultimately resulting in PLGA particles of ~ 10 μm diameter (Figures 4B-D). Further increase in the electrical charge generated the "multi-jet mode" of particle spraying in which the polymer solution was ejected in a fine mist and the individual particles were too small to be observed using our existing imaging apparatus.

To demonstrate the small sphere size obtainable even with our crude, non-optimized apparatus, PLGA particles were generated from a smaller (100 μm) glass nozzle using the electrohydrodynamic technique. The particles were collected by two different methods. Spheres ~ 3 -30 μm in diameter were collected by allowing them to fall into a bath of liquid nitrogen, where the spheres froze, and subsequently extracting the solvent in cold ethanol. Spheres of approximately 10 and 5 μm in diameter are illustrated in Figures 5A and B, respectively. Smaller spheres from 3 μm down to 100 nm in diameter were collected, on a silicon EM stub placed beneath the stream and subsequently imaged by SEM (Figures 5C and D). Because the spheres were captured after only minimal drying time during their fall to the stub, the spheres were not individually isolated. Rather, the polymer/solvent droplets tended to aggregate on the silicon surface. The particle size and spherical shape is nevertheless apparent in this image. Most importantly, the spheres are approximately 1 μm in diameter with a significant fraction of spheres in the nanometer range. Furthermore, acoustic excitation was not employed in this experiment, and the resulting spheres are not completely homogeneous. The size distribution nevertheless appears rather uniform. As these spheres were fabricated with a relatively large nozzle and primitive

experimental set-up, there is little doubt that it will be possible to consistently generate submicron spheres using a more refined version of this technique.

Example 3 – Encapsulation of Drugs

Finally, the ability to encapsulate drugs within the polymer microspheres using a model compound, rhodamine B has been demonstrated. The rhodamine B, in its free base form, was dissolved in PLGA/ethyl acetate solutions at theoretical loadings of 1, 3 and 5%(mass drug/mass polymer). Microspheres of uniform 35, 50 and 65 μm diameters were fabricated, hardened and collected using the procedures described in the above examples. The presence of rhodamine had no observable effect on particle uniformity. Encapsulation of rhodamine (~70% efficiency) was confirmed by fluorescence microscopy (Figure 6, right). The rhodamine B is released from the spheres over the course of 7-10 days of incubation in PBS and 37°C. The release rate was faster when spheres were smaller (not shown) or contained more drug (Figure 6, left) as would be expected.

Example 4 – Fabrication of PLG polymer shells containing an oil core

A dual nozzle system having an inner nozzle (100 μm orifice) carrying a core material and an "outer" nozzle (250 μm orifice) carrying a shell material was oriented inside a third nozzle generating a stream of non-solvent for the acceleration of the core/shell stream. In this case, canola oil was pumped through the inner nozzle. PLG was dissolved in methylene chloride (50 mg/mL) and pumped through the "outer" nozzle carrying shell material. A small amount of rhodamine B (~1%) was dissolved in the PLG phase in some instances for imaging the shell of the particles and to demonstrate the ability to encapsulate a model drug. A solution of 1% (wt/wt) PVA in water flowed from the third nozzle around the core/shell stream to narrow this stream and to facilitate the entry of the resulting particles into an aqueous, non-solvent bath for methylene chloride extraction and particle hardening. The nozzle was acoustically excited at various frequencies depending on the particle size desired (0-50 kHz).

Overall particle size, shell thickness and core radius were manipulated independently. By varying the velocity of the 1% PVA stream, the overall diameter of individual particles was adjusted. Increasing the velocity of the 1% PVA stream causes an acceleration of the core and shell streams resulting in a decrease in overall particle size. Further adjustment of overall particle size was possible by changing the acoustic excitation frequency as described in Example 1, and both parameters (namely, the velocity of the 1% PVA stream and the acoustic excitation frequency) were adjusted to achieve a desired particle size. Also, by careful adjustment of the oil (core) and PLG (shell) stream flow rates, particles having various core radii or shell thickness were obtained. Changing the PLG stream flow rate produced shells having a consistent core radius and varying, controlled shell thickness. Changing the oil stream flow rate while holding other parameters constant produced shells having a consistent shell volume and a controlled core radius. In this way, it is possible to fabricate core/shell particles exhibiting controllable and well defined overall size and ratio of shell thickness to core radius. In this case, by modulating the relative flow rates of the streams as well as the acoustic excitation frequency, uniform particles were produced ranging from 20 to 70 μm in diameter having a controlled and uniform shell thickness over a range of 3 to 35 μm .

Particle size distribution and aspect ratio were verified by optical microscopy and by fluorescent detection of the encapsulated rhodamine B. Size distributions were found to be comparable to distributions obtained when producing solid particles (Figure 3). Also, particles had a consistent and uniform shell thickness and core radius across a given sample as verified by optical cross-sectioning using confocal fluorescence microscopy.

Thus, it is apparent that there has been provided, in accordance with the instant invention, a process that fully satisfies the objects and advantages set forth herein above. While the invention has been described with respect to various specific examples and embodiments thereof, it is understood that the invention is not limited thereto and many alternatives, modifications and variations will be apparent to those skilled in the art in light of the foregoing description.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-32-

Accordingly, it is intended to embrace all such alternatives, modifications and variations as fall within the spirit and broad scope of the invention.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-33-

CLAIMS

1. A method of forming particles, comprising:
accelerating a first stream comprising a first liquid; and
vibrating the first stream, to form particles.
2. The method of claim 1, further comprising solidifying the particles.
3. The method of claim 1, wherein the particles comprise a core and a shell.
4. The method of claim 3, wherein the particles comprise a plurality of shells.
5. The method of claim 1, wherein the particles comprise a pharmaceutical composition.
6. The method of claim 3, wherein the core comprises a pharmaceutical composition.
7. The method of claim 1, wherein the accelerating comprises contacting the first stream with a second stream, and the second stream comprises a second liquid.
8. The method of claim 7, wherein the second stream surrounds the first stream.
9. The method of claim 1, wherein the accelerating comprises applying charge to the first stream.
10. The method of claim 9, wherein a second stream comprising a second liquid surrounding the first stream, and the accelerating further comprises accelerating the second stream.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-34-

11. The method of claim 10, wherein the particles comprise a core and a shell.
12. The method of claim 11, wherein the particles comprise a plurality of shells.
13. The method of claim 1, further comprising forming the first stream by passing the first liquid through a nozzle.
14. The method of claim 10, wherein the nozzle has a diameter greater than 1/2 an average diameter of the particles.
15. The method of claim 11, wherein the nozzle has a diameter at least the average diameter of the particles.
16. The method of claim 1, wherein the particles have an average diameter of at most 100 μm .
17. The method of claim 1, wherein the particles have an average diameter of at most 50 μm .
18. The method of claim 17, wherein the particles have an average diameter of 10 nm to 50 μm .
19. The method of claim 17, wherein the particles have an average diameter of 1 μm to 50 μm .
20. The method of claim 1, wherein the particles have an average diameter of 50 to 100 μm , and 90% of the particles have a diameter that is within 2% of an average diameter of the particles.
21. The method of claim 1, wherein the particles have an average diameter of 1 to 50 μm , and 90% of the particles have a diameter that is within 1 μm of an average diameter of the particles.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-35-

22. The method of claim 1, wherein the accelerating is a step for accelerating the first stream, and the vibrating is a step for vibrating the first stream.
23. A method of forming particles, comprising:
accelerating a first stream comprising a first liquid;
wherein the accelerating comprises applying charge to the first stream, and
the particles comprise a core and a shell.
24. The method of claim 23, further comprising solidifying the particles.
25. The method of claim 23, wherein the particles comprise a plurality of shells.
26. The method of claim 23, wherein the particles comprise a pharmaceutical composition.
27. The method of claim 23, further comprising forming the first stream by passing the first liquid through a nozzle, and
wherein the nozzle has a diameter at least 1/2 the average diameter of the particles.
28. The method of claim 23, wherein the particles have an average diameter of at most 100 μm .
29. The method of claim 23, wherein the particles have an average diameter of 10 nm to 50 μm .
30. Particles having an average diameter of 50 to 100 μm , wherein 90% of the particles have a diameter that is within 2% of an average diameter of the particles.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-36-

31. The particles of claim 30, wherein 95% of the particles have a diameter that is within 1% of an average diameter of the particles.
32. Particles having an average diameter of 1 to 50 μm , wherein 90% of the particles have a diameter that is within 1 μm of an average diameter of the particles.
33. The particles of claim 32, wherein the particles have an average diameter of 1 μm to 30 μm .
34. The particles of claim 33, wherein the particles have an average diameter of 1 μm to 10 μm .
35. The particles of claim 30, wherein the particles comprise a core and a shell.
36. The particles of claim 35, wherein the particles comprise a plurality of shells.
37. The particles of claim 30, wherein the particles comprise a pharmaceutical composition.
38. The particles of claim 35, wherein the core comprises a pharmaceutical composition.
39. Particles, prepared by the method of claim 20.
40. Particles, prepared by the method of claim 21.
41. An apparatus for forming particles, comprising:
(i) a first nozzle, for forming a first stream of a first liquid,
(ii) a second nozzle, oriented for forming a second stream of a second liquid in contact with the first stream, and
(iii) a vibrator, for forming particles from the first stream.

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-37-

42. The apparatus of claim 41, wherein the second nozzle is coaxial with the first nozzle.
43. The apparatus of claim 41, wherein the vibrator comprises a piezoelectric transducer.
44. The apparatus of claim 41, wherein the first nozzle has a diameter of at least 30 μm .
45. The apparatus of claim 41, wherein the first nozzle has a diameter of at least 100 μm .
46. An apparatus for forming particles, comprising:
- (i) a first nozzle, for forming a first stream of a first liquid,
 - (ii) a charge source, for applying charge to the first stream, and
 - (iii) a vibrator, for forming particles from the first stream.
47. The apparatus of claim 46, wherein the charge source comprises a rectifier and a transformer.
48. The apparatus of claim 46, wherein the vibrator comprises a piezoelectric transducer.
49. The apparatus of claim 46, wherein the first nozzle has a diameter of at least 30 μm .
50. The apparatus of claim 46, wherein the first nozzle has a diameter of at least 100 μm .
51. The apparatus of claim 46, further comprising (iv) a second nozzle surrounding the first nozzle, for forming a second stream of a second liquid surrounding the first stream.
52. An apparatus for forming particles, comprising:
- (i) means for forming a first stream of a first liquid,

WO 02/13786

PCT/US01/25674

-38-

- (ii) means for accelerating the first stream, and
- (iii) means for vibrating the first stream.

53. The apparatus of claim 52, wherein the means for accelerating the first stream is a second nozzle.

54. The apparatus of claim 52, wherein the means for accelerating the first stream is a charge source.

55. An apparatus for forming particles, comprising:

- (i) a first nozzle, for forming a first stream of a first liquid,
- (ii) a second nozzle surrounding the first nozzle, for forming a second stream of a second liquid surrounding the first stream,
- (iii) a charge source, for applying charge to at least one of the first and second streams.

56. The apparatus of claim 55, wherein the charge source comprises a rectifier and a transformer.

57. The apparatus of claim 55, wherein the first nozzle has a diameter of at least 30 μm .

58. The apparatus of claim 55, wherein the first nozzle has a diameter of at least 100 μm .

59. A method of making particles, comprising forming particles with the apparatus of claim 41.

60. A method of making particles, comprising forming particles with the apparatus of claim 46.

61. A method of making particles, comprising forming particles with the apparatus of claim 52.

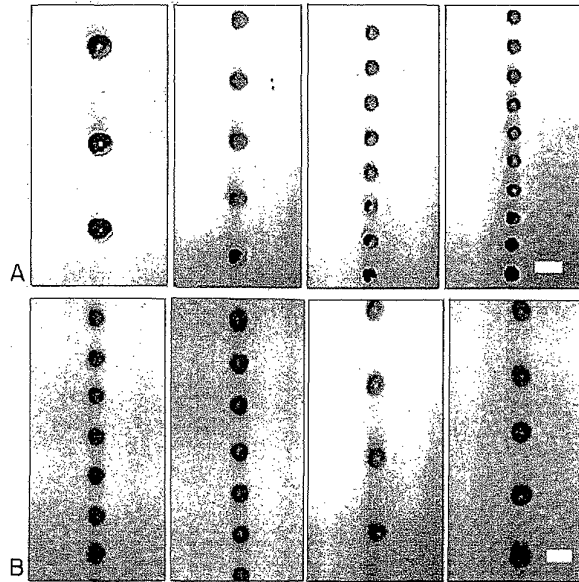
WO 02/13786

PCT/US01/25674

-39-

62. A method of making particles, comprising forming particles with the apparatus of claim 55.

FIG. 1

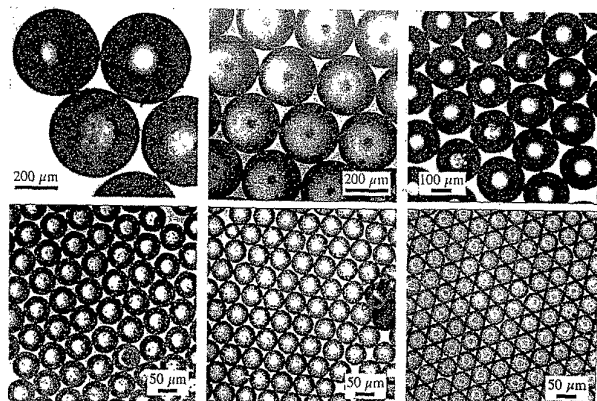


WO 02/13786

PCT/US01/25674

2/7

FIG. 2



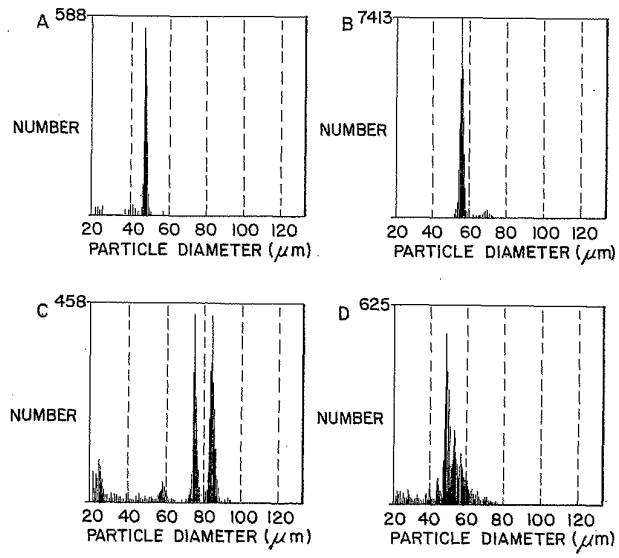
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/13786

PCT/US01/25674

3/7

FIG. 3



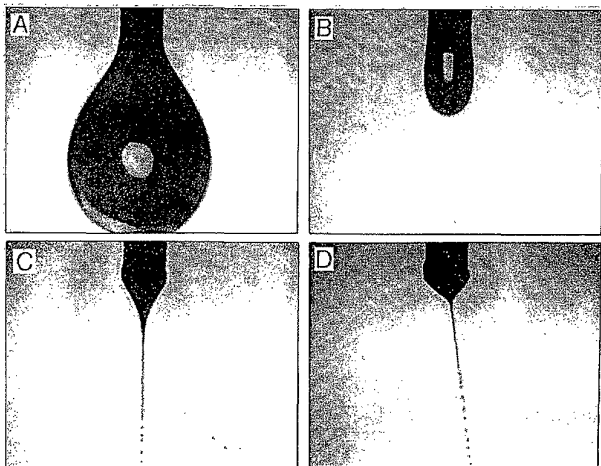
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/13786

PCT/US01/25674

4/7

FIG. 4



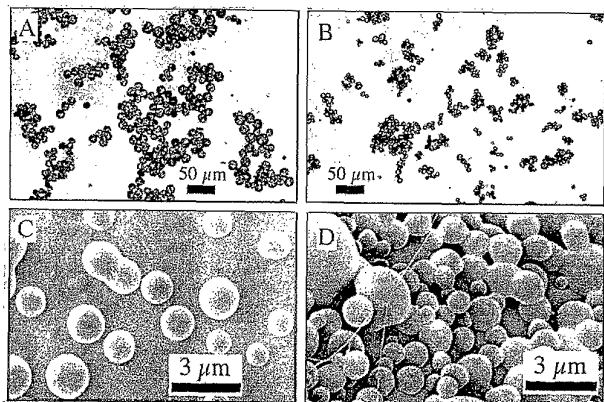
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/13786

PCT/US01/25674

5/7

FIG. 5



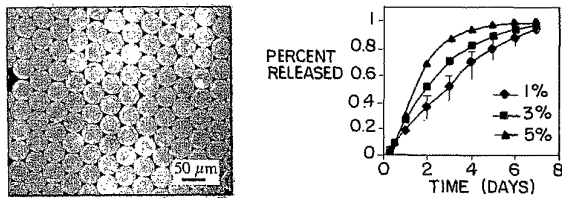
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/13786

PCT/US01/25674

6/7

FIG. 6



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/13786

PCT/US01/25674

FIG. 7

7/7

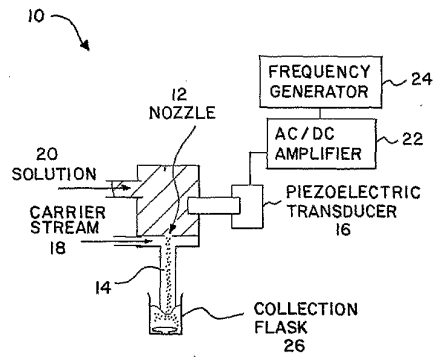
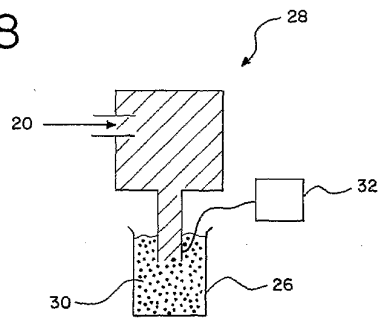


FIG. 8



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/013786 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 9/16, 9/50 (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/25674 (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 15 August 2001 (15.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/225,525 15 August 2000 (15.08.2000) US
60/225,620 15 August 2000 (15.08.2000) US
- (71) Applicant: BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS [US/US]; 352 Henry Administration Building, 506 S. Wright, Urbana, IL 61801 (US).
- Published:
with international search report
- (72) Inventors: KYEKYOON, Kim; 1712 Brighton Court, Champaign, IL 61822 (US). PACK, Daniel, W.; 3105 Goldmedal Drive, Champaign, IL 61822 (US). BERKLAND, Cory, J.; 1001 Country Squire, Urbana, IL 61801 (US).
- (88) Date of publication of the international search report: 28 August 2003
- (74) Agent: RAUCH, Paul, E.; Brinks Hofer Gilson & Lione, P.O. Box 10087, Chicago, 60618 (US).
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/013786 A3

(54) Title: METHOD OF FORMING MICROPARTICLES

(57) Abstract: A method of forming particles comprises accelerating a stream comprising a liquid; and vibrating the stream, to form particles. The particles may have a diameter that is smaller than the diameter of the nozzle used to form the stream, allowing for the formation of micro- and nano-sized particle.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/25674
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/16 A61K9/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 265 924 A (KANEGAFUCHI CHEMICAL IND) 4 May 1988 (1988-05-04) page 4, line 40 - line 51 page 5, line 4 - line 14 page 7, line 31 - line 55 page 9, line 13 - line 20; claims 9,26-28; example 9	1-6,9,16
X	DE 27 25 849 A (HOBEG HOCHTEMPERATURREAKTOR) 21 December 1978 (1978-12-21) page 4, paragraph 1 page 5, last paragraph -page 6, paragraph 2 page 8, last paragraph -page 10, paragraph 3; claims 1,6	1-6,13, 16-19,22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *I* documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 September 2002		Date of mailing of the international search report 30.01.2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office P.O. 5818 Patentkanal NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Martin, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/US 01/25674
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BITTNER B ET AL: "ULTRASONIC ATOMIZATION FOR SPRAY DRYING: A VERSATILE TECHNIQUE FOR THE PREPARATION OF PROTEIN LOADED BIODEGRADABLE MICROSPHERES" JOURNAL OF MICROENCAPSULATION, TAYLOR AND FRANCIS INC. LONDON, GB, vol. 16, no. 3, May 1999 (1999-05), pages 325-341, XP000804804 ISSN: 0265-2048 page 327, paragraph 3 -page 328, paragraph 1; figure 1 page 331, paragraph 1 page 331, paragraph 5 page 332, last paragraph	1-6,13, 16-19,22
X	WO 97 31691 A (SAID SAID ;UNIV KANSAS (US); RAJEWSKI ROGER A (US); STELLA VALENTI) 4 September 1997 (1997-09-04) page 5, line 29 - line 37 page 6, line 31 -page 8, line 33 page 13, line 1 -page 14, line 22; claims 1,11,13-16; figures 2,3 ---	1-6, 13-19, 22-29
X	WO 99 44735 A (BRANDENBERGER HARRY ;HEINZEN CHRISTOPH (CH); INOTECH AG (CH); WIDM) 10 September 1999 (1999-09-10) page 3, line 11 -page 5, line 23 page 7, line 4 - line 26; claims 1-6,9-11 ---	1-6,13, 22-24
X	CH 675 370 A (CIBA GEIGY AG) 28 September 1990 (1990-09-28) column 1, line 64 -column 2, line 7 column 2, line 40 -column 3, line 46; figure 1 column 6, line 33 - line 55 column 7, line 8 - line 21; claims 1,10 ---	1-8,13, 22
X	SHIGA K ET AL: "Preparation of Poly(D,L-lactide) and copoly(lactide-glycolide) microspheres of uniform size." JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 48, no. 9, 1996, pages 891-895, XP0008007515 ISSN: 0022-3573 figures 2,4 --- -/--	32-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter- national Application No. PCT/US 01/25674
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANONYMOUS: "Microparticle size standards" ALDRICH TECHNICAL BULLETIN AL-203, 'Online! February 1997 (1997-02), pages 1-2, XP002212512 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.sigmaaldrich.com/img/asset s/3762/al_techbull_al203.pdf> 'retrieved on 2002-09-05! page 2; table 2	32-34
X,P	BERKLAND CORY ET AL: "Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 73, no. 1, 18 May 2001 (2001-05-18), pages 59-74, XP002212474 ISSN: 0168-3659 the whole document	1-8,10, 13-22, 30-33, 35-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/25674**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01 25674

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-40

A method for forming particles comprising accelerating a first stream comprising a first liquid, and vibrating the first stream to form particles and particles prepared by this method; and a method of forming particles comprising accelerating a first stream comprising a first liquid wherein the accelerating comprises applying charge to the first stream, and the particles comprise a core and shell and particles prepared by this method; and particles having an average diameter of 50 to 100 μ m, wherein 90% of the particles have a diameter that is within 2% of an average diameter of the particles; and particles having an average diameter of 1 to 50 μ m, wherein 90% of the particles have a diameter that is within 1 μ m of an average diameter of the particles.

2. Claims: 41-62

An apparatus for forming particles comprising (i) means for forming a first stream of a first liquid, (ii) means for accelerating the first stream, and (iii) means for vibrating the first stream; and an apparatus for forming particles comprising (i) a first nozzle, (ii) a second nozzle and (iii) a charge source; and methods for making particles comprising forming particles with these apparatuses.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/25674

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0265924 A	04-05-1988	JP 7017754 B	01-03-1995
		JP 63112634 A	17-05-1988
		JP 1928432 C	12-05-1995
		JP 6053806 B	20-07-1994
		JP 63117039 A	21-05-1988
		JP 63115572 A	20-05-1988
		JP 1905101 C	08-02-1995
		JP 6028720 B	20-04-1994
		JP 63123431 A	27-05-1988
		CA 1321454 A	24-08-1993
		DE 3787700 D	11-11-1993
		DE 3787700 T	10-02-1994
		US 5015423 A	14-05-1991
DE 2725849	21-12-1978	CH 629115 A	15-04-1982
WO 9731691 A	04-09-1997	US 5874029 A	23-02-1999
		US 5833891 A	10-11-1998
		AU 709384 B	26-08-1999
		AU 2193697 A	16-09-1997
		CA 2247900 A	04-09-1997
		EP 0885038 A	23-12-1998
WO 9944735 A	10-09-1999	JP 2002504011 T	05-02-2002
		AU 2617099 A	20-09-1999
		CA 2327716 A	10-09-1999
		DE 19910250 A	05-01-2000
		DE 19910251 A	09-12-1999
		EP 1062032 A	27-12-2000
CH 675370	28-09-1990	US 6458296 B	01-10-2002
		NONE	

フロントページの続き

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

(72)発明者 パック,ダニエル,ダブリュー.

アメリカ合衆国 イリノイ 61822,シャンペーン,ゴールドメダル ドライブ 3105

(72)発明者 バークランド,コーリー,ジェイ.

アメリカ合衆国 イリノイ 61801,アーバナ,カントリー スクワイアー 1001

Fターム(参考) 4C076 AA32 FF68 GG11

4G005 AA01 AA02 AB14 AB15 AB25 BA20 CA02 DD08Z DD12Z DD59Z

DE08X EA03

4G075 AA13 AA27 BB10 CA14 CA23 DA02 DA18 EC01 ED15 EE02