(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5634009号
(P5634009)

(45)発行日　平成26年12月3日(2014.12.3)　(24)登録日　平成26年10月24日(2014.10.24)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61K 9/10	(2006.01)	A61K	9/10	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	M
A61P 37/00	(2006.01)	A61P	37/00	

請求項の数 37　(全 48 頁)

(21)出願番号	特願2007-513363(P2007-513363)
(86)(22)出願日	平成17年5月12日(2005.5.12)
(65)公表番号	特表2007-537283(P2007-537283A)
(43)公表日	平成19年12月20日(2007.12.20)
(86)国際出願番号	PCT/US2005/016651
(87)国際公開番号	WO2005/112893
(87)国際公開日	平成17年12月1日(2005.12.1)
審査請求日	平成20年5月7日(2008.5.7)
審判番号	不服2012-16202(P2012-16202/J1)
審判請求日	平成24年8月21日(2012.8.21)
(31)優先権主張番号	60/570,274
(32)優先日	平成16年5月12日(2004.5.12)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	10/894,410
(32)優先日	平成16年7月19日(2004.7.19)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　591013229
バクスター・インターナショナル・インコーポレイテッド
ＢＡＸＴＥＲ　ＩＮＴＥＲＮＡＴＩＯＮＡＬ　ＩＮＣＯＲＰＯＲＡＴＥＤ
アメリカ合衆国　６００１５　イリノイ州、ディアフィールド、ワン・バクスター・パークウェイ　（番地なし）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】タンパク質を含み、そして高濃度のタンパク質で注射性能を示すミクロスフェア

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

非結晶質のタンパク質微粒子の懸濁物および相分離増強剤を含有する微粒子の注射可能な組成物であって、該組成物が、１ｍｌの該組成物あたり少なくとも約５０ｍｇの該タンパク質の濃度を提供し、そして該タンパク質が、少なくとも約２５，０００ダルトンの分子量を有し、該微粒子は注射の際、生理的環境に容易に溶解可能であり、２０秒以内に、該注射可能な組成物の少なくとも２ｍｌが、２０ゲージまたはそれより細い注射針を通過する、微粒子の注射可能な組成物。

【請求項２】

前記タンパク質が、抗体である、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記タンパク質が、以下、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント、トラップ分子、単鎖抗体、それらの組換え形態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１に記載の組成物。

【請求項４】

前記タンパク質が、モノクローナル抗体である、請求項１に記載の組成物。

【請求項５】

前記タンパク質微粒子が、ミクロスフェアである、請求項１に記載の組成物。

【請求項６】

臨床的有効量の前記タンパク質が、約１０ｍｌ以下の前記組成物中に分散される、請求項

１に記載の組成物。
【請求項７】
一用量の前記タンパク質微粒子が、１０ｍｌ以下の前記組成物中に分散される、請求項３に記載の組成物。
【請求項８】
前記タンパク質微粒子は、約５０ミクロン以下の平均粒子サイズを有する、請求項３に記載の組成物。
【請求項９】
前記微粒子が、約５０ミクロン以下の平均粒子サイズを有する結晶性の微粒子より速い、注射の際の溶解速度を示し、そして前記注射可能な組成物が、２０ゲージまたはそれより細い注射針を通過する、請求項１に記載の組成物。
【請求項１０】
少なくとも約９０％の前記タンパク質が、前記微粒子において該タンパク質として化学的にインタクトである、請求項１に記載の組成物。
【請求項１１】
前記微粒子が、コーティングを含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項１２】
前記コーティングが、マトリックス内に前記微粒子をカプセル化する、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記コーティングが、１またはそれより多い電解質の層内に前記微粒子をカプセル化する、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１４】
請求項１１に記載の組成物であって、前記微粒子が、賦形剤をさらに含む、組成物。
【請求項１５】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも２０重量％である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１６】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも５０重量％である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１７】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも８０重量％である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１８】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも９０重量％である、請求項１に記載の組成物。
【請求項１９】
各々が抗体を含む複数の微粒子であって、該抗体が、非結晶質であり、そして、該微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも２０重量％を構成し、（ａ）該微粒子の９０パーセンタイルの体積粒径の（ｂ）該微粒子の１０パーセンタイルの体積粒径に対する比は、５未満であるかもしくは５に等しく、該微粒子が、約５０ミクロン以下の粒子サイズを有するミクロスフェアである、複数の微粒子。
【請求項２０】
前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項１９に記載の複数の微粒子。
【請求項２１】
前記微粒子が、モノクローナル抗体、抗体、モノクローナル抗体フラグメント、トラップ分子、単鎖抗体、それらの組換え形態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される抗体を含む、請求項１９に記載の複数の微粒子。
【請求項２２】
前記抗体が、少なくとも約２５，０００ダルトンの分子量を有する、請求項１９に記載の

複数の微粒子。
【請求項２３】
前記微粒子が、コーティングを含む、請求項１９に記載の複数の微粒子。
【請求項２４】
前記コーティングが、マトリックス内に前記微粒子をカプセル化する、請求項２３に記載の複数の微粒子。
【請求項２５】
前記コーティングが、１またはそれより多い電解質の層内に前記微粒子をカプセル化する、請求項２３に記載の複数の微粒子。
【請求項２６】
コーティングが、賦形剤とともに前記微粒子をカプセル化する、請求項１９に記載の複数の微粒子。
【請求項２７】
前記抗体が、前記微粒子の総重量に基づいて、該微粒子の少なくとも５０重量％～約１００重量％を構成する、請求項１９に記載の複数の微粒子。
【請求項２８】
前記抗体が、前記微粒子の総重量に基づいて、該微粒子の少なくとも８０重量％を構成する、請求項１９に記載の複数の微粒子。
【請求項２９】
前記抗体が、前記微粒子の総重量に基づいて、該微粒子の少なくとも９０重量％を構成する、請求項１９に記載の複数の微粒子。
【請求項３０】
微粒子を調製するプロセスであって、該プロセスは、抗体と水溶性であるかまたは水混和性溶媒に可溶性であるポリマーとを水溶液中で混合して、非結晶性抗体組成物を提供する工程、および該組成物を冷却する工程であって、該組成物を冷却する際に、請求項１９に記載の複数の微粒子が形成する工程を包含し、該ポリマーは相分離増強剤であり、該複数の微粒子の形成は該組成物からの該ポリマーの除去を包含する、プロセス。
【請求項３１】
前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体フラグメント、トラップ分子、それらの組換え形態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項３０に記載のプロセス。
【請求項３２】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも２０重量％である、請求項３０に記載のプロセス。
【請求項３３】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも５０重量％である、請求項３０に記載のプロセス。
【請求項３４】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも８０重量％である、請求項３０に記載のプロセス。
【請求項３５】
前記タンパク質が、前記微粒子の総重量に基づいて該微粒子の少なくとも９０重量％である、請求項３０に記載のプロセス。
【請求項３６】
水溶液中に非結晶質の抗体とポリマーとを含む微粒子を含む、２０ゲージまたはそれより細い注射器の針を通して注射するための抗体の高濃縮された組成物であって、該ポリマーは相分離増強剤であり、該組成物は、１ｍｌの組成物あたり少なくとも約５０ｍｇの抗体の濃度である約１０ｍｌ以下の懸濁物として投与され、該微粒子は注射の際、生理的環境に容易に溶解可能である、組成物。
【請求項３７】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体フラグメント、トラップ分子、それらの組換え形態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項３６に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本願は、出願番号第１０／８９４，４１０号（２００４年７月１９日出願）の一部継続出願であり、かつ米国仮特許出願番号第６０／５７０，２７４号（２００４年５月１２日出願）に基づく優先権を主張する（これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用され、そして本明細書の一部をなす）。
【０００２】
（技術分野）
本発明は、活性な因子の小粒子（好ましくは、形が実質的に球状である）の組成物に関する。この活性な因子は、好ましくは高分子量タンパク質であり、そしてより好ましくは高分子量タンパク質の実質的に非晶質の形態であり、そして最も好ましくは実質的に非晶質のモノクローナル抗体である。本発明は、高分子量タンパク質（高濃度のモノクローナル抗体が挙げられる）の注射可能か、または注入可能（ｓｙｒｉｎｇａｂｌｅ）な組成物を提供する性能を有し、従って臨床的有効量のこのような活性な因子を、低容量の組成物によって送達し、好ましくは１０ｍｌ以下の組成物によって送達し、そしてより好ましくは注射器の適用において代表的に見出される容量（皮下ボーラス注射による代表的な注入可能な低用量の注射が挙げられる）によって送達する能力を提供する。活性な因子の球状小粒子に関するこれらの組成物の生産方法および使用方法もまた、本発明によって企図される。この生産方法に従って、この活性な因子は、単一の液相中に溶液を形成する溶解した相分離増強因子（ＰＳＥＡ）を含む、水性溶媒または水混和性（ａｑｕｅｏｕｓ－ｍｉｓｃｉｂｌｅ）の溶媒中に溶解される。次いでこの溶液は、固相を含む活性な因子、ＰＳＥＡおよび液相を含む溶媒を有する液相－固相分離に供される。この液相－固相分離は、多くの手段（例えば、溶液の温度の変化またはエネルギーの付加）で誘導され得る。この方法は、治療因子を必要とする被験体に送達され得る、治療因子の球状小粒子を形成するのに最も適切である。この方法はまた、高分子（特に、タンパク質のような熱不安定性である高分子（モノクローナル抗体物質が挙げられる））の固体の球状小粒子を形成するのに最も適切である。本発明は、注入可能な高分子を提供する性能を有する。
【背景技術】
【０００３】
（発明の背景）
過去に、数種の技術が、生体高分子のナノ粒子および微粒子の製造のために使用された。慣習的な技術としては、粒子形成のための噴霧乾燥およびミリングが挙げられ、そしてそれらが使用されて、５ミクロン以下のサイズの粒子が生成され得る。
【０００４】
特許文献１および特許文献２は、非晶質の複合体を生じるために、亜鉛と複合体を形成し、次いで超音波ノズルによって微粒子化され、そしてこの液滴を凍結するために、液体窒素中に噴射されることによる、組換えヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）の固体形態の生成を記載する。その後この液体窒素は、－８０℃の温度でエバポレートされ得、そして得られた物質は、凍結乾燥される。
【０００５】
微粒子およびミクロスフェアは、タンパク質、合成ポリマー、多糖類およびそれらの組み合わせを含み、１ミリメートル未満の直径を有し、より好ましくは１００ミクロン未満の直径を有し、そして最も好ましくは１０ミクロン未満の直径を有する固体かまたは半固体の粒子であり、これらの粒子は、種々の物質の形態をとり得る。ミクロスフェアは、多

くの異なる用途（主に、分離物（ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ）、診断薬、および薬物送達）に使用されてきた。

【０００６】

分離技術に使用されるミクロスフェアの最も周知である例は、合成起源または天然起源のいずれかのポリマー（例えば、ポリアクリルアミド、ヒドロキシアパタイトまたはアガロース）の形態をとるミクロスフェアである。制御された薬物送達の分野において、分子は、多くの場合、その後の放出のために球状小粒子中に組み込まれるか、または球状小粒子内にカプセル化されるか、または均質な（ｍｏｎｏｌｉｔｈｉｃ）マトリックス中に組み込まれる。多くの異なる技術（相分離、溶媒エバポレーション、コアセルベーション（ｃｏａｓｃｅｒｖａｔｉｏｎ）、乳化、および噴霧乾燥が挙げられる）が慣習的に使用されて、合成ポリマー、天然のポリマー、タンパク質および多糖類からこれらのミクロスフェアが作製される。一般的に、これらのポリマーは、これらのミクロスフェアの支持構造を形成し、そして目的の薬物は、このポリマー構造中に組み込まれる。

【０００７】

標的薬物をカプセル化するために脂質を使用して調製される粒子が、現在利用可能である。リポソームは、単一もしくは複数のリン脂質および／またはコレステロールの二重層からなる球状粒子である。リポソームは、１００ナノメートル以上のサイズであり、そして種々の、水溶性かまたは脂溶性の薬物を保有し得る。例えば、複数の水性区画を囲んで粒子を形成する二重層膜中に配列される脂質は、Ｓｉｎｉｌ　Ｋｉｍの特許文献３に記載されるように、その後の送達のために水溶性薬物をカプセル化するのに使用され得る。

【０００８】

球状ビーズは、長年、生化学者のためのツールとして市販されてきた。例えば、ビーズに結合体化した抗体は、特定のリガンドに対する結合特異性を有する比較的大きい粒子を生じる。抗体は、細胞の活性化についての細胞の表面上のレセプターに結合するために、慣習的に使用され、固相に結合されて免疫親和性による精製のための抗体コーティング粒子を形成し、そして長時間にわたってゆっくりと放出される治療因子を送達するために使用され得、この送達は、その因子を所望の部位に対して標的化するための、粒子に結合体化した組織特異的な抗体または腫瘍特異的な抗体を使用する。

【０００９】

粒子（特に、薬物送達の分野、分離の分野および診断の分野における使用に適合され得る粒子）を作製するための新規の方法の開発に対する継続的な必要性が存在する。有用性の観点から最も望ましい粒子は、以下の特性を有する球状小粒子である：狭いサイズ分布、実質的に球状、実質的に活性な因子のみからなる、活性な因子の生化学的完全性および生物活性の保持。この粒子は、コーティングによってか、またはマイクロカプセル化によって粒子のさらなる安定化を可能にする、適切な固体を提供するべきである。さらに、球状小粒子の製造方法は、以下の望ましい特性を有する：簡便な製造、本質的に水性のプロセス、高い収率、およびその後のふるい分けを必要としないこと。

【００１０】

タンパク質は、鎖の長さが高レベルの三次構造および／または四次構造を生じるのに十分であるアミノ酸の配列である。これは、「ペプチド」またはこのような構造を有さない他の低分子量薬物と区別される。

【００１１】

抗体（免疫グロブリン）は、外来分子（抗原）または侵入する生物に対する応答において免疫系細胞（Ｂリンパ球）によって産生されるタンパク質である。抗体は、多くの場合、外来分子または外来細胞に対して非常に強固に結合し、それにより、ファゴサイトーシスまたは補体誘導性の溶解により、これらを不活化するか、または破壊のために印付けする。

【００１２】

免疫グロブリン（Ｉｇ）は、抗体分子である。より高等な脊椎動物は、免疫応答においてそれぞれ異なる役割を担う５つのクラスの免疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、

ＩｇＧ、およびＩｇＭ）を有する。

【００１３】

モノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、免疫系細胞（Ｂリンパ球）のただ１種のクローンから得られ、そしてただ１種の外来分子（抗原）の特異的部位を認識する、高度に特異的な精製された抗体（免疫グロブリン分子）である。モノクローナル抗体は、実験室操作（マウス、キメラ、ヒト化）によって大量生産され得る。用語「モノクローナル抗体」は、広い意味で使用され、そして具体的には、免疫グロブリンのＦｃ領域を有するモノクローナル抗体、多くのエピトープに対する特異性を有する抗体組成物、二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）、二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）、および単鎖分子、ならびに抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖ）を包含する。

【００１４】

ポリクローナル抗体は、単一の外来分子（抗原）の多くの部位に対して特異的であるさまざまな抗体（免疫グロブリン分子）である。天然の免疫応答は、多クローン性である。

【００１５】

トラップ分子と称される抗体は、２つの異なるレセプター構成要素と「Ｆｃ領域」といわれる抗体分子の一部分との融合体からなり、このことは、単一の構成要素の試薬によって提供される親和性を上回る顕著に増加した親和性を有する成長因子ブロッカーおよびサイトカインブロッカーの生成をもたらす。例えば、トラップ分子は、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発された。

【００１６】

モノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）は、細胞の１つのクローンから得られる抗体の実験室由来の集団であり、そして１つの特定の抗原部位への結合において高度に特異的である。これらは、ほぼ１５０ｋＤａ程度の大きいタンパク質であり、４つのポリペプチド鎖（それぞれ約２５ｋＤａの２つの軽鎖およびそれぞれ約５０ｋＤａの２つの重鎖）からなる。これらのサイズに起因して、モノクローナル抗体は、現在、一般的には静脈内注射によって送達される。

【００１７】

抗体は、多くの場合、治療効果を達成するために、比較的大きい容量で送達される必要がある。例えば、多くの抗体のための送達用量は、約１００～８００ｍｇの間である。これらの大きい容量の物質の注射性能（ｉｎｊｅｃｔａｂｉｌｉｔｙ）は、かなりの処方物の問題および送達の問題を示す。このような大きい投薬量の小さい容量は、代表的に、高い粘度を有する；したがって、ほぼ１０ｍＬ～２５０ｍＬ程度の大きい容量が、これを静脈内に送達するために必要とされる。静脈内送達は、患者にとって非常に不快であり、臨床設定を必要とし、そしてそれは、高価であり、かつ時間が掛かる。

【００１８】

本発明に従う微粒子技術は、この市場に対して重要な利点を提供し得る。なぜなら注射の際に容易に溶解できる高濃縮された懸濁物の形成を可能にするからである。同様に、高分子量タンパク質を含む他の活性な因子は、本発明の利益を享受し得る。本発明は、高濃度かつ比較的小さい容量で送達され得る組成物（従って、注入性能（ｓｙｒｉｎｇａｂｉｌｉｔｙ）特性および注射性能特性を有する組成物）を記載する。本発明の前に、モノクローナル抗体、他の抗体、または約２５ｋＤａを超える分子量を有する他の高分子量タンパク質は、細いゲージの針（例えば、２０ゲージおよび標準的な注射器と組み合わせて使用される、より細い針）を使用して注射できなかった。本発明の前に、このようなタンパク質はまた、臨床的有効量のタンパク質を含む小さい容量（１０ｍｌ以下）で送達できなかった。これらの分子と組み合わせた微粒子技術の使用は、これまでに必要とされたように、これらの分子の高容量注射の問題を解決する。本発明はまた、小さい注射容量かつ短い送達時間で、高濃度のより低い分子量のタンパク質物質を送達する工程を支援するのに有用であり得る。

【００１９】

モノクローナル抗体を製造するプロセスは、時間の掛かるプロセスであり、このことが、モノクローナル抗体が高価な理由である。従って、ｍＡｂが非常に効率的かつ安全な様式で標的部位に正確に送達されることが、重要である。ｍＡｂであるか否かにかかわらず、容易に溶解する微粒子またはミクロスフェアの高収率の形成、それらそれぞれの化学的完全性の保持、およびｍＡｂのような物質の場合には、皮下、眼、または他の投与経路による送達を可能にし得る非常に良好な注射性能もまた、微粒子の調製および送達において重要である。

【特許文献１】米国特許第５，６５４，０１０号明細書
【特許文献２】米国特許第５，６６７，８０８号明細書
【特許文献３】米国特許第５，４２２，１２０号明細書

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００２０】
本発明の局面または目的は、実質的に非晶質であるか、または非結晶質である抗体微粒子を提供することである。
【００２１】
本発明の別の局面または目的は、実質的に非晶質であるか、または非結晶質である抗体微粒子を含有する注入可能な組成物を提供することである。
【００２２】
本発明のさらなる局面または目的は、タンパク質が、約２５，０００ダルトンおよびそれを上回る分子量を有する場合でさえ、約１０ｍｌ以下の組成物中の臨床的有効量のタンパク質を提供する注入可能な組成物を提供することである。
【００２３】
本発明のさらなる局面または目的は、活性な因子が少なくとも約２５，０００ダルトンの分子量を有する場合に特に有利な用途が見出される、臨床的有効量の１ｍｌあたり少なくとも約５０ｍｇの活性な因子を有する微粒子を提供することである。
【００２４】
本発明の別の局面または目的は、高濃度の注射（例えば、皮下注射が挙げられるが、これに限定されない）による活性な因子の送達を介する臨床的に有効な様式で微粒子を使用する方法を提供することである。
【００２５】
本発明のさらなる局面または目的は、比較的高分子量のタンパク質物質の微粒子を調製するためのプロセスである。
【００２６】
本発明の別の局面または目的は、容易に溶解し（すなわち、生理的ｐＨにてＰＢＳ緩衝液中に約１０分以内の溶解性を示す一方で、化学的完全性を示し（すなわち、少なくとも約９０％の化合物が微粒子中で化学的にインタクトである））、そして注射性能（より具体的に、注入性能の形態）を示す（すなわち、少なくとも５０ｍｇ／ｍｌの懸濁物および過剰な力の使用を伴わない細いゲージの針による懸濁物の送達性能を形成する）、微粒子（好ましくは、ミクロスフェア）を提供することである。
【００２７】
本発明の他の局面、目的および利点は、以下の本発明の好ましい実施形態に従う説明から理解され、具体的にこれらの実施形態は、本明細書中に記載される種々の特徴の定まった組み合わせおよび定まっていない組み合わせを包含し、添付の図面に示される関連情報に関する。
【課題を解決するための手段】
【００２８】
（発明の要旨）
本発明は、高用量における注射可能な特性を有するタンパク質微粒子に関する。このタンパク質は、活性な因子であり、そしてこの微粒子は、実質的に非晶質であるか、または

非結晶質である。これらの組成物によって、非常に高濃度の活性な因子は、非常に低容量において送達可能である。

【００２９】

本発明の活性な因子は、好ましくは、治療因子または診断因子であり得る活性な因子である。本発明の好ましい実施形態において、この活性な因子は、高分子タンパク質であり、このタンパク質としては、モノクローナル抗体が挙げられる。なお別の好ましい実施形態において、この活性な因子を含む粒子は、この因子を必要とする被験体に対する任意の適切な経路によるインビボ送達に適しており、この経路としては、他にこれらの型の高分子について可能ではない、皮下および／または眼の注射アプローチが挙げられる。

【００３０】

本発明はまた、活性な因子の、微粒子、球状小粒子、またはミクロスフェアの生産方法および使用方法に関する。生産方法に従って、この活性な因子は溶解した相分離増強因子を含む溶媒中に溶解されて、単一の液相である溶液を形成する。上記溶媒は、好ましくは、水性溶媒または水混和性溶媒である。次いでこの溶液は、固相を含む活性な因子、およびＰＳＥＡおよび液相を含む溶媒を有する液相－固相分離に供される。この液相－固相分離は、多くの手段（例えば、溶液の温度を溶液の相転移温度以下に変化させること）で誘導され得る。

【００３１】

本発明の好ましい実施形態において、上記溶液を液相－固相分離に供する方法は、この溶液中の上記活性な因子の相転移温度以下までこの溶液を冷却することによる。その温度は、この溶液の凝固点を上回っても下回ってもよい。凝固点が相転移温度を上回る溶液に関して、この溶液は、溶液の凝固点を下げて、溶液を凍結させずに溶液中の相分離を起こさせるために凝固点降下剤（例えば、ポリエチレングリコールまたはプロピレングリコール）を含有し得る。

【００３２】

本発明の相分離増強剤は、溶液が、活性な因子が凝固して不連続相として球状小粒子の懸濁物を形成する一方で、相分離増強剤が連続相中に溶解したままである相変化の工程に供される場合、上記溶液中の活性な因子の液相－固相分離を増強するか、または誘導する。すなわち、相分離増強剤は、相変化を受けないが、この活性な因子は、相変化を受ける。

【００３３】

本発明における粒子を生産する方法はまた、形成された粒子のサイズおよび形を制御するために、粒子の液相－固相分離を制御する工程をさらに包含する。相分離を制御する方法は、イオン強度、ｐＨ、相分離増強剤の濃度、溶液中の活性な因子の濃度の制御、または溶液の温度における変化の速度を制御する工程を包含し、これらの制御は、相分離を誘導するために、相分離またはこれらのいずれか、もしくはいくつかの変化の、どちらかの前に行われる。

【００３４】

本発明の好ましい実施形態において、上記球状小粒子は、粒子の形成後に連続相中のＰＳＥＡから分離される。なお別の好ましい実施形態において、分離の方法は、液体の媒体で粒子を含む溶液を洗浄することにより、この液体の媒体において、活性な因子は、この液体の媒体に溶解しないが、相分離増強剤は、この液体の媒体に溶解する。この液体洗浄媒体は、液体の媒体における活性な因子の溶解性を減少させる因子を含み得る。液体洗浄媒体はまた、１種以上の賦形剤を含み得る。これらの賦形剤は、この球状小粒子のためか、またはこの活性な因子もしくはキャリア因子のために安定剤として作用し得る。これらの賦形剤はまた、さらなる特性（例えば、この粒子からの活性な因子の制御された放出または生物学的組織によるこの活性な因子の改変された浸透）によって、この活性な因子またはこの粒子を染み込ませ得る。別の好ましい実施形態において、これらの小さい粒子は、ＰＳＥＡを含まないが、これらの粒子は、その後の処理工程のために、ＰＳＥＡ相からの分離前にＰＳＥＡ相の存在下で回収され得る。別の好ましい実施形態において、この溶

液は、水性溶媒または水混和性溶媒を含む水溶液である。
【発明を実施するための最良の形態】
【００３５】
（好ましい実施形態の説明）
本発明は、多くの異なる形態の実施形態に従う。本発明の好ましい実施形態は、開示され、これに伴って、本開示は、本発明の原理の例示と見なされるべきであり、そして本発明の広範な局面を、この例証された実施形態に限定することを意図しないことが、理解される。
【００３６】
必要に応じて、本発明の詳細な実施形態は、本明細書中に開示される；しかし、開示される実施形態は種々の形態で具現化され得る本発明の単なる例示であることが、理解されるべきである。従って、本明細書中に開示される特定の詳細は、限定として解釈されるべきではないが、単に特許請求の範囲のための基礎、および実質的に任意の適切な様式で、本発明を多様に用いる当業者に教示するための代表的な基礎として解釈されるべきである。
【００３７】
本発明は、タンパク質である活性な因子の、実質的に非晶質であるか、または非結晶質である小粒子の組成物に関する。特別な用途は、活性な因子が、少なくとも約２５，０００ダルトンの分子量を有する場合に見出される。生産方法に従って、この活性な因子は溶解した相分離増強因子を含む溶媒中に溶解されて、単一の液体の連続相である溶液を形成する。上記溶媒は、好ましくは、水性溶媒または水混和性溶媒である。次いでこの溶液は、例えば、この活性な因子の相転移温度以下まで溶液の温度を低下させることによって相変化に供され、それによって、この活性な因子は、液相－固相分離を受けて、不連続相を構成する実質的に非晶質であるか、または非結晶質である小粒子の懸濁物を形成するが、相分離増強剤は、連続相中に残存する。
【００３８】
本発明は、活性な因子の小粒子（好ましくは、形が実質的に球状である）の組成物に関する。この活性な因子は、好ましくは高分子量タンパク質であり、そしてより好ましくは高分子量タンパク質の実質的に非晶質の形態であり、そして最も好ましくは実質的に非晶質のモノクローナル抗体である。本発明は、高濃度の高分子量タンパク質（モノクローナル抗体が挙げられる）の注射可能か、または注入可能な組成物を提供する可能性を有し、従って、低容量の組成物で、好ましくは１０ｍｌ以下の組成物で、そしてより好ましくは代表的に標準的な注射器において見出される容量で臨床的有効量のこのような活性な因子を送達する性能を提供する。
【００３９】
活性な因子の球状小粒子に関するこれらの組成物の生産方法および使用方法もまた、本発明によって企図される。生産方法に従って、この活性な因子は、溶解した相分離増強剤（ＰＳＥＡ）を含む水性溶媒または水混和性溶媒中に溶解されて、単一の液相中に溶液を形成する。次いでこの溶液は、固相を含む活性な因子、ならびにこの液相を含むＰＳＥＡおよび溶媒を含む液相－固相分離に供される。この液相－固相分離は、多くの手段（例えば、溶液の温度の変化またはエネルギーの付加）で誘導され得る。この方法は、治療因子を必要とする被験体に送達され得る治療因子の球状小粒子を形成するのに最も適切である。この方法はまた、高分子（特に、タンパク質（モノクローナル抗体物質が挙げられる）のような熱不安定性である高分子）の固体の球状小粒子を形成するのに最も適切である。本発明は、注入可能な　高分子を提供する性能を有する。
【００４０】
（活性な因子）
本発明の活性な因子は、治療因子または診断因子であり得るタンパク質である。好ましい活性な因子は、高分子量タンパク質である。好ましい因子は、タンパク質の非晶質の形態（非晶質の抗体が挙げられる）である。

【００４１】
本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および抗体フラグメント（特に、一般的に「Ｆａｂ」フラグメントまたは「Ｆａｂ」領域として公知である抗原結合フラクション（ｆｒａｃｔｉｏｎ））、単鎖抗体、ならびに組換え形態であるモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体もしくは他の抗体を包含し、そして名称「トラップ分子」で当該分野において現在認識されるものである。抗体とはまた、（例えば、コーティングまたはカプセル化（本明細書中に記載されるようなアプローチによるものを含む）によって）処理される抗体の上記の形態のいずれかをいう。

【００４２】
トラップ分子は、２つの異なるレセプター構成要素と「Ｆｃ領域」といわれる抗体分子の一部分との融合体からなり、単一の構成要素の試薬によって提供されるトラップ分子を上回る、顕著に増加した親和性を有する成長因子ブロッカーおよびサイトカインブロッカーの生成をもたらす。

【００４３】
以下の参考文献は、トラップ分子についてのさらなる情報を提供する：「Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｔｒａｐｓ：Ｍｕｌｔｉ－Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ、Ｈｉｇｈ－Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｂｌｏｃｋｅｒｓ ｏｆ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ａｃｔｉｏｎ」；Ｅｃｏｎｏｍｉｄｅｓ ＡＮ、Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ ＬＲ、Ｒｕｄｇｅ ＪＳ、Ｗｏｎｇ Ｖ、Ｋｏｅｈｌｅｒ－Ｓｔｅｃ ＥＭ、Ｈａｒｔｎｅｔｔ Ｃ、Ｐｙｌｅｓ ＥＡ、Ｘｕ Ｘ、Ｄａｌｙ ＴＪ、Ｙｏｕｎｇ ＭＲ、Ｆａｎｄｌ ＪＰ、Ｌｅｅ Ｆ、Ｃａｒｖｅｒ Ｓ、ＭｃＮａｙ Ｊ、Ｂａｉｌｅｙ Ｋ、Ｒａｍａｋａｎｔｈ Ｓ、Ｈｕｔａｂａｒａｔ Ｒ、Ｈｕａｎｇ ＴＴ、Ｒａｄｚｉｅｊｅｗｓｋｉ Ｃ、Ｙａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ ＧＤ、Ｓｔａｈｌ Ｎ；Ｊｏｕｒｎａｌ：Ｎａｔ Ｍｅｄ（２００３）；第９巻、第１号：ｐ．４７－５２．「Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｅｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ－Ｔｒａｐ Ｄｅｃｒｅａｓｅｓ Ｔｕｍｏｒ Ｂｕｒｄｅｎ、Ｉｎｈｉｂｉｔｓ Ａｓｃｉｔｅｓ、ａｎｄ Ｃａｕｓｅｓ Ｄｒａｍａｔｉｃ Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ｉｎ ａｎ Ｏｖａｒｉａｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｍｏｄｅｌ」；Ｂｙｒｎｅ ＡＴ、Ｒｏｓｓ Ｌ、Ｈｏｌａｓｈ Ｊ、Ｎａｋａｎｉｓｈｉ Ｍ、Ｈｕ Ｌ、Ｈｏｆｍａｎｎ ＪＩ、Ｙａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ ＧＤ、Ｊａｆｆｅ ＲＢ；Ｊｏｕｒｎａｌ：Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ（２００３）；第１５巻；第９（１５）号：ｐ．５７２１－８．「Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｈｅｃａｌ Ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ、Ａｎｔｒａｌ Ｆｏｌｌｉｃｕｌａｒ Ｇｒｏｗｔｈ、ａｎｄ Ｏｖｕｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ Ｐｒｉｍａｔｅ ｂｙ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｗｉｔｈ Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｔｒａｐ Ｒ１Ｒ２」；Ｗｕｌｆｆ Ｃ、Ｗｉｌｓｏｎ Ｈ、Ｗｉｅｇａｎｄ ＳＪ、Ｒｕｄｇｅ ＪＳ、Ｆｒａｓｅｒ ＨＭ；Ｊｏｕｒｎａｌ：Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ（２００２）；第１４３巻、第７号：ｐ．２７９７－８０７。

【００４４】
本発明の好ましい実施形態において、上記活性な因子は、天然である得るか、または合成であり得るモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アダリムマブ（ａｄａｌｉｍｕｔａｂ）（商品名ＨｕｍｉｒａでＡｂｂｏｔから入手可能）、アブシキシマブ（商品名ＲｅｏＰｒｏでＣｅｎｔｏｃｏｒから入手可能）；ダクリズマブ（商品名ＺｅｎａｐａｚでＲｏｃｈｅから入手可能）、リツキシマブ（商品名ＲｉｔｕｘｉｎまたはＲｉｔｕｘａｎでＩＤＥＣ／Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈから入手可能）、バシリキシマブ（商品名ＳｉｍｕｌｅｃｔでＮｏｖａｒｔｉｓから入手可能）、パリビズマブ（ｐａｌｉｖｚｕｍａｂ）（商品名ＳｙｎａｇｉｓでＭｅｄｉｍｍｕｎｅから入手可能）、インフリキシマブ（商品名ＲｅｍｉｃａｄｅでＣｅｎｔｏｃｏｒから入手可能）、トラスツズマブ（ｔｒａｓｔｕｘｕｍａｂ）（商品名ＨｅｒｃｅｐｔｉｎでＧｅｎｅｎｔｅｃｈから入手可能）、ゲムツズマブ（商品名Ｍｙｌｏｔａ

ｒｇでＩＤＥＣから入手可能）、アレムツズマブ（ａｌｅｍｚｕｔｕｍａｂ）（商品名ＣａｍｐａｔｈでＭｉｌｌｅｎｎｉｕｍ／ＩＬＥＸから入手可能）、およびイブリツモマブ（商品名ＺｅｖｕｌｉｎでＩＤＥＣから入手可能）。Ｇａｍｍａｇａｒｄ Ｌｉｑｕｉｄ（Ｂａｘｔｅｒ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｗｅｓｔｌａｋｅ Ｖｉｌｌａｇｅ、ＣＡから入手可能）は、使用できる状態に滅菌され、高度に精製され、かつ高度に濃縮された免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）抗体の液体調製物である。

【００４５】

抗体「Ｆａｂ」フラクションまたは抗体「Ｆａｂ」領域の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない。ＴＧＸ－６Ｂ４（現在、ＴｈｒｏｍｂｏＧｅｎｉｃｓ Ｌｔｄ ｏｆ Ｄｕｂｌｉｎ、Ｉｒｅｌａｎｄによって開発中）は、血小板粘着を阻害するＧＰｌｂに対する抗体であり、そして動脈血栓症における初期の工程を防止するための新規のアプローチであることが示される。ジゴキシン特異的Ｆａｂフラグメントは、ヒキガエルの毒物の中毒の処置において有益であることが報告された（Ｈｅａｒｔ．２００３；８９：１２－４７２、Ｔｏｘａｌｅｒｔ、１５：発行物１、１９９８）。ヒト化Ｆａｂフラグメントは、ＣＯＳ細胞およびＣＨＯ細胞においてヒトＦｃ（ε）ＲＩαのＩｇＥ結合ドメインを認識することが示された（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２００１：第１２９巻、発行物１ ５－１２）。多価Ｆａｂフラグメントを使用する抗腫瘍放射免疫療法に関する他の情報は、Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ（１９９９）８１、９７２－９８０に見出される。

【００４６】

他の高分子量タンパク質の例としては、ＡＡＴ、Ｄｎａｓｅ、スーパーオキシドジスムターゼ、サブチリシンおよび他のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。代表的に、高分子量は、タンパク質の特定の要求もしくは特定の特性またはその意図される使用に依存して、約２５，０００程度の分子量を有するタンパク質を示す。より低い分子量のタンパク質は、例えば、注射によって、高濃度で投与されるという同じ要求の範囲に対する、本発明の利益を享受し得る。このようなタンパク質は、当該分野において公知である；例えば、米国特許出願番号第１０／８９４，４１０号（２００４年７月１９日出願）および同第１０／８９６，３２６号（２００４年７月２１日出願）を参照のこと。

【００４７】

（微粒子、球状小粒子またはミクロスフェア）

本発明の微粒子またはミクロスフェアは、動的光散乱法（例えば、光相関分光法（ｐｈｏｔｏｃｏｒｒｅｌａｔｉｏｎ ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ）、レーザー回折、低角度レーザー光散乱（ＬＡＬＬＳ）、中角度レーザー光散乱（ｍｅｄｉｕｍｕ－ａｎｇｌｅ ｌａｓｅｒ ｌｉｇｈｔ ｓｃａｔｔｅｒｉｎｇ）（ＭＡＬＬＳ））によってか、光掩蔽法（ｌｉｇｈｔ ｏｂｓｃｕｒａｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ）（例えば、Ｃｏｕｌｔｅｒ分析法）によってか、または他の方法（例えば、レオロジーまたは顕微鏡（光学または電子））によって測定される場合、好ましくは２００ミクロン未満の幾何学的な平均粒子サイズを有し、代表的には約０．０１μｍ～約２００μｍ、代表的には約５０μｍ以下、より好ましくは０．１μｍ～１０μｍ、さらにより好ましくは約０．５μｍ～約５μｍ、および最も好ましくは約０．５μｍ～約３μｍの幾何学的な平均粒子サイズを有する。

【００４８】

上記球状小粒子またはミクロスフェアは、実質的に球状である。「実質的に球状」によって意味されることは、粒子の断面の最短の垂直軸に対する最長の垂直軸の長さの比が約１．５以下であることである。実質的に球状は、対称中心線を必要としない。さらに、この粒子は、表面のきめを有し得（例えば、粒子のサイズ全体と比較した場合の尺度に応じて小さい、線またはくぼみまたは隆起）、そしてなお実質的に球状である。より好ましくは、この粒子の、最長の軸と最短の軸との間の長さの比は、約１．３３以下である。最も好ましくは、この粒子の、最長の軸と最短の軸との間の長さの比は、約１．２５以下である。表面の接触は、保存の際にこの粒子の望ましくない集塊を最小化する、実質的に球状であるミクロスフェアにおいて最小化される。多くの結晶またはフレーク（ｆｌａｋｅ）

は、集塊がイオン性相互作用または非イオン性相互作用によって生じ得る場合、広い表面の接触面積を可能にし得る平面を有する。球は、非常に小さい面積に対する接触を可能にする。

【００４９】

この微粒子はまた、好ましくは実質的に同じ粒子サイズを有する。相対的に大きい粒子および小さい粒子の両方が存在する場合、広いサイズ分布を有する粒子は、より小さい粒子に、より大きい粒子の間の隙間を埋めることを可能にさせ、それによって、新しい接触表面を形成する。広いサイズ分布は、集塊を結合するために多くの接触機会をつくることによって、より大きな球を生じ得る。本発明の球状微粒子は、好ましくは狭いサイズ分布内にあり、それによって集塊と接触するための機会を最小化する。「狭いサイズ分布」によって意味されるものは、球状小粒子の１０パーセンタイルの体積粒径に対する９０パーセンタイルの球状小粒子の体積粒径の比が５以下である好ましい粒子サイズ分布である。より好ましくは、球状小粒子の１０パーセンタイルの体積粒径に対する９０パーセンタイルの球状小粒子の体積粒径は、３以下である。最も好ましくは、球状小粒子の１０パーセンタイルの体積粒径に対する９０パーセンタイルの球状小粒子の体積粒径の比は、２以下である。

【００５０】

幾何標準偏差（ＧＳＤ）もまた、狭いサイズ分布を示すために使用され得る。ＧＳＤの計算は、１５．９％未満および８４．１％未満の累積率における有効カットオフ径（ＥＣＤ）を決定する工程を包含する。ＧＳＤは、１５．９％未満のＥＣＤに対する８４．１７％未満のＥＣＤの比の平方根である。ＧＳＤは、ＧＳＤが２．５未満であり、より好ましくは１．８未満である場合に、狭いサイズ分布を有する。

【００５１】

本発明の好ましい形態において、微粒子中の活性な因子またはミクロスフェア中の活性な因子は、半結晶質か、または非結晶質か、または実質的に非晶質である。

【００５２】

上記ミクロスフェアは、好ましくは、実質的に非晶質であるか、または非結晶質である活性な因子からなり、すなわち、これらは、非晶質であるか、または半結晶質形態である。本明細書中で使用される場合、「非晶質の」とは、この活性な因子のほぼ無秩序な固体形態をいい、ミクロスフェア内で、タンパク質の結晶格子または他の活性な因子の結晶格子は、存在せず、そして「半結晶質」とは、活性な因子のほぼ無秩序な固体形態をいい、このミクロスフェアの活性な因子の内容物は、この活性な因子の５０％未満の結晶格子形態からなる。

【００５３】

代表的に、上記微粒子またはミクロスフェアは、実質的に非多孔性であり、そして０．５ｇ／ｃｍ^{3}より大きい密度を有し、より好ましくは０．７５ｇ／ｃｍ^{3}より大きい密度を有し、そして最も好ましくは約０．８５ｇ／ｃｍ^{3}より大きい密度を有する。この密度についての好ましい範囲は、約０．５ｇ／ｃｍ^3～約２ｇ／ｃｍ^{3}であり、そしてより好ましくは約０．７５ｇ／ｃｍ^3～約１．７５ｇ／ｃｍ^{3}であり、さらにより好ましくは約０．８５ｇ／ｃｍ^3～約１．５ｇ／ｃｍ^{3}である。本発明に従う実質的に非晶質であるか、または非結晶質である微粒子は、より容易に可溶化するか、またはそのように構成されない微粒子（例えば、結晶性微粒子）より速い溶解速度を示す。

【００５４】

本発明の微粒子またはミクロスフェアは、高含有量の上記活性な因子を示し得る。微粒子を調製する多くの他の方法に必要とされる、かなりの量の充填剤または同様の賦形剤に対する必要性は、存在しないが、特定の目的を達成するために所望されるような物質が、活性な因子に加えて含まれ得る。例えば、多くの用途において、このミクロスフェアは、この粒子の９５重量％以上を含む。代表的に、この活性な因子は、この粒子の約２０重量％～１００重量％で存在し、好ましくは約５０重量％～約１００重量％で存在し、より好ましくは約８０重量％～約１００重量％で存在し、さらにより好ましくは約９０重量％～

約１００重量％で存在する。本明細書中で範囲を記載する場合、それは、その中に任意の範囲または任意の範囲の組み合わせを含むことが、意味される。

【００５５】

本発明のさらなる局面は、上記微粒子またはミクロスフェアが、賦形剤の封入を伴うか、またはこれを伴わずに、上記活性な因子の生化学的完全性および生物活性を保持することである。

【００５６】

（粒子のインビボ送達）

本発明における活性な因子を含む微粒子、球状小粒子またはミクロスフェアは、この因子を必要とする被験体に対する注射可能な経路によるインビボ送達に適している。好ましい送達経路は、注射可能であり、これとしては、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、鞘内、硬膜外、動脈内、関節内などが挙げられる。他の送達経路（例えば、局所、経口、直腸、経鼻、肺、膣、口腔粘膜、舌下、経皮、経粘膜、耳または眼内）は、実施され得るが、代表的に、本発明の利点は、注射用途について、より明らかである。注入可能な送達経路は、本発明の目的のために最も好ましい。最も重要なことには、この微粒子またはミクロスフェアは、高分子量のタンパク質または活性な因子にもかかわらず、注射器中に吸引され得、そして細い針を通して注射され得る。好ましい送達経路は、細い針による注射であり、これらとしては、皮下、眼などが挙げられる。細い針によってとは、少なくとも２０ゲージのサイズの針、代表的には約２２ゲージと約３０ゲージ以上との間のサイズの針が意味される。有利には、この細い針は、少なくとも２４ゲージと同じ細さ、より有利には少なくとも２６ゲージと同じ細さ、そしてよりさらに有利には少なくとも２８ゲージと同じ細さであり得る。

【００５７】

上記微粒子またはミクロスフェアは、注射される組成物の１ｍｌあたり少なくとも約５０ｍｇのタンパク質の濃度で注射され得る。例えば、約１００ｍｇ～約８００ｍｇのタンパク質は、多くの用途について約１０ｍｌを超えず、そして通常少なくとも約２ｍｌの送達容量で注射可能である、また、この送達は、通常の注射時間の間に行われる。代表的に、このような時間は、長くても約２０秒以下である。

【００５８】

本明細書中に示される粒子の処方のための方法は、所望されるか、または必要とされるような賦形剤または他の成分もしくは添加剤を伴うか、またはこれらを伴わない粒子の処方を提供する。添加剤を使用せずにタンパク質自体からタンパク質の微粒子またはミクロスフェアを製造することはまた、本発明のアプローチであり、そして同時に使用についての優れた利点を提供する。

【００５９】

（微粒子を作製するための方法）

（連続相）

活性な因子の微粒子またはミクロスフェアを調製する本発明の方法は、単一の液相中の第１の溶媒に溶解された活性な因子および相分離増強剤を有する溶液を提供する工程で始まる。この溶液は、有機溶媒または混和性有機溶媒の混合物を含む有機系であり得る。この溶液はまた、水性媒体もしくは水混和性の有機溶媒もしくは水混和性の有機溶媒の混合物またはそれらの組み合わせを含む水性ベースの溶液であり得る。この水性媒体は、水、通常の生理食塩水、緩衝液、緩衝化した生理食塩水などであり得る。適切な水混和性の有機溶媒としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Ｎ－メチル－２－ピロリジノン（Ｎ－メチル－２－ピロリドン）、２－ピロリジノン（２－ピロリドン）、１，３－ジメチル－２－イミダゾリジノン（ＤＭＩ）、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド、酢酸、乳酸、アセトン、メチルエチルケトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール、３－ペンタノール、ｎ－プロパノール、ベンジルアルコール、グリセロール、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ＰＥＧ－４、ＰＥＧ－８、ＰＥＧ－９、ＰＥＧ－１２、ＰＥＧ－１４、ＰＥＧ－１６、

ＰＥＧ－１２０、ＰＥＧ－７５、ＰＥＧ－１５０、ポリエチレングリコールエステル、ＰＥＧ－４ジラウレート、ＰＥＧ－２０ジラウレート、ＰＥＧ－６イソステアレート、ＰＥＧ－８パルミトステアレート、ＰＥＧ－１５０パルミトステアレート、ポリエチレングリコールソルビタン、ＰＥＧ－２０ソルビタンイソステアレート、ポリエチレングリコールモノアルキルエーテル、ＰＥＧ－３ジメチルエーテル、ＰＥＧ－４ジメチルエーテル、ポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）、アルギン酸ポリプロピレン、ＰＰＧ－１０ブタンジオール、ＰＰＧ－１０メチルグルコースエーテル、ＰＰＧ－２０メチルグルコースエーテル、ＰＰＧ－１５ステアリルエーテル、プロピレングリコールジカプリレート／ジカプレート、プロピレングリコールラウレート、およびグリコフロール（ｇｌｙｃｏｆｕｒｏｌ）（テトラヒドロフルフリルアルコールポリエチレングリコールエーテル）、アルカン（例えば、プロパン、ブタン、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン）、またはそれらの組み合わせ。

【００６０】

上記単一の連続相は、第１の溶媒に可溶性であるか、または第１の溶媒と混和性である相分離増強剤の溶液を最初に提供することによって調製され得る。次いでこの溶液に、活性な因子が添加される。この活性な因子は、この溶液に直接添加され得るか、またはこの活性な因子は、最初に第２の溶媒中に溶解され得、次いでこの溶液に添加され得る。この第２の溶媒は、第１の溶媒と同じ溶媒であり得るか、またはこれは、上記の一覧から選択され、そして上記溶液と混和性である別の溶媒であり得る。活性な因子が、周囲温度以下でこの溶液に添加されることが、好ましく、これは、熱不安定性の分子（例えば、特定のタンパク質）について特に重要である。「周囲温度」によって示されるものは、約２０℃～約４０℃前後の室温の温度である。しかし、この系はまた、加熱が活性な因子の活性の有意な減少を生じない限り、この系における活性な因子の溶解性を増加させるために加熱され得る。

【００６１】

（相分離増強剤）

本発明の相分離増強剤（ＰＳＥＡ）は、上記溶液が、相分離の工程に供されるとき、この溶液からの活性な因子の液相－固相分離を増強するか、または誘導し、この工程において、この活性な因子は、固体または半固体になって、不連続相として球状小粒子の懸濁物を形成する一方で、この相分離増強剤は、連続相に溶解したままである。この相分離増強剤は、この溶液が相分離状態に提供されるとき、活性な因子の溶解性を減少させる。適切な相分離増強剤としては、この溶液に溶解するか、またはこの溶液と混和性である、ポリマーまたはポリマーの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。適切なポリマーの例としては、直鎖状ポリマーまたは分枝状ポリマー、コポリマーおよびブロックコポリマーが挙げられる。これらのポリマーは、水溶性、半水溶性、水混和性、または不溶性であり得る。

【００６２】

本発明の好ましい形態において、上記相分離増強剤は、水溶性または水混和性である。使用され得るポリマーの型としては、炭水化物ベースのポリマー、多価脂肪族アルコール、ポリ（ビニル）ポリマー、ポリアクリル酸、多価有機酸、ポリアミノ酸、コポリマーおよびブロックコポリマー（例えば、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ１２７またはＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８のようなポロキサマー）、ｔｅｒｔ－ポリマー、ポリエーテル、天然に存在するポリマー、ポリアミド、界面活性剤、ポリエステル、分枝状ポリマーおよび環状ポリマー、ならびにポリアルデヒドが挙げられる。

【００６３】

好ましいポリマーは、活性な因子の粒子の投与の意図される経路のための薬学的添加剤として受容可能であるポリマーである。好ましいポリマーは、薬学的に受容可能な添加剤（例えば、種々の分子量のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）（例えば、ＰＥＧ　２００、ＰＥＧ　３００、ＰＥＧ　３３５０、ＰＥＧ　８０００、ＰＥＧ　１００００、ＰＥＧ　２００００など）および種々の分子量のポロキサマー（例えば、ポロキサマー１８８お

よびＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ１２７またはＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８））である。なお別の好ましいポリマーは、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）である。なお別の好ましいポリマーは、ヒドロキシエチルデンプンである。他の両親媒性ポリマーはまた、単独かまたは組み合わせて使用され得る。上記相分離増強剤はまた、非ポリマー（例えば、プロピレングリコールおよびエタノールの混合物）であり得る。

【００６４】

（液相－固相分離）

上記溶液における活性な因子の液相－固相分離は、当該分野において公知である任意の方法（例えば、温度の変化（上昇または低下のいずれか）、圧力の変化、ｐＨの変化、溶液のイオン強度の変化、活性な因子の濃度の変化、相分離増強剤の濃度の変化、溶液の容量オスモル濃度の変化、これらの組み合わせなど）によって誘導され得る。

【００６５】

本発明の好ましい実施形態において、上記相変化は、温度誘導性の相変化である。多くの実施形態において、この温度誘導性の相変化は、温度を上記溶液中の活性な因子の相転移温度以下に下げることによって達成される。

【００６６】

図１は、溶媒、ＰＳＥＡおよび活性な因子を含有する溶液についての二元系相図１０である。この図は、溶液の温度に対して活性な因子の濃度をプロットする。上記ＰＳＥＡの濃度は、一定に保たれる。

【００６７】

図１の図表は、以下を有する：飽和曲線１２；過飽和曲線１４；それらの間の準安定領域１６；全ての構成要素が液相中にあり、この系が均質な、単一の液相にある場合、飽和曲線より下の第１の領域１８；およびこの系が、活性な因子の固相ならびにＰＳＥＡおよび溶媒の液相を有する二相系である場合、過飽和曲線より上の第２の領域２０。この相図は、系の温度および純粋な液相中の構成要素の相対濃度、液相－固相ならびにこれらの２つの相の間の転移を取り巻く状態を決定するのに役立つ。

【００６８】

本明細書中に開示されるように、上記活性な因子の微粒子またはミクロスフェアの調製は、溶液が存在し得る任意の固相と平衡状態にある場合、主に、点Ａにて飽和に達する不飽和溶液（図１中の点Ａ’）からの冷却を包含する。さらなる冷却において、この溶液が所定の温度での平衡溶解度に対応するものよりも活性な因子を含む場合、ある状態に到達する；従って、この溶液は、過飽和状態になる。この固相の自発的な形成は、点Ｂに到達するまで、生じない。点Ｂは、準安定区域の境界線上の点である。この準安定区域の幅は、最大に達し得る不十分な冷却$\Delta T_{max}=T_2-T_1$によってか、または過飽和$\Delta C_{max}=C^*_2-C^*_1$によって表わされ得る。これら２つの表示は、熱力学方程式：

【００６９】

【化１】

$$\Delta C_{max} \simeq C_2^* - C_1^* = \int_{T_1}^{T_2} \left(\frac{\partial C^*}{\partial T} \right) dT \cong \Delta T_{max} \left(\frac{dC^*}{dT} \right)$$

である。

【００７０】

経路Ａ’－Ａ－Ｂは、準安定な溶液を調製する多重熱法（ｐｏｌｙｔｈｅｒｍａｌ　ｍｅｔｈｏｄ）を表わす。等温プロセスにおいて、出発点は、Ａ’’である。一定温度において濃度を増加させることによって、飽和は、点Ａにて再び達成される。点Ｃまでの濃度の等温性増加（例えば、溶媒エバポレーションによってか、活性な因子のシード添加／添加による）は、再び準安定性の限界に達するまで、この溶液を準安定領域に移動させる。準安定限界（ｍｅｔａｓｔａｂｌｅ　ｌｉｍｉｔ）を超える場合、この溶液は、不安定となり、そして直ちに自発的な固相の形成を生じる。

【００７１】
等温的に得られた値（$\Delta C_{max})_T = C^*_3 - C^*_2$は、多重熱的に得られた$\Delta T_{max} = T_3 - T_2$の対応する値と異なり得る。準安定区域の境界線に近づく場合、固体粒子の形成のために必要な時間は、準安定限界に達するまで、減少する。
【００７２】
多重熱プロセスにおいて、冷却速度は、制御速度にて行われて、粒子のサイズおよび形を制御する。制御速度によって意味されるものは、約０．２℃／分～約５０℃／分であり、より好ましくは０．２℃／分～３０℃／分である。変化の速度は、一定であるかまたは線形、非線形であるか、間欠性であるか、またはプログラム化された速度（複数の相のサイクルを有する）であり得る。この粒子は、この溶液中のＰＳＥＡから分離され得、そして以下に考察されるように洗浄されることによって精製され得る。
【００７３】
本発明は、活性な因子が、液体状態から固体状態になる一方で、ＰＳＥＡおよび溶媒は、相変化を受けず、そして液体のままである場合、相変化を生じるために活性な因子の濃度、ＰＳＥＡの濃度、温度またはこれらの任意の組み合わせを調整する工程を企図する。相変化を増強するか、促進するか、制御するかまたは抑制するためにｐＨ、イオン強度、重量オスモル濃度などを変化させる工程がまた、企図される。凝固点が比較的高いか、または凝固点が、相転移温度を上回る溶液に関して、この溶液は、系を凝固させずにこの系における相変化を可能にするためにこの系の凝固点を下げる凝固点降下剤（例えば、プロピレングリコール、スクロース、エチルレングリコール、アルコール（例えば、エタノール、メタノール）または凝固点降下剤の水性混合物）を含む。このプロセスはまた、温度が系の凝固点以下に減少されるように行われ得る。本明細書中に記載されるプロセスは、特に、熱不安定性である分子（例えば、タンパク質）に適している。
【００７４】
（任意の賦形剤）
本発明の微粒子は、１種以上の賦形剤を含み得る。これらの賦形剤は、さらなる特性（例えば、この微粒子もしくはこの活性な因子もしくはキャリア因子の増加した安定性、この微粒子からの活性な因子の制御された放出または生物学的組織によるこの活性な因子の改変された浸透）によって、この活性な因子またはこの粒子を染み込ませ得る。適切な賦形剤としては、炭水化物（例えば、トレハロース、スクロース、マンニトール）、カチオン（例えば、Zn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}）、アニオン（例えば、SO_4^{2-}）、アミノ酸（例えば、グリシン）、脂質、リン脂質、脂肪酸、界面活性剤、トリグリセリド、胆汁酸またはそれらの塩（例えば、コール酸またはその塩（例えば、コール酸ナトリウム）；デオキシコール酸またはその塩）、脂肪酸エステル、およびＰＳＥＡのポリマーとしての機能を下回るレベルで存在するポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。賦形剤が使用される場合、この賦形剤は、溶液の相図にあまり影響しない。
【００７５】
（粒子を分離する工程および洗浄する工程）
本発明の好ましい実施形態において、上記微粒子またはミクロスフェアは、上記溶液中の相分離増強剤からこれらを分離することによって回収される。なお別の好ましい実施形態において、分離の方法は、液体媒体で微粒子またはミクロスフェアを含む溶液を洗浄することにより、この液体媒体において、活性な因子は、この液体媒体に溶解しないが、相分離増強剤は、この液体媒体に溶解する。いくつかの洗浄方法は、ダイアフィルトレーションによるか、遠心分離によって行われ得る。この液体媒体は、水性媒体または有機溶媒であり得る。低い水溶性を有する活性な因子に関して、この液体媒体は、水性媒体またはこの活性な因子の水溶性を減少させる因子（例えば、２価のカチオン）を含む水性媒体であり得る。高い水溶性を有する活性な因子（例えば、多くのタンパク質）に関して、有機溶媒またはタンパク質沈殿剤（例えば、硫酸アンモニウム）を含む水性溶媒が、使用され得る。
【００７６】

本発明の好ましい実施形態において、上記微粒子またはミクロスフェアは、上記溶液中において相分離増強剤からこれらを分離することによって回収される。なお別の好ましい実施形態において、分離の方法は、液体媒体で微粒子またはミクロスフェアを含む溶液を洗浄することにより、この液体媒体において、活性な因子は、この液体の媒体に溶解しないが、相分離増強剤は、この液体媒体に溶解する。いくつかの洗浄方法は、ダイアフィルトレーションによるか、または遠心分離によって行われ得る。この液体の媒体は、水性媒体または有機溶媒であり得る。低い水溶性を有する活性な因子に関して、この液体の媒体は、水性媒体またはこの活性な因子の水溶性を減少させる因子（例えば、２価のカチオン）を含む水性媒体であり得る。高い水溶性を有する活性な因子（例えば、多くのタンパク質）に関して、有機溶媒またはタンパク質沈殿剤（例えば、硫酸アンモニウム）を含む水性溶媒が、使用され得る。

【００７７】

液体媒体として使用するのに適切な有機溶媒の例としては、連続相に適するとして上記で特定されるような有機溶媒が挙げられ、そしてより好ましくは塩化メチレン、クロロホルム、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノール、エタノール、ペンタンなどが挙げられる。これらの溶媒のいずれかの混合物を使用することもまた、企図される。１つの好ましい混合物（ｂｌｅｎｄ）は、塩化メチレンまたは塩化メチレンとアセトンとの１：１の混合物である。これらの液体媒体は、例えば、凍結乾燥、エバポレーション、または乾燥による容易な除去のために、低い沸点を有することが好ましい。

【００７８】

上記液体媒体はまた、超臨界流体（例えば、液体二酸化炭素またはその超臨界点に近い流体）であり得る。超臨界流体は、相分離増強剤（特に、いくつかのポリマー）に対して適切な溶媒であり得るが、タンパク質粒子に対しては非溶媒である。超臨界流体は、それ自体でか、または共溶媒と共に使用され得る。以下の超臨界流体が、使用され得る：液体CO_2、エタン、またはキセノン。潜在的な共溶媒は、アセトニトリル、ジクロロメタン、エタノール、メタノール、水、または２－プロパノールであり得る。

【００７９】

本明細書中に記載されるＰＳＥＡから上記微粒子またはミクロスフェアを分離するのに使用される液体媒体は、この液体媒体中の上記活性な因子の溶解度を減少させる因子を含み得る。この微粒子またはミクロスフェアの収率を最大化するために、この粒子がこの液体媒体中で最小限の溶解度を示すことが最も望ましい。いくつかのタンパク質（例えば、インスリン）に関して、溶解性の減少は、２価陽イオンの添加（例えば、タンパク質に対するZn^{2+}）によって達成され得る。複合体を形成するために使用され得る他のイオンとしては、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}などが挙げられるが、これらに限定されない。複合体の溶解性は、水溶液中の複合体のダイアフィルトレーションを可能にするために十分低い。

【００８０】

上記液体媒体はまた、１種以上の賦形剤を含み得、これらの賦形剤は、さらなる特性（例えば、これまでに議論したような微粒子および／または活性因子もしくはキャリア因子の増加した安定性、この粒子からの活性な因子の制御された放出、または生物学的組織によるこの活性な因子の改変された浸透）によって、この活性な因子またはこの微粒子を染み込ませ得る。本発明の別の形態において、この微粒子またはミクロスフェアは、溶液を含むＰＳＥＡから分離されない。

【００８１】

（水性ベースのプロセス）

別の好ましい実施形態において、本発明の系の製造プロセスは、水性溶媒または水混和性溶媒を備える水性系の製造プロセスである。適切な水混和性溶媒の例としては、連続相について上記で特定された水混和性溶媒が挙げられるが、これらに限定されない。水性ベースのプロセスを使用する１つの利点は、この溶液が、緩衝化され得、そして活性な因子を保護するために生化学的な安定化を提供する賦形剤を含み得ることである。このことは

、この活性な因子がタンパク質である場合に特に有利である。

【００８２】

（予備製造された微粒子のマイクロカプセル化）

本発明の微粒子またはミクロスフェアは、マイクロカプセル化粒子を形成するためにマトリックスの壁形成（ｗａｌｌ－ｆｏｒｍｉｎｇ）物質内にさらにカプセル化され得る。このマイクロカプセル化は、当該分野で公知の任意のプロセスによって達成され得る。好ましい実施形態において、本発明の微粒子またはミクロスフェアのマイクロカプセル化は、以下に記載されるような、乳化／溶媒抽出プロセスによって達成される。このマトリックスは、この活性な因子に徐放特性を与え得、この特性は、所望の治療用途に従って数分間から数時間、数日間または数週間持続する放出速度を生じる。このマイクロカプセル化微粒子またはマイクロカプセル化ミクロスフェアはまた、この活性な因子の遅延放出処方物を生成し得る。微粒子およびミクロスフェアを作製するさらなる方法は、本願中に示される。

【００８３】

この乳化／溶媒抽出プロセスにおいて、乳化は、２つの不混和性の相（連続相および不連続相（これらは、分散相としても知られている））を混合してエマルションを形成することによって得られる。好ましい実施形態において、この連続相は、水層（すなわち水の相）であり、そしてこの不連続相は、有機相（すなわち油の相）であって、水中油（Ｏ／Ｗ）型エマルションを形成する。この不連続相は、微細な懸濁物または油中固体（Ｓ／Ｏ）相を形成する微細な分散のいずれかとして本発明の固体粒子の分散物をさらに含み得る。この有機相は、好ましくは水不混和性であるか、または部分的に水混和性の有機溶媒である。水相に対する有機相の重量の比は、約１：９９～約９９：１であり、より好ましくは１：９９～約４０：６０であり、そして最も好ましくは約２：９８～約１：３であり、またはこれらの中の任意の範囲であるか、もしくは範囲の組み合わせである。好ましい実施形態において、水相に対する有機相の比は、約１：３である。本発明のこの局面は、油相が連続相を形成し、そして水相が不連続相を形成する、逆エマルションは、すなわち油中水型エマルション（Ｗ／Ｏ）の利用を、さらに企図する。このことは、２つより多い相を有するエマルション（例えば、油中水中油型（ｏｉｌ－ｉｎ－ｗａｔｅｒ－ｉｎ－ｏｉｌ）エマルション（Ｏ／Ｗ／Ｏ）または水中油中水型（ｗａｔｅｒ－ｉｎ－ｏｉｌ－ｉｎ－ｗａｔｅｒ）エマルション（Ｗ／Ｏ／Ｗ））の利用を、さらに企図する。

【００８４】

本発明に対するこのバリエーションの好ましい実施形態において、乳化／溶媒抽出プロセスを使用するマイクロカプセル化のプロセスは、これまでに記載された方法および壁形成物質を含む有機相によって予備製造された（ｐｒｅ－ｆａｂｒｉｃａｔｅｄ）微粒子またはミクロスフェアを調製する工程で始まる。この予備製造された微粒子またはミクロスフェアは、壁形成物質の有機相中に分散されて、油相中に予備製造された微粒子またはミクロスフェアの分散物を含む油中固体型（Ｓ／Ｏ）相を形成する。好ましい実施形態において、この分散は、微粒子またはミクロスフェアおよび有機相の混合物をホモジナイズすることによって生成される。水性媒体は、この連続相を形成する。この場合において、水相でＳ／Ｏ相を乳化することによって形成されるエマルション系は、水中油中固体型（ｓｏｌｉｄ－ｉｎ－ｏｉｌ－ｉｎ－ｗａｔｅｒ）（Ｓ／Ｏ／Ｗ）エマルション系である。

【００８５】

上記壁形成物質とは、個々か、または組み合わせて、マトリックスの構造の本質を形成し得る物質をいう。生物分解性壁形成物質が、好ましい（特に、注射可能な適用のために）。このような物質の例としては、ポリ－ラクチド／ポリ－グリコリドポリマー（ＰＬＧＡ’ｓ）、ポリエチレングリコール結合体化ＰＬＧＡ（ＰＬＧＡ－ＰＥＧ）、およびトリグリセリドのファミリーが挙げられるが、これらに限定されない。ＰＬＧＡまたはＰＬＧＡ－ＰＥＧが使用される実施形態において、好ましくは、ＰＬＧＡは、ポリ－グリコリドに対するポリ－ラクチドの、１００：０～０：１００の比、より好ましくは約９０：１０～約１５：８５の比、および最も好ましくは約５０：５０の比を有する。一般的に、ポリ

マー中のポリーラクチドに対するポリーグリコリドの比が高ければ、マイクロカプセル化粒子は、より親水性であり、より速い水和およびより速い分解を生じる。種々の分子量のＰＬＧＡもまた、使用され得る。一般的に、ポリマー中のポリーグリコリドおよびポリーラクチドの同じ比に関して、ＰＬＧＡの分子量が高ければ、この活性な因子の放出は、よりゆっくりであり、そしてこのマイクロカプセル化粒子またはスフェアのサイズの分布は、より広くなる。

【００８６】

マイクロカプセル化が実施される場合、水中油型（Ｏ／Ｗ）エマルションまたは水中油中固体型（Ｓ／Ｏ／Ｗ）エマルションの有機相（油相）中の有機溶媒は、水不混和性または部分的に水不混和性であり得る。「水不混和性溶媒」によって意味されるものは、１：１の比で水溶液と混合した場合（Ｏ／Ｗ）に、界面のメニスカスを形成する溶媒である。適切な水不混和性溶媒としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：炭素数が５以上である置換もしくは非置換の、直鎖状アルカン、分枝状アルカンまたは環状アルカン、炭素数が５以上である置換もしくは非置換の、直鎖状アルケン、分枝状アルケンまたは環状アルケン、炭素数が５以上である置換もしくは非置換の、直鎖状アルキン、分枝状アルキンまたは環状アルキン；芳香族炭化水素、完全か、または部分的にハロゲン化した炭化水素、エーテル、エステル、ケトン、モノー、ジーもしくはトリーグリセリド、ネイティブな油、アルコール、アルデヒド、酸、アミン、直鎖状シリコーンまたは環状シリコーン、ヘキサメチルジシロキサン、またはこれらの溶媒の任意の組み合わせ。ハロゲン化溶媒としては、四塩化炭素、塩化メチレン、クロロホルム、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、トリクロロエタン、ヒドロフルオロカーボン、塩素化ベンゼン（モノ、ジ、トリ）、トリクロロフルオロメタンが挙げられるが、これらに限定されない。特に適切な溶媒は、塩化メチレン、クロロホルム、ジエチルエーテル、トルエン、キシレンおよび酢酸エチルである。「部分的に水混和性の溶媒」によって意味されるものは、１つの濃度において水不混和性であり、そしてより低い別の濃度においてにおいて水混和性である溶媒である。これらの溶媒は、水混和性が制限されており、そして自発的エマルションを形成し得る溶媒である。部分的に水混和性である溶媒の例は、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）、プロピレンカーボネート、ベンジルアルコール、および酢酸エチルである。

【００８７】

界面活性化合物は、例えば、有機相の湿潤特性を増加させるためにマイクロカプセル化の局面に関連して添加され得る。界面活性化合物は、水相、有機相、ならびに水性媒体および有機溶液の両方に対する乳化プロセス前、またはエマルションへの乳化プロセス後に添加され得る。界面活性化合物の使用は、カプセル化されていないか、または部分的にカプセル化された球状小粒子の数を減少させ得、このことは、放出の間の上記活性な因子の初期のバースト（ｂｕｒｓｔ）の減少を生じる。これらの界面活性化合物は、化合物の溶解性に依存して、有機相、または水相、または有機相および水相の両方に対して添加され得る。

【００８８】

用語「界面活性化合物」によって意味されるものは、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤または生物学的な界面活性分子のような化合物である。これらの界面活性化合物は、どのような場合であっても、約０．０１重量％未満～約３０重量％、より好ましくは約０．０１重量％～約１０重量％、またはこれらの任意の範囲または範囲の組み合わせで、水相または有機相またはエマルションに含まれるべきである。

【００８９】

適切なアニオン性界面活性剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ラウリル酸カリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、硫酸アルキルポリオキシエチレン、アルギン酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸およびそれらの塩、グリセリルエステル、カルボキシメ

チルセルロースナトリウム、コール酸および他の胆汁酸（例えば、コール酸、デオキシコール酸、グリココール酸、タウロコール酸、グリコデオキシコール酸）ならびにそれらの塩（例えば、デオキシコール酸ナトリウムなど）。

【００９０】

適切なカチオン性界面活性剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：四級アンモニウム化合物（例えば、塩化ベンザルコニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化ラウリルジメチルベンジルアンモニウム、塩酸アシルカルニチン、またはハロゲン化アルキルピリジニウム。アニオン性界面活性剤として、リン脂質が、使用され得る。適切なリン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、リゾリン脂質、卵のリン脂質もしくは大豆のリン脂質またはそれらの組み合わせが挙げられる。これらのリン脂質は、塩であっても、脱塩されていてもよいし、水素化されていても部分的に水素化されていてもよく、天然か、半合成かまたは合成であってもよい。

【００９１】

適切な非イオン性界面活性剤としては、以下が挙げられる：ポリキシエチルエチレン脂肪アルコールエーテル（ＭａｃｒｏｇｏｌおよびＢｒｉｊ）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（ポリソルベート）、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル（Ｍｙｒｊ）、ソルビタンエステル（Ｓｐａｎ）、モノステアリン酸グリセロール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、セチルアルコール、セトステアリルアルコール、ステアリルアルコール、アリールアルキルポリエーテルアルコール、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマー（ポロキサマー）、ポロキサミン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、および多糖類（デンプンおよびデンプン誘導体（例えば、ヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）、メチルセルロース、ヒドロキシセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、および非晶質セルロースが挙げられる）。本発明の好ましい形態において、非イオン性界面活性剤は、ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンとのコポリマーであり、そして好ましくはプロピレングリコールとエチレングリコールとのブロックコポリマーである。このようなポリマーは、商品名ＰＯＬＯＸＡＭＥＲ（時にはＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）ともいわれる）で販売され、そしてＳｐｅｃｔｒｕｍ Ｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｒｕｇｅｒを含むいくつかの供給業者によって販売される。とりわけ、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルとしては、短いアルキル鎖を有するものが挙げられる。このような界面活性剤の一例は、ＢＡＳＦ Ａｋｔｉｅｎｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔによって製造されるＳＯＬＵＴＯＬ（登録商標）ＨＳ １５（ポリエチレン－６６０－ヒドロキシステアレート）である。生物学的な表面活性分子としては、アルブミン、カゼイン、ヘパリン、ヒルジン、ヘタスターチまたは他の適切な生物適合性因子のような分子が挙げられる。

【００９２】

本発明のマイクロカプセル化の選択の好ましい形態において、水相は、界面活性化合物としてタンパク質を含む。好ましいタンパク質は、アルブミンである。このタンパク質はまた、賦形剤として機能し得る。タンパク質が界面活性化合物でない実施形態において、他の賦形剤は、エマルション中に含まれ得、乳化プロセスの前または後のいずれかにおいて添加され得る。適切な賦形剤としては、糖類、二糖類、および糖アルコールが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい二糖類は、スクロースであり、そして好ましい糖アルコールはマンニトールである。

【００９３】

さらに、チャネリング剤（ｃｈａｎｎｅｌｉｎｇ ａｇｅｎｔ）（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ））の使用は、最終生成物の水浸透速度を増加させ得る。水浸透速度を増加は、マトリックスが存在する場合、水和速度を改変することによって、マトリックスからの活性な因子の初期放出動態の改変、ならびにマトリックスの分解速度および分解依存性の放出動態の改変を生じる。カプセル化の間にチャネリング剤としてＰＥＧを使

用することは、ＰＥＧが相分離増強剤として使用される球状小粒子の製造の間の洗浄プロセスのうちの、除去工程部分について有利であり得る。さらに、連続相の塩分およびｐＨは、このポリマーおよび得られる微粒子またはミクロスフェアの性質に影響を及ぼすために変えられ得、この性質としては、マトリックスの充填密度、表面の電荷、ぬれ、空隙率、粘性、粒子サイズ分布、ならびにマトリックスからのカプセル化治療因子の初期のバーストおよび放出動態が挙げられる。連続相の塩分はまた、２つの相の混和性を減少させるために使用され得る。適切な塩としては、水溶性のリン酸塩、硫酸塩、酢酸塩、および炭酸塩、Ｔｒｉｓ、ＭＥＳ、ＨＥＰＥＳが挙げられるが、これらに限定されない。塩が使用される実施形態において、塩濃度は、０Ｍ～１０Ｍの範囲であり、より好ましくは１ｍＭ～１Ｍの範囲であり、および最も好ましくは２０ｍＭ～２００ｍＭの範囲である。ｐＨは、１～１１の範囲であり、より好ましくは２．５～９の範囲であり、そして最も好ましくは６～８の範囲である。

【００９４】

有機相（油相）中の微粒子またはミクロスフェアを分散させる工程の後、水性媒体（水相）の連続相は、例えば、均質化または超音波処理によって、この有機相の不連続相と激しく混合されて、未発達のマイクロカプセル化粒子の乳化小滴を含むエマルションを形成する。この水性の連続相は、乳化小滴からの有機溶媒の急な抽出を最小化するために、水相と有機相とを混合する前に、有機相に使用される有機溶媒を用いて飽和され得る。この乳化プロセスは、実施される場合には、混合物がその液体の性質を維持し得る任意の温度で行われ得る。エマルション安定性は、有機相または水相中の界面活性化合物の濃度の関数であるか、または界面活性化合物が乳化プロセス後にエマルションに添加される場合には、このエマルション中の界面活性化合物の濃度の関数である。これは、このエマルション系（未発達のマイクロカプセル化粒子）の小滴のサイズ、ならびにマイクロカプセル化粒子のサイズおよびサイズ分布を決定する因子の１つである。マイクロカプセル化粒子のサイズ分布に影響する他の因子は、連続相の粘性、不連続相の粘性、乳化の間のせん断力、界面活性化合物型および濃度、ならびに油／水の比である。

【００９５】

乳化後、エマルションは、硬化媒体（ｈａｒｄｅｎｉｎｇ　ｍｅｄｉｕｍｕ）中に移される。この硬化媒体は、未発達のマイクロカプセル化粒子から不連続相中の溶媒を抽出し、乳化小滴の近傍内の予備製造された微粒子またはミクロスフェアの周囲に、固形のポリマーマトリックスを有する固形のマイクロカプセル化粒子の形成を生じる。Ｏ／ＷまたはＳ／Ｏ／Ｗ系の実施形態において、この硬化媒体は、水性媒体であり、この水性媒体は、界面活性化合物、もしくは増粘剤、または他の賦形剤を含み得る。このマイクロカプセル化粒子は、好ましくは球状であり、そして約０．６～約３００μｍ、およびより好ましくは約０．８～約６０μｍの粒子サイズを有する。さらに、好ましくは、このマイクロカプセル化粒子は、粒子サイズの狭い分布を有する。不連続相の抽出時間を減少させるために、加熱または減圧が、この硬化媒体に適用され得る。未発達のマイクロカプセル化粒子からの不連続相の抽出速度は、不連続相の迅速な除去（例えば、エバポレーション（沸騰効果））が、マトリックスの連続性の破壊を生じるので、最終的な固形のマイクロカプセル化粒子中の空隙率の程度において重要な因子である。

【００９６】

乳化プロセスの好ましい実施形態において、乳化プロセスが実施される場合には、この乳化プロセスは、バッチプロセスの代わりに連続的な様式で行われる。図４１は、このことに関して使用され得る連続的乳化反応器の設計を示す。

【００９７】

カプセル化が実施される他の実施形態において、上記活性な因子の微粒子またはミクロスフェアをカプセル化する硬化した壁形成ポリマーマトリックスは、遠心分離および／または濾過（ダイアフィルトレーションを含む）によって、さらに回収され、そして水で洗浄される。残りの液相は、凍結乾燥またはエバポレーションのようなプロセスによってさらに除去され得る。

【００９８】
微粒子またはミクロスフェアは、表面官能基の特性を制御することによって粒子の特性を標的化された特性に修正するために選択された高分子電解質の少なくとも１つ以上の層中にカプセル化され得る。このような微粒子は、粒子の表面の特性に影響を及ぼすために、反対の電荷のポリマー（ポリイオン）と共に水性媒体中に浸される。これらの粒子が、ζ電位測定によって決定されるような負の電荷を有する場合、このポリマーの第１の層は、正である。これらの粒子が、最初に正の電荷を有する場合、この第１のポリマー層は、負である。この第１の層の沈着は、水、緩衝液、またはいくつかの水混和性の有機溶媒を含む水溶液中で行われ得る。
【００９９】
コロイド性の不安定なタンパク質微粒子の場合には、溶解性を減少させる他の因子が、導入され得る。溶解性を減少させる低分子量の因子／粘度増強因子（例えば、アルコール、グリセロールなど）およびポリマー（例えば、水溶性ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ヘタスターチ、デキストランなど）は、この目的のために使用され得る。コーティング物質とのインキュベーションは、粒子の溶解性を制御するために、室温および、より低い温度にて行われ得る。
【０１００】
粒子は、必要とされる量の時間（数分間～数時間）の間、上記ポリマーと一緒にインキュベートされ得る。次いでコーティングされた粒子の懸濁物は、遠心分離またはダイアフィルトレーションのいずれかによって過剰な非結合性のポリマーから単離され得る。これらの粒子は、好ましくは水溶液または上記の溶解性を減少させる因子を含む溶液のいずれかにおいて、残留するポリマーから洗浄される。温度は、活性物質およびコーティング物質の溶解性に基づいて最適化される。
【０１０１】
洗浄工程が完了した後、反対の電荷を有するポリマーの次の層が、導入される。この手順は、これまでのサイクルにあるように繰り返され得る。沈着したポリマー層の数は、所望される用途に依存し得る。この数は、例えば、表面改変のための１つの層と、必要とされる溶解速度に依存する徐放用途のための１０～２０の二重層とで変えられ得る。
【０１０２】
使用され得るポリマーとしては、以下の一覧が挙げられるが、これらに限定されない：ポリスチレンスルホネート（ＰＳＳ）および塩酸ポリアリルアミン（ＰＡＨ）、ポリアクリル酸（ＰＡＡ）、ポリ（塩化ジアリルジメチルアンモニウム）（ＰＤＤＡ）、および生体適合性ポリマー（例えば、デキストラン硫酸、キトサン、硫酸キトサン、ポリリジン、ゼラチン、アルギナート、プロタミン、硫酸プロタミン、キサンタンガムなど）、およびまた荷電した脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンなど）。
【０１０３】
交互吸着（ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ　ｌａｙｅｒ－ｂｙ－ｌａｙｅｒ）アプローチにおいて、ポリイオンの第１の層はまた、この系中に存在するポリマー（例えば、ＰＥＧ）の除去を伴わずに、粒子の制御された沈殿の最後に添加され得る。さらに、脂質構造体（例えば、リポソーム）は、反対に荷電したポリマーによる交互の沈着において使用され得、そして荷電した脂質と非荷電の脂質との間の比は、この殻の透過性を最小限にするために最適化され得る。いくつかの場合では、２価のカチオン（例えば、亜鉛）の存在下において交互吸着アセンブリを行うことが好まれ得る。
【実施例】
【０１０４】
（実施例１）
この実施例は、注入可能な抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの５００μｌバッチを調製するための基本的な手順を提供する。このモノクローナル抗体の５００μｌの１０個のバッチは、エッペンドルフチューブにおいて以下のように調製される：

４０mM酢酸アンモニウム（ＡＡ）緩衝液（ｐＨ＝６．５）の調製。４０mMのＡＡ緩衝液は、１リットルの脱イオンH_2Oに３．０８グラムのＡＡ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ）を溶解することによって調製される。このＡＡは、容易に溶解し、そして約６．４のｐＨを有する緩衝溶液を形成する。このｐＨを希釈水酸化アンモニウムによってｐＨ＝６．５に調整する。

【０１０５】

５００mＬの４０mM ＡＡ緩衝溶液中の１０％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ １８８の調製。５０グラムのＰｏｌｏｘａｍｅｒ １８８（ＢＡＳＦ）は、５００mＬの４０mM ＡＡ緩衝液（工程１に記載されるような）に溶解される（ただし、ｐＨ調整は、この時点で必要ではない）。この量のＰｏｌｏｘａｍｅｒの溶解は、数回の添加によって行われ得る。最終ｐＨは、ｐＨ約６．４付近である。この溶液は、０．２２フィルターを用いて濾過され、そして冷蔵で保持される。

【０１０６】

緩衝液の交換。２ ＰＤ１０脱塩カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）は、５mＬのタンパク質に対して使用される。カラムの総容量は、３．５mＬであり、そしてこれは、各２．５mＬを超えない交換が推奨される。各カラムは、２５mＬ未満の４０mM NH_4OAc緩衝液によってリンスされて、この緩衝液によってカラムが飽和される必要がある。その後、２．５mＬのリン酸緩衝液中の抗第ＶＩＩＩ因子が、このカラム中に挿入される。次いでさらに１mＬのNH_4OAc緩衝液が、挿入されて、このカラムを満たす。このタンパク質は、さらに２．５mＬの４０mM NH_4OAc緩衝液を注射することによって収集される。

【０１０７】

好ましい透析カセットは、３～１２mＬの総容量および１０，０００ダルトンのMWカットオフを有する１ Ｐｉｅｒｃｅであり、５mＬの上記タンパク質に対する緩衝液を置換する。このカセットを、脱イオンH_2Oと共に使用する前に、（例えば、１８Ｇ１／２の針を有する５mＬ～１０mＬの注射器を使用することによって）水和する。最初に、空気がこのカセット中に注射されて、メンブレンの壁が分離される。その後、このサンプルが、注射される。空気がこのカセットから引き抜かれて、より良好なサンプルとメンブレンとの接触が有される。最後に、フロート（ｆｌｏａｔ）がこのカセット上に添加され、そしてこのカセットは、低速で回転する。経験則として、それぞれの緩衝液交換は、少なくとも １０倍容量であるべきである。

【０１０８】

タンパク質濃度。タンパク質濃度は、２８０ｎｍでの吸光度を測定すること、および検量線によって決定される。必要に応じて、このタンパク質は、所望の作業濃度に従って緩衝液を含み得る。

【０１０９】

１０％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ溶液のｐＨは、酢酸によってｐＨ＝６．０およびｐＨ＝６．１に調整される。５mＬのこのタンパク質は、５００μｌの１０個のバッチに分割される。その後、１０００μＬの４０mM ＡＡ中の１０％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ １８８（ｐＨ＝６．０）が、５個のエッペンドルフチューブに添加され、そして１０００μＬの４０mM ＡＡ中の１０％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ １８８（ｐＨ＝６．１）が、他の５個のエッペンドルフチューブに添加される。これらの溶液は、穏やかなボルテックスおよび手動での混合によって、十分に混合される。これらの溶液は、透明な状態～わずかに濁った状態を呈するはずである。これらのサンプルは、ゆっくりと冷却を行うために、１時間～２時間（約４℃）、インキュベートされる。これらのサンプルは、ドライアイス／エタノール混合物によって冷却され、そして一晩、凍結乾燥されるか、または－８０℃の冷蔵庫中におかれて、全ての脱イオンH_2Oが除去される。

【０１１０】

一旦全ての脱イオンH_2Oが除去されると、１mＬの$MeCl_2$／５％アセトンが、各エッペンドルフチューブ中の乾燥サンプルに添加される。混合が進み、そして遠心分離が

、６０００ＲＰＭ～８０００ＲＰＭで３分間行われる。この上清は、この遠心分離物から慎重に取り除かれ、そしてデカントされる。洗浄が、さらに２回繰り返される。

【０１１１】

最後の洗浄が完了された後、この上清はデカントされ、そしてさらなる溶媒は、粉末の懸濁物を回避するために、低濃度の、非常に穏やかなN_2の流れを使用することによって除去される。この乾燥チューブは、凍結乾燥器中におかれて、残りの溶媒が除去され、そして抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアが、回収される。

【０１１２】

（実施例２）

この実施例は、エッペンドルフチューブにおける抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの５００μｌバッチの調製のために基本的な手順を提供する。

【０１１３】

４０mM酢酸アンモニウム（ＡＡ）緩衝液（ｐＨ＝６．０）の調製。４０mMのＡＡ緩衝液は、１リットルの脱イオンH_2Oに３．０８グラムのＡＡ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ）を溶解することによって調製される。このＡＡは、容易に溶解し、そして約６．４のｐＨを有する緩衝溶液を形成する。このｐＨを希酢酸によってｐＨ＝６．０に調整する。

【０１１４】

５００mＬの４０mM ＡＡ緩衝溶液中の１５％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ １８８の調製。７５グラムのＰｏｌｏｘａｍｅｒ １８８（ＢＡＳＦ）は、５００mＬの４０mM ＡＡ緩衝液（工程１に記載されるような）に溶解される（ただし、ｐＨ調整は、この時点で必要ではない）。この量のＰｏｌｏｘａｍｅｒの溶解は、数回の添加によって行われ得る。最終ｐＨは、ｐＨ約６．４付近である。この溶液は、０．２２フィルターを用いて濾過され、そして冷蔵で保持される。

【０１１５】

緩衝液の交換。２ ＰＤ１０脱塩カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）は、５mＬのタンパク質に対して使用される。カラムの総容量は、３．５mＬである。各カラムは、２５mＬ未満の４０mM NH_4OAc緩衝液によってリンスされて、この緩衝液によってカラムが飽和される。その後、２．５mＬのリン酸緩衝液中の抗ＣＤ３４が、このカラム中に挿入される。次いでさらに１mＬのNH_4OAc緩衝液が、挿入されて、このカラムを満たす。このタンパク質は、さらに２．５mＬの４０mM NH_4OAc緩衝液を注射することによって収集される。３～１２mＬの総容量および１０，０００MWのMWカットオフを有する１ Ｐｉｅｒｃｅ透析カセットが使用されて、５mＬのこのタンパク質に対して緩衝液を置換する。このサンプルが、注射される。フロートがこのカセット上に添加され、そしてこのカセットは、低速で回転するために使用される。

【０１１６】

タンパク質濃度は、２８０ｎｍでの吸光度を測定すること、および検量線によって決定される。必要に応じて、このタンパク質は、所望の作業濃度に従い緩衝液によって希釈される。この手順のための作業濃度は、１．８ｍｇ／ｍｌと決定される（最終濃度は、０．９ｍｇ／ｍｌ）。

【０１１７】

１５％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ溶液のｐＨは、酢酸によってｐＨ＝５．８およびｐＨ＝５．９に調整される。５mＬのこのタンパク質は、５００μｌの１０個のバッチに分割される。５００μＬの４０mM ＡＡ中の１５％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ １８８（ｐＨ＝５．８）が、５個のエッペンドルフチューブに添加され、そして５００μＬの４０mM ＡＡ中の１５％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ １８８（ｐＨ＝５．９）が、他の５個のエッペンドルフチューブに添加される。

【０１１８】

これらの溶液は、穏やかなボルテックスおよび手動での混合によって、十分に混合され、これらの溶液は、透明な状態～わずかに濁った状態を呈する。これらのサンプルは、１時間～２時間（約４℃）、ボール中でインキュベートされ、ゆっくりとした冷却が行われ

る。

【０１１９】

これらのサンプルは、全ての脱イオンH_2Oを除去するためにドライアイス／エタノール混合物によって急速に冷却され、そして一晩、凍結乾燥されるか、またはこれらのサンプルは、－８０℃の冷蔵庫中におかれる。一旦全ての脱イオンH_2Oが除去されると、１ｍＬの$MeCl_2$／５％アセトンが、各エッペンドルフチューブに添加され、次いで十分に混合され、そして６０００ＲＰＭ～８０００ＲＰＭで３分間遠心分離される。この上清は、デカントされ、この洗浄が、さらに２回繰り返される。

【０１２０】

最後の洗浄が完了された後、この上清はデカントされ、そしてさらなる溶媒は、低濃度の、非常に穏やかなN_2の流れを使用して除去される。このほぼ乾燥したチューブは、凍結乾燥器中におかれて残りの溶媒が除去され、そして抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアが、回収される。

【０１２１】

（実施例３）

この実施例は、Ｐｏｌｏｘａｍｅｒを溶媒として用い、冷却下でのミクロスフェア形成を伴う抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの調製を記載する。４０ｍＭリン酸緩衝液中の抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体（ｐＨ＝７．０、５．３～５．５の濃度）（塩化ナトリウムを含まず）は、Ｂａｘｔｅｒ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ, Ｈａｙｗａｒｄ, ＣＡ）によって提供された。抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体は、約１５０ｋＤの分子量を有するマウスモノクローナル抗体であり、そして精製目的で使用される。５ｍＬのこのモノクローナル抗体（５．３ｍｇ／ｍＬの濃度）を、０．２２を通して濾過し、そして透析カセットを使用して４０ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液（ｐＨ＝６．５）に対して透析した。タンパク質濃度を、２８０ｎｍの光学密度における吸光度を測定することによって決定した。１０％溶液のＰｏｌｏｘａｍｅｒ １８８ ＮＦ（Ｌｕｔｒｏｌ Ｆ６８）（ＢＡＳＦ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｆｌｏｒｈａｍ Ｐａｒｋ, ＮＪ）から入手可能）を、ｐＨ＝６．０で調製し、そして０．２２ミクロンのフィルターによって濾過した。酢酸アンモニウムは、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｇａｒｄｅｎａ, ＣＡ）によって提供された。透析カセット「Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ」（１０，０００の分子量カットオフおよび３～１２ｍＬのサンプル容量）は、Ｐｉｅｒｃｅ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ, ＩＬ）によって提供された。このモノクローナル抗体溶液の０．５ｍＬのアリコートを、２０個の１ｍＬのミクロチューブに挿入した。１ｍＬの１０％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ溶液を、０．５ｍＬの抗第ＶＩＩＩ因子（５．３ｍｇ／ｍＬ）を含む各チューブに添加し、そしてこの溶液を、室温で穏やかに混合し、そして２９℃で３０分間インキュベートした。

【０１２２】

その後、これらの溶液を、４℃で１時間インキュベートした。冷却の間に、この透明な溶液は、モノクローナル抗体から構成されるミクロスフェアを形成して濁った。その後、ミクロスフェア中へのタンパク質の取り込み量を、以下の方法で決定した：このミクロスフェア懸濁物のアリコートを除去し、このミクロスフェアを、遠心分離によってこの溶液から分離し、そして上清中のタンパク質濃度を、２８０ｎｍの光学密度における吸光度を測定することによって決定した。インキュベーション後、これらのチューブを、急速冷凍し、そして凍結乾燥した。凍結乾燥後、これらの乾燥粉末は、抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアおよびポロキサマーを含んだ。

【０１２３】

このポロキサマーを、９５％塩化メチレンおよび５％アセトンの１ｍＬの溶液を各チューブに添加し、遠心分離し、そしてその上清を除去することによって除去した。この洗浄手順を、３回繰り返した。この湿ったペレットを、窒素ガスを使用して乾燥し、そして残りの溶媒を、減圧を使用して除去した。これらの乾燥粉末を、光学顕微鏡下で観察した。光学顕微鏡画像（図１）および偏光顕微鏡画像（図２）は、０．５～５ミクロンのサイズ

範囲の球状粒子を示す。これらのサンプルを、ＳＥＭ（Ｈｉｔａｃｈｉ　Ｓ４８００，Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｎｏｒｔｈｅａｓｔｅｒｎ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、Ｂｏｓｔｏｎ　ＭＡ）に送った。

【０１２４】

抗第ＶＩＩＩ因子抗体のミクロスフェアのサンプルを、ＳＥＭ試料取り付け具に、両側が伝導性の炭素付着性タブ（ｄｏｕｂｌｅ－ｓｉｄｅｄ　ｃａｒｂｏｎ　ａｄｈｅｓｉｖｅ　ｔａｂ）を使用して取り付けた。白金／パラジウム　８０：２０の薄い（１０～１５ｎｍ）伝導層を、Ｄｅｎｔｏｎ　ＤＶ－５０２真空エバポレーターを使用するエバポレーションを介してサンプルに適用した。その後これらのサンプルは、画像化され、そして２～３ｋＶの加速電圧を使用してＨｉｔａｃｈｉ　Ｓ－４８００　Ｆｉｅｌｄ　Ｅｍｉｓｓｉｏｎ　ＳＥＭ上にデジタル記録された。走査電子顕微鏡写真（図３）は、０．５～６ミクロンのサイズ範囲の球状粒子を示す。

【０１２５】

偏光が等方性のサンプルを通過する場合、これらのサンプルは、全ての結晶軸が完全に等価であるので、サンプルがどのような方向を向いているのかにかかわらず、この偏光に対する効果を有さない。この効果は、完全消光または等方性消光（ｉｓｏｔｒｏｐｉｃ　ｅｘｔｉｎｃｔｉｏｎ）として公知であり、そしてこれは、高度な対称性を有する結晶（例えば、立方晶系）に対して起こる。非結晶質の、非晶質サンプルは、同じ挙動を与える。この偏光顕微鏡画像は、明るい円光に囲まれた暗い円としてミクロスフェアを示す。これらの画像は、サンプルの方向性に依存せず、そして球状の形および非晶質の構造を示す。

【０１２６】

（実施例４）

この実施例は、実施例３に従って調製された抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアのゲル電気泳動を示す。Ｔｒｉｓ－酢酸ゲル（３－８％、１．５ｍｍ×１０ウェル）、Ｔｒｉｓ－酢酸ＳＤＳ泳動緩衝液、ＮｕＰａｇｅ　ＬＤＳサンプル緩衝液、１２個の分子量の標準のマーカー、および「ＳｉｍｐｌｙＢｌｕｅ　ＳａｆｅＳｔａｉｎ」乾燥溶液は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）によって提供された。ゲル電気泳動は、タンパク質およびペプチドの分離および特徴付け、ならびにタンパク質の分子量の推定のために、広範に使用される分析技術である。

【０１２７】

抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアを、実施例３に従って調製し、そして３７℃にてリン酸緩衝生理食塩水（ｐＨ＝７．４）に溶解した。４０μｌの３つの異なるバッチを、並行して泳動した。４０μｌのネイティブな抗第ＶＩＩＩ因子溶液を、コントロールとして、並行して泳動した。泳動時間は、１時間であり、そして電圧は、１５０ｍＶであった。

【０１２８】

図４は、２つのゲルの画像を示し、これらの画像は、この溶解したモノクローナル抗体（ミクロスフェアから放出された）が、ネイティブなモノクローナル抗体と比較した場合に、ゲル中で同様に移動したことを示す。全てのサンプルは、１５０ｋＤの分子量マーカーまで移動し、このことは、タンパク質サイズが、処方の結果として変化しなかったことを示す。染色強度もまた同様であり、そしてゲルのウェル中の染色物は、存在せず、このことは、分子の凝集が最小限であることを示す。

【０１２９】

（実施例５）

この実施例は、ＰＥＧ／ＰＶＰを溶媒として用い、加熱下でのミクロスフェア形成を伴う抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの調製を記載する。Ｂａｘｔｅｒ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｈａｙｗａｒｄ，ＣＡ）の４０ｍＭリン酸緩衝液（塩化ナトリウムを含まない）中の抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体を、ミクロスフェア形態中においた。１００

ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液中の２５％　ＰＥＧ／ＰＶＰ（ｗ／ｖ）溶液（ｐＨ＝５．６）を、３３５０ダルトンのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、４０，０００ダルトンのポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）および酢酸ナトリウム（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｇａｒｄｅｎａ，ＣＡ）から入手可能）を使用して調製した。

【０１３０】

４００μｌの２５％　ＰＥＧ／ＰＶＰ溶液を、８００μｌの抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体溶液（５．３ｍｇ／ｍＬの濃度）に室温で添加した。これらの溶液を、混合し、そして６５℃で３０分間インキュベートした。６５℃でのインキュベート後、これらの溶液を、冷水中でのインキュベーションによって、約２０℃まで急速に冷却（クエンチ）した。冷却の際、この透明な溶液は、モノクローナル抗体から構成されるミクロスフェアを形成して混濁した。この懸濁物を遠心分離し、そしてその上清を除去した。過剰なＰＥＧ／ＰＶＰを、脱イオン水で洗浄することによって除去した。

【０１３１】

図５は、この実施例の手順に従って調製されたミクロスフェアの走査電子顕微鏡画像を示す。このミクロスフェアのサンプルを調製し、そしてＡＭＲＡＹ　ＡＭＲ－１０００走査電子顕微鏡（Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｎｏｒｔｈｅａｓｔｅｒｎ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）によって分析した。このサンプルを、炭素ベースの付着を使用する炭素タブ上に貼り付け、そしてＳＥＭ試料位置に取り付けた。このサンプルを、白金／パラジウム　８０：２０の薄い被膜によって減圧下でコーティングした。図９に示した走査電子顕微鏡写真は、１～３μｍのサイズ範囲の球状粒子を示す。

【０１３２】

レーザー光散乱による粒子サイズ分布（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　ＬＳ　２３０、Ｍｉａｍｉ　ＦＬ）を、この実施例に従って調製したミクロスフェアの水性懸濁物に対して行った。この粒子サイズの分布は狭く、９０％を超える粒子が、２μｍより小さかった。さらに、数、表面積、および体積による粒子サイズ分布を重ね合わせ、これは、全ての粒子が、明らかな凝集物を有さずに、ほぼ同じサイズであること示す。図６を参照のこと。

【０１３３】

（実施例６）

この実施例において、抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアを、Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ溶媒を用いて調製し、そして冷却を、ミクロスフェア　形成において使用した。抗ＣＤ３４モノクローナル抗体は、約１４６ｋＤの分子量を有するマウスＩｇＧ１λモノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体は、Ｉｓｏｌｅｘ（登録商標）３００　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ＳｙｓｔｅｍおよびＩｓｏｌｅｘ（登録商標）３００ｉ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｂａｘｔｅｒ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）と組み合わせて、細胞外の治療（例えば、幹細胞の選択）に使用される。幹細胞選択システムおよび幹細胞処理は、ＣＤ３４ネガティブな腫瘍を有する患者における骨髄機能廃絶療法後の造血再構築が意図される、ＣＤ３４$^{+}$細胞が豊富な集団を得るために、自己の末梢血前駆細胞（ＰＢＰＣ）産物を加工するのに適用される。

【０１３４】

０．１５Ｍ塩化ナトリウムおよび０．００１％　Ｔｗｅｅｎ　８０を含む０．０２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液中の抗ＣＤ３４モノクローナル抗体（ｐＨ＝５．５および２．３～２．５ｍｇ／ｍＬの濃度）は、Ｂａｘｔｅｒ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｈａｙｗａｒｄ，ＣＡ）によって提供された。５ｍＬのこのモノクローナル抗体（２．２ｍｇ／ｍＬの濃度）を、０．２２μｍを通して濾過し、そして４０ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液（ｐＨ＝６．０）に対して透析した。Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ　１８８　ＮＦ（Ｌｕｔｒｏｌ　Ｆ６８）（ＢＡＳＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）から入手可能）の１５％溶液（

この溶液は、ｐＨ＝６．０である）を調製し、そして０．２２μｍのフィルターによって濾過した。酢酸アンモニウムは、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｇａｒｄｅｎａ，ＣＡ）によって提供された。透析カセット「Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ」（１０，０００の分子量カットオフおよび３～１２ｍＬのサンプル容量）は、Ｐｉｅｒｃｅ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）によって提供された。このモノクローナル抗体溶液の０．５ｍＬのアリコートを、２０個の１ｍＬのミクロチューブに挿入した。０．５ｍＬの１５％ Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ溶液を、０．５ｍＬの抗ＣＤ３４（２．０ｍｇ／ｍＬ）を含む各チューブに添加し、そしてこの溶液を、室温で穏やかに混合し、そして２９℃で３０分間インキュベートした。

【０１３５】

その後、これらの溶液を、４℃で１時間インキュベートした。冷却の間に、この透明な溶液は、モノクローナル抗体から構成されるミクロスフェアを形成して濁った。その後、ミクロスフェア中へのタンパク質の取り込み量を、以下の方法で決定した：このミクロスフェア懸濁物のアリコートを除去し、このミクロスフェアを、遠心分離によってこの溶液から分離し、そして上清中のタンパク質濃度を、２８０ｎｍの光学密度における吸光度を測定することによって決定した。インキュベーション後、これらのチューブを、急速冷凍し、そして凍結乾燥した。凍結乾燥後、これらの乾燥粉末は、抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアおよびポロキサマーを含んだ。

【０１３６】

このポロキサマーを、９５％塩化メチレンおよび５％アセトンの１ｍＬの溶液を各チューブに添加し、次いで遠心分離し、そしてその上清を除去することによって除去した。この洗浄手順を、３回繰り返した。これらの湿ったペレットを、窒素ガスを使用して乾燥し、そして残りの溶媒を、減圧を使用して除去した。これらの乾燥粉末を、光学顕微鏡下で観察し、そしてサンプルを、ＳＥＭに送った。光学顕微鏡画像（図７）は、０．５～５ミクロンのサイズ範囲の球状粒子を示す。抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの走査電子顕微鏡写真を、上記の実施例４に記載されるように観察した（図９）。

【０１３７】

空力学的な飛行時間測定（ＴＳＩ Ａｅｒｏｓｉｚｅｒ）によって粒子サイズ分布を、この実施例に従って調製した抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの５ｍｇの乾燥粉末に対して行った。数によるこの粒子サイズの分布は狭く、１．３μｍの空気動力学的直径の平均サイズを伴い、９５％の粒子が、３．６μｍより小さかった（図１０）。

【０１３８】

（実施例７）

実施例６の抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの立体配座安定性もまた、モニタリングした。実施例６に記載されるような条件において、４０ｍＭの酢酸アンモニウム緩衝液中の１．５ｍＬの抗ＣＤ３４（ｐＨ＝６．０および１．６ｍｇ／ｍＬの濃度）を、４０ｍＭ酢酸アンモニウム（２５℃でｐＨ＝６．０）中の１．５ｍＬの１５％ポロキサマーと混合した。３μＬの蛍光色素８－アニリノナフタレン－１－スルホン酸（ｓｕｌｐｈｏｎｉｃ ａｃｉｄ）（ＡＮＳ）の１０ｍＭ溶液を添加した。この溶液を穏やかに混合して、蛍光測定用セルに移した。

【０１３９】

抗ＣＤ３４抗体の立体配座安定性を、タンパク質のトリプトファン残基およびチロシン残基の内因性の蛍光ならびにＡＮＳ色素の外因性の蛍光を使用することによってモニタリングした。蛍光測定用セル中の粒子の形成後に、２５０ｎｍにおける光励起の弾性散乱の５００ｎｍにおける第２のオーバートーン（ｏｖｅｒｔｏｎｅ）の検出を使用した。この実施例を、Ｐｅｌｔｉｅｒ－耐熱性マルチセルホルダーアクセサリーを備えたＣａｒｙ Ｅｃｌｉｐｓｅ Ｂｉｏｍｅｌｔ蛍光分光光度計を使用して行った。このサンプルを、２５℃で１分間インキュベートし、１分間あたり０．０６℃の割合で３１℃まで加熱し、１分間あたり５℃の割合で２℃まで冷却し、そしてこの温度で１時間インキュベートした。コントロールサンプルは、４０ｍＭ酢酸アンモニウム（ｐＨ＝６．０）中の１０μＭ Ａ

ＮＳ、７．５％ポロキサマー（ｐＨ＝６．０）、および４０ｍＭ酢酸アンモニウム（ｐＨ＝６．０）中の１０μＭ　ＡＮＳを含む０．８ｍｇ／ｍＬの抗ＣＤ３４モノクローナル抗体を含んだ。

【０１４０】

図１２は、抗ＣＤ３４モノクローナル抗体の立体配置の安定性の蛍光モニタリング結果を示す。蛍光のデータは、このタンパク質の立体配座が、ミクロスフェア形成の間にインタクトなままであったことを支持する。

【０１４１】

（実施例８）

この実施例に従って、抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアを、Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ溶媒またはＰＥＧ／ＰＶＰ溶媒によって調製し、そしてこの調製に加熱を組み込んだ。０．１５Ｍ塩化ナトリウムおよび０．００１％　Ｔｗｅｅｎ　８０を含む０．０２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液中の抗ＣＤ３４モノクローナル抗体（ｐＨ＝５．５および２．３～２．５ｍｇ／ｍＬの濃度）は、Ｂａｘｔｅｒ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｈａｙｗａｒｄ，ＣＡ）によって提供された。２．５ｍＬのサンプル容量の脱塩カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）から入手可能）を使用して、４０ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液（ｐＨ＝６．３）（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｇａｒｄｅｎａ、ＣＡ）に対して５ｍＬの抗ＣＤ３４モノクローナル抗体を透析した。タンパク質濃度を、２８０ｎｍの光学密度における吸光度を測定することによって決定した。このモノクローナル抗体溶液の０．５ｍＬのアリコートを、１０個の１ｍＬミクロチューブ中に挿入し、そして１５％Ｐｏｌｏｘａｍｅｒ　１８８　ＮＦ（Ｌｕｔｒｏｌ　Ｆ６８、ＢＡＳＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）の０．３ｍＬアリコートを、０．５ｍＬの抗ＣＤ３４（２．１ｍｇ／ｍＬ）を含むチューブに添加した。この溶液を、室温で穏やかに混合し、そして７０℃で３０分間インキュベートした。

【０１４２】

７０℃でのインキュベーション後、この溶液を、冷水中でのインキュベーションによって２３℃まで急速に冷却（クエンチ）した。冷却の際、この透明な溶液は、モノクローナル抗体から構成されるミクロスフェアを形成して混濁した。この懸濁物を遠心分離し、そしてその上清を除去した。過剰なポロキサマーを、脱イオン水で洗浄することによって除去した。光学顕微鏡画像（図８）は、０．５～５μｍのサイズ範囲の球状粒子を示す。

【０１４３】

（実施例９）

この実施例において、溶媒としてＰＥＧ／ＰＶＰを用い、そして冷却下でのミクロスフェア形成を伴う抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの調製が、記載される。０．１５Ｍ塩化ナトリウムおよび０．００１％　Ｔｗｅｅｎ　８０を含む０．０２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液中の抗ＣＤ３４モノクローナル抗体（ｐＨ＝５．５および２．３～２．５ｍｇ／ｍＬの濃度）は、Ｂａｘｔｅｒ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｈａｙｗａｒｄ，ＣＡ）によって提供された。３３５０Ｄａのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、４０，０００Ｄａのポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）および酢酸ナトリウムは、全てＳｐｅｃｔｒｕｍ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｇａｒｄｅｎａ、ＣＡ）によって提供された。

【０１４４】

１００ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液中の２５％　ＰＥＧ／ＰＶＰ溶液（ｐＨ＝５．６）を、調製し、そして０．２２μｍのフィルターによって濾過した。５ｍＬのこのモノクローナル抗体（２．２ｍｇ／ｍＬの濃度）を、０．２２μｍのフィルターによって濾過し、そしてＰｉｅｒｃｅ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）によって提供された透析カセット「Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ」（１０，０００の分子量カットオフおよび３～１２ｍＬのサンプル容量）を使用して透析した。このモノクローナル抗体を、４０ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液（ｐＨ＝６．０）に対して透析した。その後、２００μｌの２５％　ＰＥＧ／ＰＶＰ

溶液（ｗ／ｖ）を、５００μｌの抗ＣＤ３４モノクローナル抗体（２．０ｍｇ／ｍＬの濃度）に添加し、そしてこの溶液を、室温で穏やかに混合し、そして２９℃で３０分間インキュベートした。このプロセスは、実施例６に記載されるように継続するが、この工程は、９５％塩化メチレン／５％アセトン溶液を用いた洗浄によって、ポロキサマーとは反対にＰＥＧ／ＰＶＰを除去するためであった。

【０１４５】

（実施例１０）

この実施例は、実施例６に従って調製されたモノクローナル抗体のミクロスフェアの粉末Ｘ線回折（ＸＲＰＤ）を示す。高解像度粉末Ｘ線回折（ＸＲＰＤ）分析を、Ｃｕ　Ｋα放射線（ｒａｄｉｔｉｏｎ）（ＳＳＣＩ、Ｗｅｓｔ　Ｌａｆａｙｅｔｔｅ，ＩＮ）を使用した長い高精度焦点のＸ線管を備えるＳｈｉｍａｄｚｕ　ＸＲＤ－６０００　Ｘ線粉末回折計を用いて得た。

【０１４６】

この管の電圧、およびアンペア数を、それぞれ、４０ｋＶおよび４０ｍＡに設定した。発散スリットおよび散乱スリットを、１°に設定し、そして受光スリットを、０．１５ｍｍに設定した。あるいは、発散スリットおよび散乱スリットを、０．５°に設定し、そして受光スリットを、０．１５ｍｍに設定した。回折される放射線を、ＮａＩシンチレーション検出器によって検出した。１～２０°　２θの、１分間あたり０．５°でのθ～２θの連続的スキャン（０．０２ステップあたり４．８秒）を、使用した。シリコーン標準を分析して、この機器の調整を確認した。データを、収集し、そしてＸＲＤ－６０００　ｖ．４．１を使用して分析した。ヘキサトリアコンタン：シリコーンの８０：２０混合物からなる低角度標準を実行し、良好に定義される「ｄ」値について、より低い角度におけるこの機器の高解像度を実証した。

【０１４７】

図１１は、抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアおよびヘキサトリアコンタン：シリコーンの８０：２０混合物のＸＲＰＤパターンを示す。ヘキサトリアコンタン：シリコーンの混合物のＸＲＰＤは、結晶状態を示す独特のピークを有する一方で、抗体ミクロスフェアのＸＲＰＤパターンは、連続的であり、そして明確なピークを有さず、このことは、非晶質の、非結晶質状態の典型である。

【０１４８】

【化２】

インスリンミクロスフェアの濃度 (mg/mL)	容量 (mL)	注入性能	注射性能
100	1	Yes	Yes
200	1	Yes	Yes
300	1	Yes	Yes
400	1	Yes	部分的

この結果は、高濃度のこれらのタンパク質ミクロスフェアが、吸引され得、そして首尾よく１０ポンドのハム片中に注射され得ることを示す。

【０１４９】

（実施例１１）

抗ＣＤ３４を、本発明に従って（実施例２にほぼ従って）ミクロスフェア中に処方した。このミクロスフェアを、表Ｉに示す濃度にて５％　ＰＥＧ　３３５０の溶液中に懸濁した。懸濁したミクロスフェアのある容量を、注射器中に吸引し、そして２５ゲージの注射可能の針を通して４ポンドの市販のブタ肩肉中に送達した。それぞれの注射を、目詰まり

せずに２０秒以下で行った。この実施例における注入能力の結果は、２５ゲージの針を通して注射器中にこのミクロスフェア懸濁物を吸引し、そして注射器の内容物をこのブタに完全に注射する能力を示し、この結果は、表Ｉに記録される。

（表Ｉ）

【０１５０】

【表１－１】

抗CD34ミクロスフェアの濃度 (mg/mL)	容量 (mL)	注入性能	注射性能
50	0.3	Yes	Yes
200	0.15	Yes	Yes

表Ｉに報告した結果は、高濃度のこれらのタンパク質ミクロスフェアが、細い（２５ゲージ）針の中に吸引され、そしてそこから首尾よく注射され得ることを示す。このことは、皮膚を通し、そして筋肉中への、皮下環境における注射性能の徴候を提供する。

【０１５１】

（実施例１２）

９０重量％より多い組換えヒトインスリンを含むインスリンミクロスフェアを、本発明に従うミクロスフェア中に処方した。このインスリンミクロスフェアを、表Ｉに示す濃度で５％　ＰＥＧ　３３５０の溶液中に懸濁した。１ｍＬの懸濁したミクロスフェアを、注射器中に吸引し、そして２８ゲージのインスリン針を通して１０ポンドの市販のスモークハム中に送達した。それぞれの注射は、目詰まりせずに２０秒以下で行った。この実施例における注射器能力の結果は、２８ゲージの針を通して注射器中にこのミクロスフェア懸濁物を吸引する能力を示し、そしてこの実施例における注射性能は、注射器の内容物をこのハムに完全に注射する能力を示す。この結果は、表Ｉに記録される。

（表１）

【０１５２】

【表１－２】

インスリンミクロスフェアの濃度 (mg/mL)	容量 (mL)	注入性能	注射性能
200	1	Yes	Yes
300	1	Yes	Yes
350	1	Yes	Yes
400	1	Yes	部分的

表Ｉに報告した結果は、高濃度のこれらのタンパク質ミクロスフェアが、細い（２８ゲージ）針の中に吸引され、そしてそこから１０ポンドのハム片に首尾よく注射され得ることを示す。この後者の工程は、皮下環境における注射性能のおおまかな徴候を提供する。３００ｍｇ／ｍｌの注射を、５．８ニュートンの力で行った。

【０１５３】

（実施例１３）

インスリンの微粒子またはミクロスフェアは、一般的方法によって調製される。１６．６７％のＰＥＧ　３３５０を含むｐＨ５．６５（０．０３３Ｍ酢酸ナトリウム緩衝液）で緩衝化した溶液を、調製した。亜鉛結晶性インスリンの濃縮されたスラリーを、撹拌しながらこの溶液に添加した。最終的な溶液中のインスリン濃度は、０．８３ｍｇ／ｍＬであった。この溶液を、約８５℃～９０℃に加熱した。このインスリンの結晶は、この温度で５分以内に完全に溶解した。インスリン球状小粒子は、溶液の温度が制御した速度で減少する場合、約６０℃で形成し始めた。ＰＥＧの濃度が増加するにつれて、インスリン球状

小粒子の収量は、増加した。このプロセスは、１．４μｍの平均を有する種々のサイズ分布を伴って、微粒子またはミクロスフェアを産生した。

【０１５４】

形成されたインスリンの微粒子またはミクロスフェアを、このミクロスフェアが溶解しない条件下でダイアフィルトレーションを介してこのミクロスフェアを洗浄することによって、ＰＥＧから分離した。このインスリンミクロスフェアを、Zn^{2+}を含む水溶液を使用して上記懸濁物から洗浄した。このZn^{2+}イオンは、インスリンの溶解性を減少させ、そして収量を減少させ、そしてミクロスフェアの凝塊形成を生じる溶解を防止する。

【０１５５】

（実施例１４）

本発明はまた、本発明の好ましい注入可能な送達経路に特に適した、α－１－抗トリプシン（ＡＡＴ）の球状小粒子を調製するために使用され得る。ＡＡＴは、約４４ｋＤａの分子量を有する。この実施例は、ＡＡＴ球状小粒子のジャケット付カラムバッチの調製（１０～３００ｍｇの規模）について報告する。

【０１５６】

１６％のＰＥＧ　３３５０および０．０２％のＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８を含む１０ｍＭ酢酸アンモニウムによってｐＨ６．０に緩衝化した溶液を、ジャケット付ビーカー中で磁性撹拌子を用いて混合し、そして３０℃に加熱した。このビーカーの温度を、循環式の水浴を使用して制御した。組換えＡＡＴ（ｒＡＡＴ）の濃縮溶液を、撹拌しながらこの溶液に添加し、そしてそのｐＨを６．０に調整した。最終的な溶液中のｒＡＡＴ濃度は、２ｍｇ／ｍｌであった。ｒＡＡＴは、この溶液の組成におけるこの温度で完全に溶解した。この容器の全内容物を、ジャケット付カラムに移し、そして２５～３０℃に加熱した。このカラムのためにこの循環式の水浴を、－５℃まで降下するように設定した。このカラムおよび内容物を、１分間あたり約１℃の割合で、約４℃の温度まで冷却した。このｒＡＡＴ球状小粒子は、この冷却工程の間に形成した。このミクロスフェア懸濁物を、ガラス結晶皿中で凍結させ、そして凍結乾燥して、水および緩衝液を除去した。

【０１５７】

凍結乾燥後のタンパク質球状小粒子からＰＥＧを抽出するために、ＰＥＧ／タンパク質の固形物を、塩化メチレン（$MeCl_2$）で洗浄した。利用した別の洗浄用媒体は、塩化メチレン：アセトン　１：１、または塩化メチレン：ペンタン　１：１であった。この洗浄手順を、最初の容量の洗浄で合計３回繰り返した。最終的なペレットを、小さい容量のアセトンまたはペンタンに懸濁し、そして窒素ガスに直接曝すことによってか、またはロータリーエバポレーションによってかのいずれかで乾燥した。

【０１５８】

（実施例１５）

この実施例において、ＡＡＴ球状小粒子（２００～２０００ｍｇの規模）は、ジャケット付容器バッチの調製である。この型の調製を、ジャケット付カラムと同じであるが、より大きい容量に適合し得る処方の組成物を使用して行い、そしてこの調製は、よりスケールアップに適していた。この規模において、この処方物を、ジャケット付容器（通常は５００～１０００ｍｌ）中のＡ字型のパドル型インペラー（Ａ－ｓｈａｐｅｄ　ｐａｄｄｌｅ　ｓｔｙｌｅ　ｉｍｐｅｌｌｅｒ）によって、７５ｒｐｍで混合し、そして３０℃まで加熱した。この容器の温度を、循環式の水浴を使用して制御した。同じ容器中の溶液を保持しながら、水浴の供給源を、３０℃のバス～２℃のバスに切り替えた。この容器および内容物を、１分間あたり約１℃の割合で、４℃の温度まで冷却した。このｒＡＡＴ球状小粒子は、この冷却工程の間に形成した。この温度を、熱電対を使用してモニタリングし、そしてこの懸濁物が４℃に達したとき、この懸濁物をこの温度付近で、さらに３０分間保持した。保持工程の後、この球状小粒子の懸濁物を、約４℃にてダイアフィルトレーションを介して濃縮して、約７５％のポリマーおよび約７５％の容量を取り除いた。残った球状小粒子の懸濁物を、予め冷却した凍結乾燥トレイ中に薄い層として凍結し、そして凍結乾燥して、水および残った緩衝液を除去した。

【０１５９】
このタンパク質球状小粒子を、有機溶媒と共に遠心分離することによって（実施例１８に記載されるように）か、または超臨界流体（ＳＣＦ）抽出によってかのいずれかで、残りの乾燥したポリマーから分離した。ＳＣＦ抽出のために、この乾燥した物質を、CO_2によって（室温で）２５００ｐｓｉまで加圧される高圧抽出チャンバー中に移した。一旦作動圧力に達すると、エタノールは、７０：３０のCO_2：エタノール混合物として吸気口の流体の流れに導入された。この超臨界流体は、この球状小粒子を残したままこのポリマーを溶解した。このプロセスの終結において、このシステムは、エタノールを流され、そしてゆっくりと圧力が下げられた。

【０１６０】
（実施例１６）
球状小粒子を、実施例１５および１６に記載されるように製造し、そして歩留まりを決定した。冷却プロセスを完了した後、この懸濁物の少量のアリコートを、取り除き、そしてこれを、０．２μｍの注射器フィルターによって濾過して、固体の球状小粒子を除去した。溶液中に残っているｒＡＡＴであるこの濾過物の吸光度を、ＵＶ分光光度計を使用して２８０ｎｍにおいて決定した。その後このｒＡＡＴ濃度を、標準曲線から計算した。この％の変換を、以下：

【０１６１】
【表２】

$$\frac{\left(\text{出発 } rAAT \text{ 濃度} - \text{濾過 } rAAT \text{ 濃度}\right)}{\text{出発 } rAAT \text{ 濃度}} * 100\% = \text{変換 \%}$$

規模	球状小粒子への変換の%
100-200mg (n=9, カラム)	91.7 ± 4.4
300mg (n=4, カラム)	93.4 ± 1.6
2g (n=5, 容器)	90.4 ± 1.8

のように計算した。

【０１６２】
上記の表に示されるように、高い％のＡＡＴタンパク質を、プロセスの規模に関係なく、球状小粒子に変換した。

【０１６３】
（実施例１７）
この実施例は、異なるプロセスの規模のエアロサイザー（Ａｅｒｏｓｉｚｅｒ）データにおける、ＡＡＴ粒子の粒子サイズ分布を示す。最終的なＡＡＴの乾燥粉末球状小粒子のサンプルを、飛行時間測定によって粒子サイズを測定するＴＳＩ　Ａｅｒｏｓｉｚｅｒ３２２５において分析した。これらの測定値から、異なる割合の体積粒径を、このＡＡＴ球状小粒子の粒子サイズ分布を実証するために計算し、そしてこの体積粒径を、本発明の方法以外の方法によって製造された粒子と比較するために使用した。

【０１６４】
【表３】

規模	d90/d10 (容量)	d80/d20 (容量)	(d90-d10)/d50 (容量)
5-10mg (n=12, カラム)	1.88 ± 0.20	1.49 ± 0.10	0.67 ± 0.14
100-200mg (n=5, カラム)	1.83 ± 0.05	1.41 ± 0.05	0.66± 0.05
300 mg (n=3, カラム)	2.05 ± 0.17	1.61 ± 0.11	0.77 ± 0.06
1-2g (n=4, 容器)	2.21 ± 0.30	1.60 ± 0.11	0.86 ± 0.19

５～１０ｍｇのサンプルを、ゲルカプセル中に秤量し、そして１分間あたり６０リットルの流速（ＬＰＭ）にてＣｙｃｌｏｈａｌｅｒ Ｄｒｙ Ｐｏｗｄｅｒ Ｉｎｈａｌｅｒを使用するＡｎｄｅｒｓｅｎ Ｃａｓｃａｄｅ Ｉｍｐａｃｔｏｒ中に適用した。球状小粒子を、全ての衝突または段階から回収し、０．２Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．０）に溶解し、そして逆相ＨＰＬＣを使用して定量化した。このデータを分析し、そして幾何標準偏差（ＧＳＤ）を、Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ（ＵＳＰ）に記載されるように計算した。このデータは、狭いサイズ分布を実証した。

【０１６５】

【表４】

規模	GSD
100-200mg (n=5, カラム)	1.74 ± 0.22
300mg (n=3, カラム)	1.77 ± 0.40
2g (n=5, 容器)	1.70 ± 0.09

上に示される全ての分布パラメーターは、本発明の製造方法から生じる優れた粒子サイズ分布を実証した。

【０１６６】

（実施例１８）

この実施例は、ＡＡＴの生物活性の保持を示す。比活性を決定するために、上記ｒＡＡＴ球状小粒子を、０．２Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）に室温で溶解した。得られた溶液を、Ｃ末端にｐ－ニトロアニリド基を含む合成ペプチドを加水分解する、ブタ膵臓エラスターゼ（ＰＰＥ）の能力を阻害するｒＡＡＴの性能を測定するアッセイによって分析した。次いでｒＡＡＴ球状小粒子の同じ溶液を、ビシンコニン酸（ＢＣＡ）アッセイを使用してタンパク質濃度についてアッセイした。コントロールのｒＡＡＴ出発物質溶液もまた、両方のアッセイによって分析した。この活性のアッセイは、１サンプルあたり１ｍｇ／ｍｌのタンパク質の濃度に基づく活性を決定するために開発されたので、この活性の値を、ＢＣＡによって決定される実際のタンパク質濃度に基づいて補正し、比活性値を得た。

【０１６７】

【表５】

$$\frac{\text{サンプルについての活性値}}{\text{実際のタンパク質の濃度}} = \text{サンプルについての比活性}$$

rAATによるブタ膵臓エラスターゼの阻害

規模	球状小粒子の IU/mg	コントロールの IU/mg
100-300 mg (n=12, カラム)	64.19 ± 5.01	64.34 ± 4.95
200-300mg (n=8, 容器)	62.53 ± 5.29	65.87 ± 0.98

従って、この比活性は、ＡＡＴの球状小粒子中への製造後の、生物活性の保持を実証した。

【０１６８】

（実施例１９）

この実施例は、溶媒としてＰＥＧまたはＰｏｌｏｘａｍｅｒを用い、そして冷却下でのミクロスフェア形成を伴うヒト化モノクローナル抗体のミクロスフェアの調製を記載する。４０ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液中の４ｍｇ／ｍＬヒト化モノクローナル抗体（抗ＣＤ２５モノクローナル抗体）の１ｍＬ溶液（ｐＨ＝５．９）を、１ｍＬのＰＥＧ ３３５０ Ｄａ（Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｇａｒｄｅｎａ、ＣＡ）から入手可能

）の３０％（ｗ／ｖ）溶液と水中で混合した。あるいは、この溶液を、１ｍＬのポロキサマー　１８８　ＮＦ（Ｌｕｔｒｏｌ　Ｆ６８）（ＢＡＳＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ、ＮＪ）から入手可能）の３０％（ｗ／ｖ）溶液と水中で混合した。この混合物を、３５℃で１０分間、水浴中でインキュベートし、次いで１分間あたり約０．７℃の割合で２℃まで冷却した。

【０１６９】

その後、このサンプルを、光学顕微鏡において、１０×および１００×の倍率で観察し、そしてこのサンプルは、いずれかのポリマーを使用した球状粒子の形成を示した。このミクロスフェアのほとんどは、約２ミクロンの直径であるようだが、より小さいものもあった。直径が５ミクロンより大きいミクロスフェアは、ほとんどなかった。

【０１７０】

（実施例２０）

この実施例は、ＡＡＴの構造的完全性の保持を示す。制御された相分離（ＣＰＳ）技術の異なる重要な点の１つは、粒子形成の間に水性系を利用し、そして他の負荷を誘導する条件（例えば、上昇した温度、せん断など）を回避する穏やかな条件下での粒子の形成である。粒子工学の分野において、主要な関心事は、製造の間のタンパク質の安定性および保存安定性である。主な分解経路（例えば、酸化、アミド分解および特にタンパク質の凝塊形成）は、タンパク質処方物の副作用（免疫原性が挙げられる）の原因であると考えられる。従って、規制の関連事項は、最終的な粒子処方物における分解産物の非常に低いレベルを必要とする。ＨＰＬＣ、物理化学的特徴付け（例えば、ＣＤおよびＤＳＣ）を、タンパク質の改変が形成の間に生じたか否かを決定するために利用した。

【０１７１】

円偏光二色性（ＣＤ）は、摂動に供されたタンパク質の構造上の変化の評価、または操作したタンパク質の構造の親タンパク質に対する比較のために最も一般的に使用される方法である。ＣＤ法は、タンパク質の折り畳み、ならびにタンパク質の二次構造および三次構造を評価している。

【０１７２】

二次構造は、「遠紫外」スペクトル領域（１９０～２５０ｎｍ）におけるＣＤ分光法によって決定され得る。これらの波長において、発色団は、それが正常に折り畳まれた環境中に位置する場合、ペプチド結合である。α－ヘリックス、β－シート、およびランダムコイル構造は、それぞれ、ＣＤスペクトルの特徴的な形および強度を生じる。従って、任意のタンパク質中に存在するそれぞれの二次構造型のおおよその割合は、その遠紫外ＣＤスペクトルを分析することによって、それぞれの構造の型についての分かれた複数のこのような参照スペクトルの合計として決定され得る。

【０１７３】

「近紫外」スペクトル領域（２５０～３５０ｎｍ）におけるタンパク質のＣＤスペクトルは、三次構造の特定の局面に対して感受性であり得る。これらの波長において、発色団は、芳香族アミノ酸およびジスルフィド結合であり、そしてこれらが生成するＣＤシグナルは、タンパク質の三次構造全体に対して感受性である。２５０～２７０ｎｍの領域中のシグナルは、フェニルアラニン残基に起因し、２７０～２９０ｎｍのシグナルは、チロシンに起因し、そして２８０～３００ｎｍのシグナルは、トリプトファンに起因する。ジスルフィド結合は、近紫外スペクトル全体にわたって広範な弱いシグナルを生じる。

【０１７４】

ｒＡＡＴストック溶液およびリン酸緩衝液中の球状小粒子（ｐＨ７．４、Ｔ＝２５℃、０．０５ｍｇ／ｍＬのタンパク質濃度）から放出されたＡＡＴの遠紫外ＣＤスペクトルを、図１３に示す。それぞれのスペクトルは、１０回の走査の平均を示す。

【０１７５】

遠紫外ＣＤスペクトルは、区別不能であり、ＡＡＴの球状小粒子中への製造が、ＡＡＴのその後の放出において、出発ＡＡＴ物質の構造と同じ構造を有するＡＡＴ分子を生じたことを実証する。

【０１７６】
球状小粒子を、ｐＨ８．０の０．２Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌに溶解し、そして逆相ＨＰＬＣによって分析した。出発ｒＡＡＴタンパク質のコントロール溶液と比較した場合、クロマトグラムの外見において明らかな違いは、存在しない。
【０１７７】
ＨＰＬＣシステム：
ＨＰＬＣカラム－Ｐｈｅｏｍｅｎｅｘ　Ｊｕｐｉｔｅｒ、５ミクロン、Ｃ４、３００Ａ、２５０×４．６ｍｍ
Ｗａｔｅｒｓ　Ａｌｌｉａｎｃｅ　２９６５ポンプ／オートサンプラー
波長－　２８０ｎｍ
注射容量－　７５ｕｌ
濃度の勾配：
移動相１：水中の０．１％　ＴＦＡ
移動相２：水中の９０％（ｃ／ｖ）アセトニトリル中の０．０８５％　ＴＦＡ
実行時間－　６０分間
流速－　１．０ｍｌ／分
ＤＳＣダイアグラムを、作製した。図１５～図２５ｂを参照のこと。
【０１７８】
（実施例２１）
この実施例は、ＡＡＴ出発物質の保存安定性に対するＡＡＴ球状小粒子の保存安定性を報告する。球状小粒子を、室温および４℃における、１週間、１ヶ月間、２ヶ月間、３ヶ月間、６ヶ月間、ならびに１２ヶ月間の保存後の、生物活性の保持について分析した（実施例１７に記載されるアッセイを使用して）。（図１７ｂおよび図１７ｃ）。このバルク物質（ｂｕｌｋ　ｍａｔｅｒｉａｌ）は、透析し、次いで凍結乾燥したｒＡＡＴ出発溶液である。それぞれの時点および保存状態に関して、二連のサンプルが存在し、これらを、それぞれ二連でアッセイした。
【０１７９】
（実施例２２）
Ｄｎａｓｅ球状小粒子を調製した。ＤＮａｓｅは、約３８ｋＤａの分子量を有する。処方例：以下の溶液：（１ｍｇ／ｍｌストックからの）０．１８ｍｇ／ｍｌ　ＤＮａｓｅ、（２５％ストックからの）１８．２％　ＰＥＧ　３３５０、（１Ｍストックからの）９ｍＭ酢酸アンモニウム（ｐＨ５．１５）。この懸濁物を、－８０℃の冷凍庫で冷却し、そして一旦凍結させ、この懸濁物を、マニホールド式凍結乾燥器上で凍結乾燥し、次いで$MeCl_2$／アセトンを伴う遠心分離によって洗浄した。
【０１８０】
試みた最初の濃度は、０．１ｍｇ／ｍｌ　ＤＮａｓｅおよび２０％　ＰＥＧ　３３５０であった。３７℃から０℃までの冷却を試みた後に、沈殿を得ることはできなかったが、別の量のＤＮａｓｅを添加して、上記の濃度を得た。この溶液を、－８０℃の冷凍庫で冷却し、そして一旦凍結させ、この溶液を、マニホールド式凍結乾燥器上で凍結乾燥した。$MeCl_2$／アセトンを伴う遠心分離によって洗浄した。試みた最初の濃度は、０．１ｍｇ／ｍｌ　ＤＮａｓｅおよび２０％　ＰＥＧ　３３５０であった。３７℃から０℃までの冷却を試みた後に、沈殿を得ることはできなかったが、別の量のＤＮａｓｅを添加して、上記の濃度を得た。この溶液を、－８０℃の冷凍庫で冷却し、そして一旦凍結させ、この溶液を、マニホールド式凍結乾燥器上で凍結乾燥した。$MeCl_2$／アセトンを伴う遠心分離によって洗浄した。（図３８、図３９）。
【０１８１】
活性（ＤＮａｓｅ－Ｉについての、Ｓｉｇｍａから購入したＤＮＡ－メチルグリーンを使用したアッセイ）。出発物質についての理論上の活性は、７７５Ｋｕ／ｍｇのタンパク質として記載される。ストック溶液を、０．１４５ｍｇ／ｍｌのタンパク質であると決定した。この濃度を、０．０１９９ｍｇ／ｍｌの最終濃度になるように５ｍｌに希釈した。

この活性は、７７５Ｋｕ／ｍｇ＊０．０１９９ｍｇ／ｍｌ＝１５．４６Ｋｕ／ｍｌとなるはずである。

【０１８２】

【化３】

$$\text{溶液の } Kunitz \text{ 単位 } /ml = \frac{\text{未知の1分間あたりのΔA640 } X40X \text{ 希釈因子}}{\text{既知の1分間あたりのΔA640}}$$

$$Ku/ml = -0.0004 \times 40 \times 1/-0.0011 = 14.55\ Ku/ml$$

理論上の活性に対する比較：球状小粒子／理論上の活性＊１００％＝活性の％：１４．５５Ｋｕ／ｍｌ　／　１５．４６Ｋｕ／ｍｌ＊１００％＝９４．１％。

【０１８３】

（実施例２３）

スーパーオキシドジスムターゼ（約３２ｋＤａの分子量）球状小粒子を、調製する。（５ｍｇ／ｍｌストックからの）０．６８ｍｇ／ｍｌ　ＳＯＤ、（３１．２５％ストックからの）２４．１５％　ＰＥＧ　３３５０、（１Ｍストックからの）９．１ｍＭ　酢酸アンモニウム、最終ｐＨ＝４．９９の溶液を水酸化アンモニウムおよび酢酸で調整した。これらの溶液を、４０℃から０℃まで、５０分間かけて冷却（１分間あたり約０．８℃）し、そして沈殿は、約２５℃で開始した。この懸濁物を、液体窒素中で急速冷凍し、そしてマニホールド式凍結乾燥器上で凍結乾燥し、次いで$MeCl_2$／アセトンを伴う遠心分離によって洗浄した。（図４０、図４１）。

【０１８４】

４０℃から０℃まで、５０分間かけて冷却（１分間あたり約０．８℃）した。沈殿は、約２５℃で始まった。液体窒素中で急速冷凍し、そしてマニホールド式凍結乾燥器上で凍結乾燥した。$MeCl_2$／アセトンを伴う遠心分離によって洗浄した。球状小粒子が、形成され、そして大部分のアセトンが保持された。

【０１８５】

（実施例２４）

サブチリシン（約３５，２３０ダルトンの分子量）球状小粒子は、非ポリマー性相分離増強剤を使用して調製される。最初の系の連続相は、非ポリマー性相分離増強剤を含み、冷却の間にタンパク質の相分離を誘導し得る。サブチリシン球状小粒子は、任意のポリマーの使用を伴わずに、プロピレングリコールとエタノールとの混合物を使用して、本発明に従って形成され得る。この系において、プロピレングリコールは、凝固点降下剤として機能し、そしてエタノールは、相分離増強剤として機能する。プロピレングリコールはまた、球状小粒子の球状形状の形成を支援する。

【０１８６】

３５％プロピレングリコール中の２０ｍｇ／ｍＬサブチリシン溶液－１０％ホルメート－０．０２％　$CaCl_2$を、調製した。次いで３５％プロピレングリコール－サブチリシン溶液を、混合しながら６７％エタノールに加えた。この溶液は、室温で透明なままであった。しかし、－２０℃で１時間冷却した場合、粒子の懸濁物を形成した。遠心分離してこの粒子を収集し、そして９０％エタノールで洗浄した後、コールター粒径分析を、懸濁物の流体として無水エタノールを使用して行った。この粒子は、２．２ミクロンの平均直径を有する分離した粒子に一致するコールターの結果を与え、そして９５％の粒子は、０．４６ミクロンと３．９４ミクロンとの間であった。光学顕微鏡の評価は、実質的に球状の粒子を示すこれらの結果を裏付けた。この粒子のＳＥＭ分析は、コールターの結果を裏付けた。

【０１８７】

溶液中のサブチリシンのサブチリシン球状小粒子への変換後におけるサブチリシン酵素活性の保持を、比色定量アッセイによって確認した。球状小粒子についての活性の理論上

の総ユニットは、冷却前のエタノール－サブチリシン－プロピレングリコール溶液においてアッセイしたサブチリシンの総ユニット数から、（サブチリシン粒子の分離後の）上清に見出される総ユニット数を差し引くことによって計算した。％として表わされる理論上のユニット数で除算されたサブチリシン球状小粒子について見出される実際の総ユニット数は、粒子形成後のサブチリシン活性の保持を表わす。この計算によって、理論上のサブチリシン活性の１０７％が、このサブチリシン球状小粒子の形成後に保持された。

【０１８８】

本明細書中に開示される実施形態は種々の形態において具現化され得る本発明の単なる例示であることが、理解されるべきである。従って、本明細書中に開示される具体的な詳細は、限定として解釈されるべきではなく、単に、特許請求の範囲の基礎、および事実上、任意の適切な様式で本発明を様々に利用する当業者に教示するための代表的な基礎として解釈されるべきである。記載された本発明の実施形態は、本発明の原理のいくつかの適用の例示であり、そして本明細書中で個別に開示されるか、または特許請求される特徴の組み合わせを含む改変は、なされ得る。

【図面の簡単な説明】

【０１８９】

【図１】図１は、実施例３に記載される通りに調製された抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの光学顕微鏡画像を示す。

【図２】図２は、実施例３に記載される通りに調製された抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの偏光顕微鏡画像を提供する。

【図３】図３は、実施例３に記載される通りに見た抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの走査電子顕微鏡写真を提供する。

【図４】図４は、実施例４に記載されるような抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体（出発物質および溶解したミクロスフェア）のゲル電気泳動画像を示す。

【図５】図５は、実施例５に記載される通りに見た抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの走査電子顕微鏡写真を示す。

【図６】図６は、実施例５に記載されるような抗第ＶＩＩＩ因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの数、表面積および体積分布による粒子サイズ分布を報告する。

【図７】図７は、実施例６に記載される通りに調製された抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの光学顕微鏡画像を提供する。

【図８】図８は、実施例８に記載される通りに調製された抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの光学顕微鏡画像である。

【図９】図９は、実施例６に記載される通りに調製された抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの走査電子顕微鏡写真である。

【図１０】図１０は、実施例６に記載される通りに調製された抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアの数の分布による粒子サイズ分布を報告する。

【図１１】図１１は、実施例１０に記載されるような抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェア（２スリット構造を有する）およびヘキサトリアコンタン：ケイ素混合物の、粉末Ｘ線回折を示す。

【図１２】図１２は、実施例７に記載されるようなポロキサマーを伴う、冷却の間の抗ＣＤ３４モノクローナル抗体のミクロスフェアに関する立体配置安定性の蛍光モニタリングを報告する。

【図１３】図１３は、温度に対して活性な因子の濃度をプロットする二元系相図である。

【図１４】図１４は、冷却温度プロフィールである。

【図１５】図１５は、球状小粒子中に調製された場合の、インスリンの化学的安定性の全体的な維持を示すＨＰＬＣ分析である。

【図１６】図１６ａおよび１６ｂは、バッチ間の再現性を実証する概略図である。

【図１７Ａ】図１７ａは、α－１－抗トリプシン（ＡＡＴ）についての円偏光二色性（ＣＤ）プロットである。

【図１７Ｂ】図１７ｂは、実施例２１における室温での保存時間に対する活性のプロット

である。
【図１７Ｃ】図１７ｃは、実施例２１における４℃での保存時間に対する活性のプロットである。
【図１８】図１８は、ＤＳＣプロットである。
【図１９】図１９は、ＤＳＣプロットである。
【図２０】図２０は、ＤＳＣプロットである。
【図２１】図２１は、ＤＳＣプロットである。
【図２２】図２２は、ＤＳＣプロットである。
【図２３】図２３は、ＤＳＣプロットである。
【図２４】図２４は、ＤＳＣプロットである。
【図２５】図２５は、ＤＳＣプロットである。
【図２６】図２６は、ＤＳＣプロットである。
【図２７】図２７は、ＤＳＣプロットである。
【図２８】図２８ａおよび図２８ｂは、ＤＳＣプロットである。
【図２９】図２９は、ＨＦＡ－１３４ａにおけるインスリンの安定性のデータを示すチャートである。
【図３０】図３０は、３種の吸入デバイスを使用して、インスリンの空気力学的な性能を比較するチャートである。
【図３１】図３１は、２５℃で保存されたインスリン出発物質と比較した、インスリン球状小粒子の安定性のデータのチャートである。
【図３２】図３２は、３７℃で保存されたインスリン出発物質と比較した、インスリン球状小粒子の安定性のデータのチャートである。
【図３３】図３３は、２５℃で保存されたインスリン出発物質と比較した、インスリン球状小粒子の安定性のデータのチャートである。
【図３４】図３４は、３７℃で保存されたインスリン出発物質と比較した、インスリン球状小粒子の安定性のデータのチャートである。
【図３５】図３５は、２５℃で保存されたインスリン出発物質と比較した、インスリン球状小粒子の安定性のデータのチャートである。
【図３６】図３６は、３７℃で保存されたインスリン出発物質と比較した、インスリン球状小粒子の安定性のデータのチャートである。
【図３７】図３７は、Ｃｙｃｌｏｈａｌｅｒ　ＤＰＩを使用する、インスリンの空気力学的な安定性の棒グラフである。
【図３８】図３８は、Ｄａｎｅｓ球状小粒子の光学顕微鏡写真である。
【図３９】図３９は、ＤＮａｓｅの酵素活性のチャートである。
【図４０】図４０は、ＳＯＤ球状小粒子の光学顕微鏡写真である。
【図４１】図４１は、ＳＯＤ球状小粒子についての酵素学的データのチャートである。
【図４２】図４２ａ～図４２ｂは、連続的乳化反応器の略図であり、図４２Ａは、乳化前に連続相または分散相に界面活性化合物が添加される場合の連続的乳化反応器の略図であり、そして図４２Ｂは、乳化後に連続相または分散相に界面活性化合物が添加される場合の連続的乳化反応器の略図である。

【図１】

図1：実施例1に記載される通りに調製された抗第VIII因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの光学顕微鏡画像（VBL－0224－MAB2, VBL－0224－MAB9）

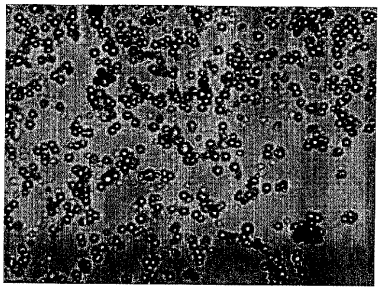


FIG 1a

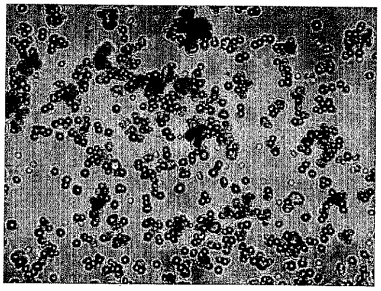


FIG 1b

【図２】

図2：実施例1に記載される通りに調製された抗第VIII因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの光学顕微鏡画像（VBL－0224－MAB2, VBL－0224－MAB9）

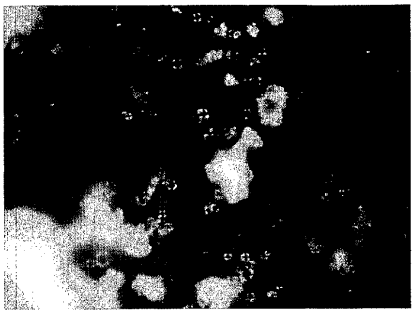


FIG 2a

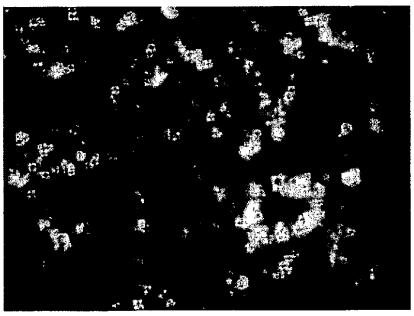


FIG 2b

【図３】

図3：実施例2に記載される通りに見た抗第VIII因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの走査電子顕微鏡写真

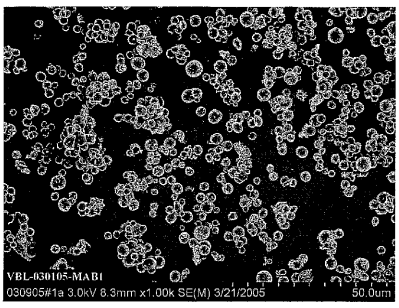


FIG 3a

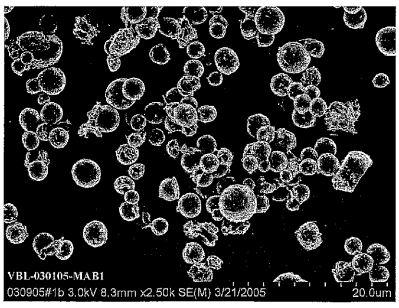


FIG 3b

【図４】

図4：実施例3に記載されるような抗第VIII因子モノクローナル抗体（出発物質および溶解γ(starting したミクロスフェア）のゲル電気泳動画像

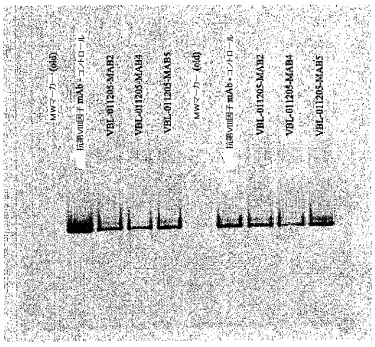


FIG 4a

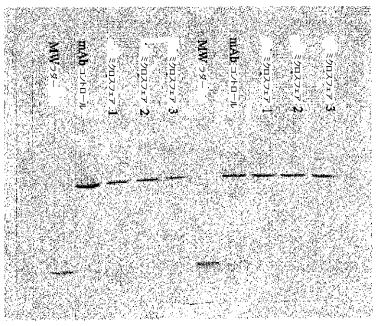


FIG 4b

【図５】

図5：実施例5に記載される通りに見た抗第VIII因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの走査電子顕微鏡写真

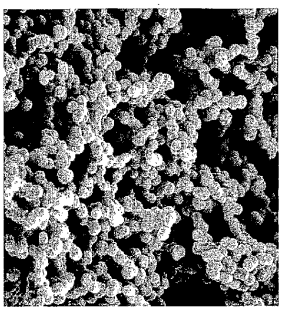


FIG. 5

【図６】

図6：実施例6に記載されるような抗第VIII因子モノクローナル抗体のミクロスフェアの数、表面積および体積分布による粒子サイズ分布

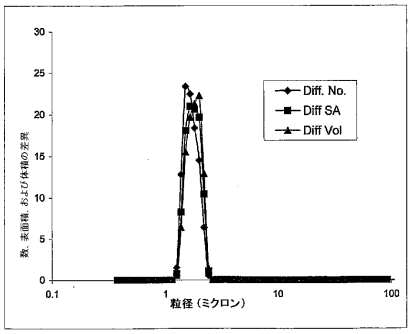


FIG. 6

【図７】

図7：実施例7に記載される通りに調製された抗CD34モノクローナル抗体のミクロスフェアの光学顕微鏡画像（VBL－0307－MAB1，VBL－0307－MAB2）

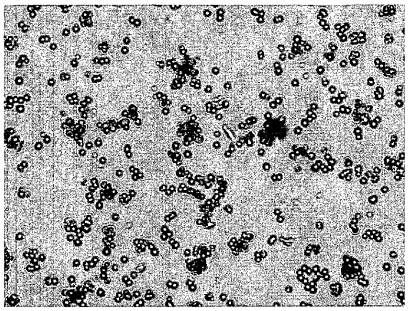


FIG 7a

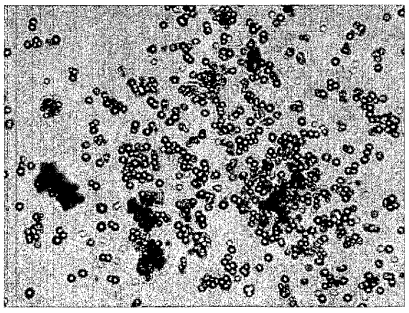


FIG 7b

【図８】

図8：実施例8に記載される通りに調製された抗CD34モノクローナル抗体のミクロスフェアの光学顕微鏡画像

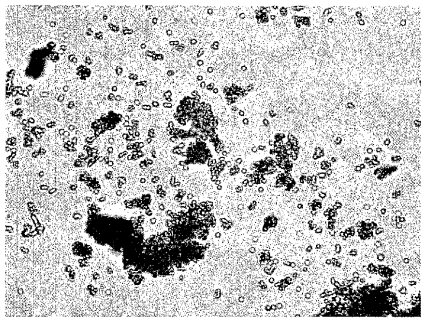


FIG. 8

【図９】

図9：実施例7に記載される通りに調製された抗CD34モノクローナル抗体のミクロスフェアの走査電子顕微鏡写真

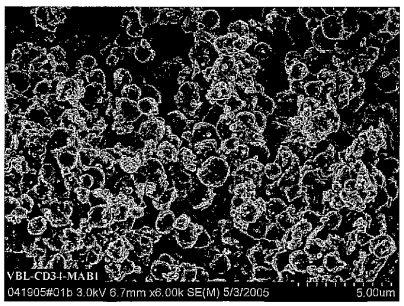


FIG. 9

【図１０】

図10－実施例7に記載される通りに調製された抗CD34モノクローナル抗体のミクロスフェアの数の分布による空気力学的な粒子サイズ分布

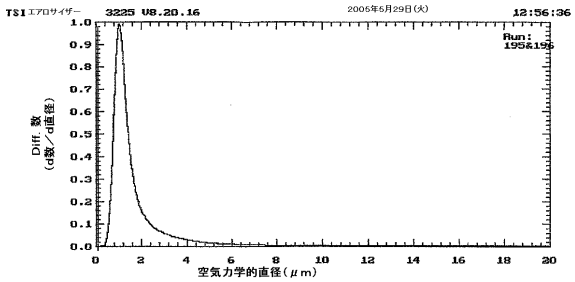


FIG. 10

【図１１】

図11－実施例11に記載されるような抗CD34モノクローナル抗体のミクロスフェア（2スリット構造を有する）およびヘキサトリアコンタン：ケイ素混合物の、粉末X線回折

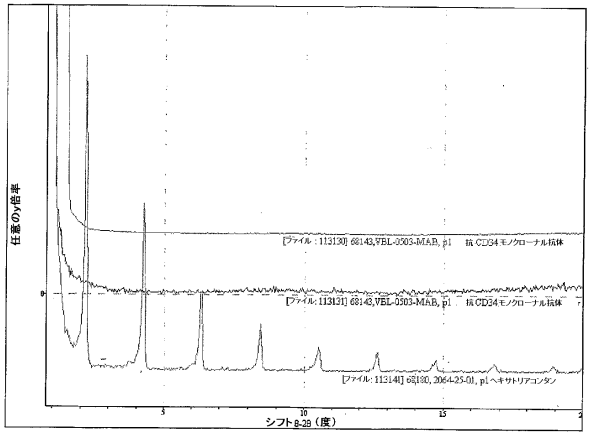


FIG. 11

【図１２】

図12－実施例12に記載されるようなポロキサマーを伴う、冷却の間の抗CD34モノクローナル抗体のミクロスフェアに関する立体配置安定性の蛍光モニタリング

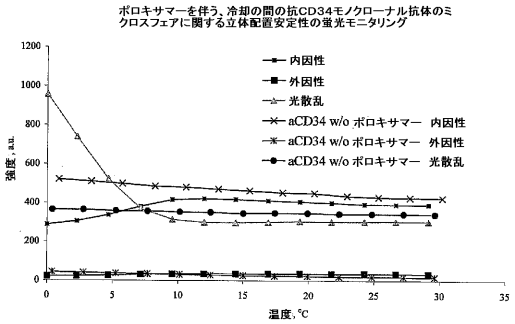


FIG. 12

【図１３】

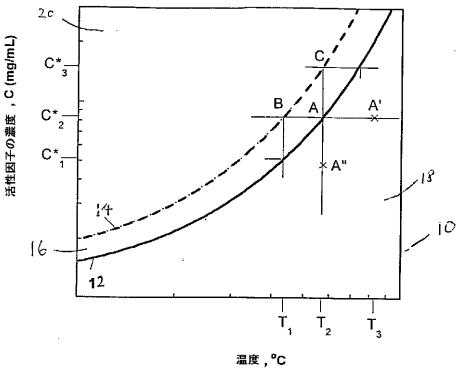


FIG. 13

【図１４】

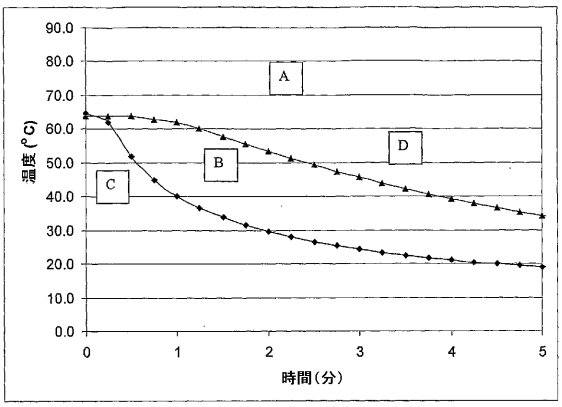


図14．緩衝化したポリマー溶液中のインスリンの相変化に対する溶液温度および冷却速度の影響。60℃を超える温度では、インスリンは溶液のままである（領域A）。領域Bは、熱交換器において見出される、最高温度（◆）および最低温度（▲）の変化速度によって区切られる最適な球状小粒子形成の領域を示す。より速い冷却速度（領域C）は、非常に微細な非球状粒子形成を生じる一方で、より遅い冷却速度（領域D）は、不規則な形状の粒子および線状沈殿と共に種々のサイズの球状小粒子の混合物を生じる。

【図１５】

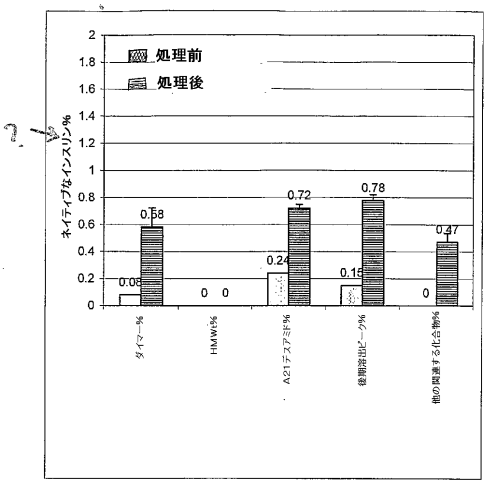


図15. インスリンミクロスフェアの製造プロセスの間の化学的安定性。HPLC分析は、このプロセスに関する高分子量化合物の増加を示さず、そしてダイマーの%、A21デスアミドインスリンの%、後期溶出ピークの%、および他の化合物の%の（出発インスリン物質に対する）増加は、USP限度の範囲内であったことことを示した。

【図１６】

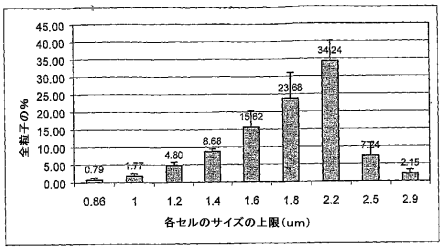


図16a. インスリン球状小粒子のサイズ分布（Aerosizer飛行時間データ）。生成された全6個のバッチに関して、96%をより多い粒子サイズは、0．86ミクロンと2．9ミクロンとの間に収まり、60%を超える粒子サイズは、1．6ミクロンと2．5ミクロンとの間に収まった。1．1%未満の球状小粒子は、このグラフによって示されるサイズ範囲の外側であった。

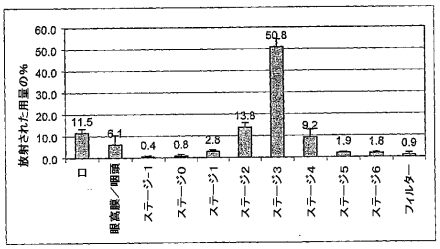
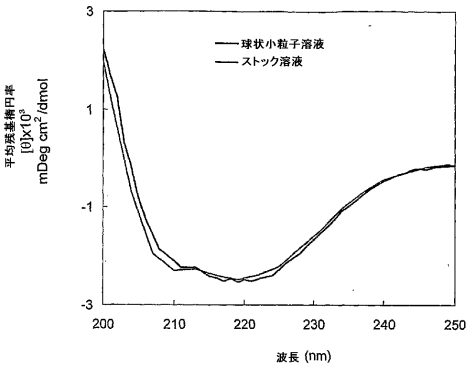


図16b. Anderson Cascade Impactorによるインスリン球状小粒子のサイズ分布。データは、Cyclohaler deviceから、60LPMにて運ばれるインスリン球状小粒子の6個のバッチの結果の平均値（平均＋／－SD）である。ステージ1、2、3および4に対するECDは、それぞれ、4．4μm、3．3μm、2．0μm、および1．1μmであった。

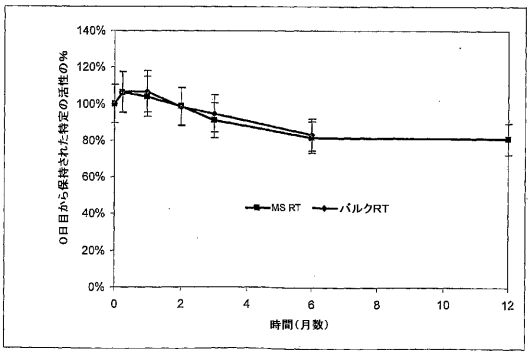
【図１７Ａ】

図17a. 円偏光二色性



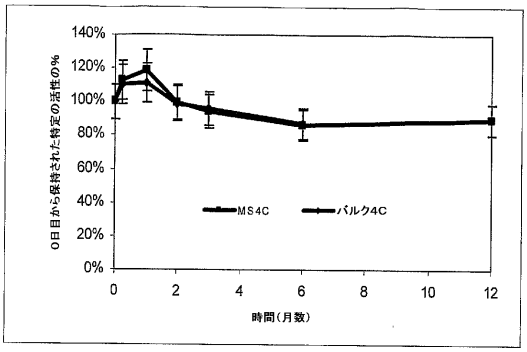
【図１７Ｂ】

図17b. 室温の貯蔵安定性



【図１７Ｃ】

図17c. 貯蔵安定性



【図１８】

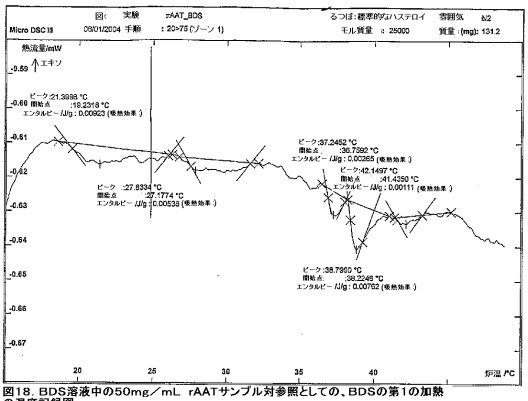


図18. BDS溶液中の50mg／mL rAATサンプル対参照としての、BDSの第1の加熱の温度記録図

【図１９】

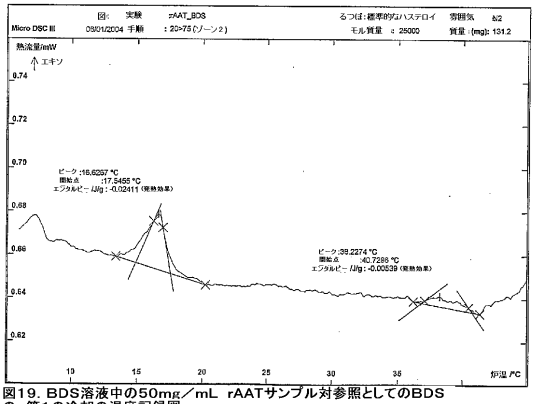


図19. BDS溶液中の50mg／mL rAATサンプル対参照としてのBDSの、第1の冷却の温度記録図

【図２０】

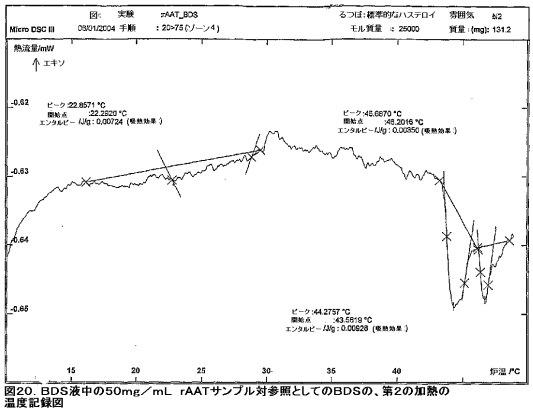


図20. BDS液中の50mg／mL rAATサンプル対参照としてのBDSの、第2の加熱の温度記録図

【図２１】

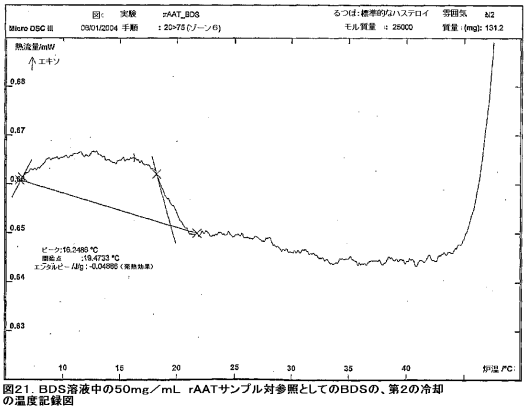


図21. BDS溶液中の50mg／mL rAATサンプル対参照としてのBDSの、第2の冷却の温度記録図

【図２２】

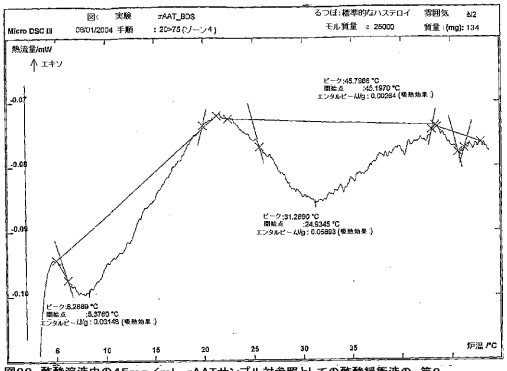


図22. 酢酸溶液中の45mg／mL rAATサンプル対参照としての酢酸緩衝液の、第2の加熱の温度記録図

【図２３】

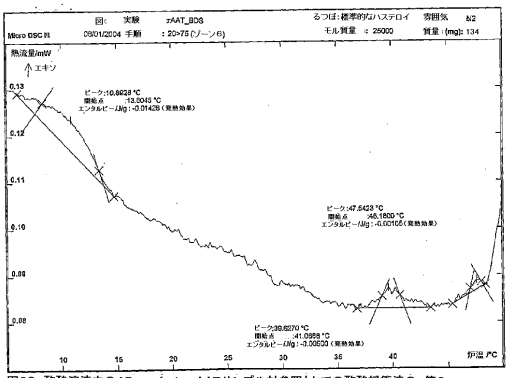


図23. 酢酸溶液中の45mg／mL rAATサンプル対参照としての酢酸緩衝液の、第2の冷却の温度記録図

【図２４】

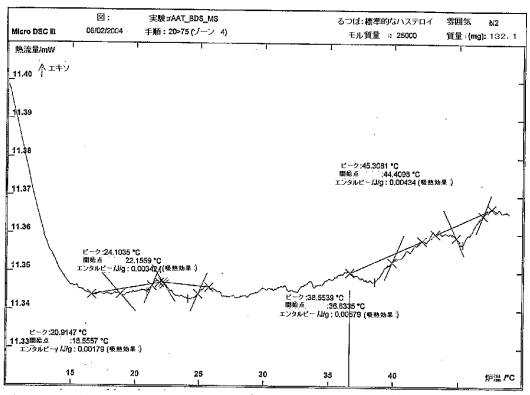


図24. BDS溶液中の1mg／mL rAATサンプル対参照としてのBDS緩衝液の、第2の加熱の温度記録図。rAATサンプルは、BDSにrAAT3球状小粒子を溶解することによって生じた

【図２５】

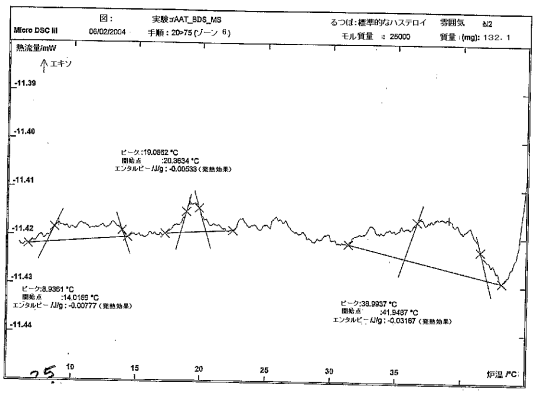


図25. BDS溶液中の1mg／mL rAATサンプル対参照としてのBDS緩衝液の、第2の冷却の温度記録図。rAATサンプルは、BDSにrAAT3球状小粒子を溶解することによって生じた。

【図２６】

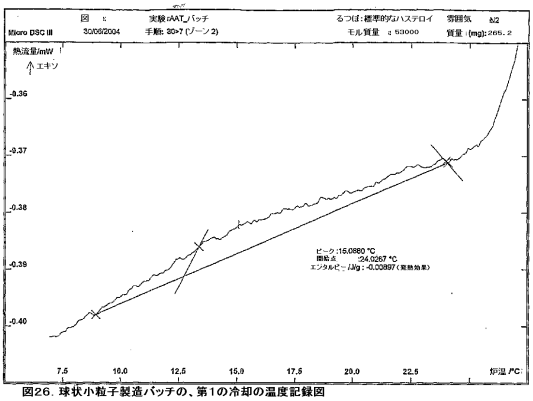


図26. 球状小粒子製造バッチの、第1の冷却の温度記録図

【図２７】

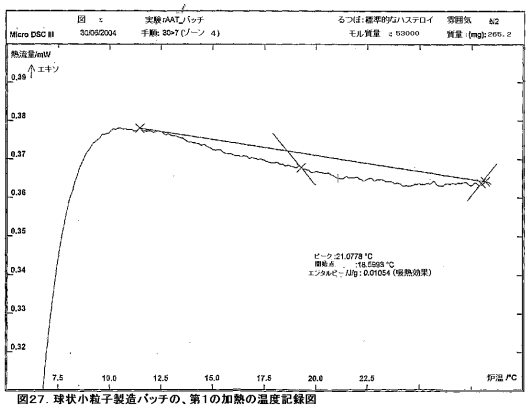


図27. 球状小粒子製造バッチの、第１の加熱の温度記録図

【図２８】

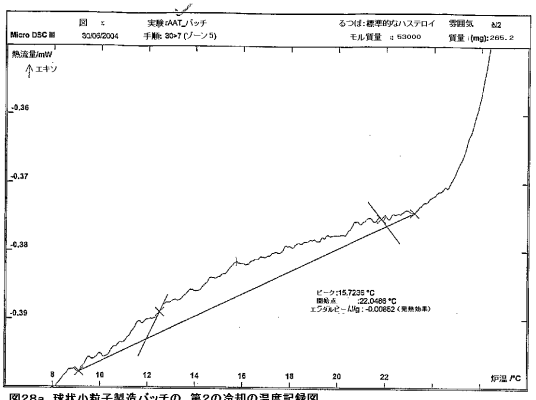


図28a. 球状小粒子製造バッチの、第２の冷却の温度記録図

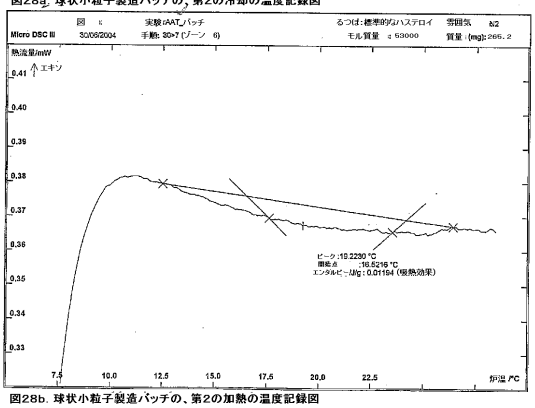


図28b. 球状小粒子製造バッチの、第２の加熱の温度記録図

【図２９】

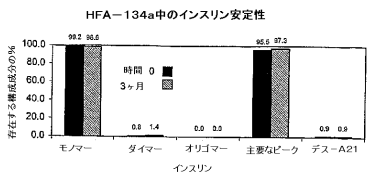


図29. ミクロスフェア形態おけるインスリンは、HFA 134a噴霧剤中での保存後に、安定性を維持する。

【図３０】

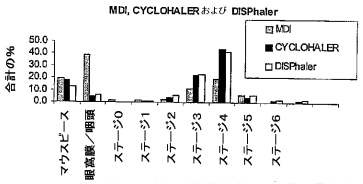


図30. インスリン球状小粒子の空気力学的性能は、3種の異なる吸入デバイス(MDI、Cyclohaler DPI、およびDisphaler DPI)を使用して比較される。

【図３１】

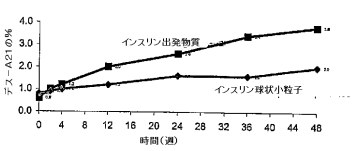


図31. 25℃の保存温度において、出発物質のA21－デスアミドインスリン形成の%は、インスリン球状小粒子と比較して、有意に大きくなる。この結果は、インスリン球状小粒子が、安定化賦形剤を添加しない出発物質より化学的分解に対して、有意に安定であることを示す。

【図３２】

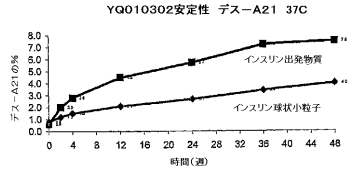


図32. 37℃の保存温度において、出発物質のA21－デスアミドインスリン形成の%は、インスリン球状小粒子と比較して、有意に大きくなる。この結果は、インスリン球状小粒子が、安定化賦形剤を添加しない出発物質より化学的分解に対して、有意に安定であることを示す。

【図３３】

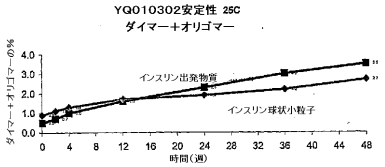


図33. 25℃の保存温度において、出発物質のインスリンのダイマーおよびオリゴマーの形成の%は、インスリン球状小粒子と比較して、有意に大きくなる。この結果は、インスリン球状小粒子が、安定化賦形剤を添加しない出発物質より化学的分解に対して、有意に安定であることを示す。

【図３４】

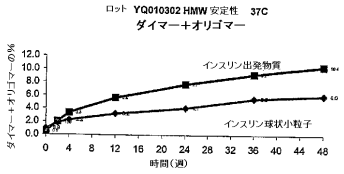


図34. 37℃の保存温度において、出発物質のインスリンのダイマーおよびオリゴマーの形成の%は、インスリン球状小粒子と比較して、有意に大きくなる。この結果は、インスリン球状小粒子が、安定化賦形剤を添加しない出発物質より化学的分解に対して、有意に安定であることを示す

【図３５】

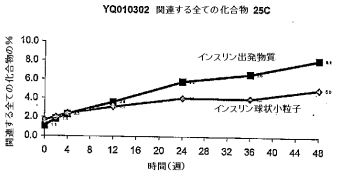


図35. 25℃の保存温度において、出発物質のインスリンに関連する全ての化合物の形成の%は、インスリン球状小粒子と比較して、有意に大きくなる。この結果は、インスリン球状小粒子が、安定化賦形剤を添加しない出発物質より化学的分解に対して、有意に安定であることを示す。

【図３６】

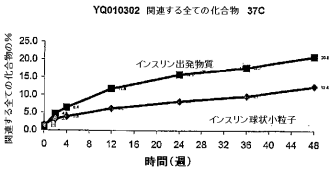


図36. 37℃の保存温度において、出発物質のインスリンに関連する全ての化合物の形成の%は、インスリン球状小粒子と比較して、有意に大きくなる。この結果は、インスリン球状小粒子が、安定化賦形剤を添加しない出発物質より化学的分解に対して、有意に安定であることを示す。

【図３７】

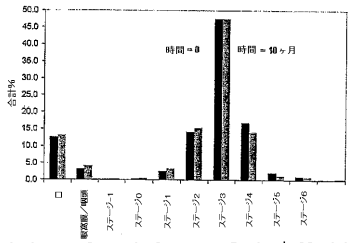


図37. Andersen Cascade Impactor Device中でCyclohaler DPIを使用して試験された、インスリン球状小粒子の空力学的安定性。

【図３８】

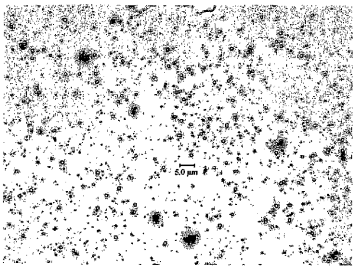


図38. Nikon光学顕微鏡、100×油浸レンズ

【図３９】

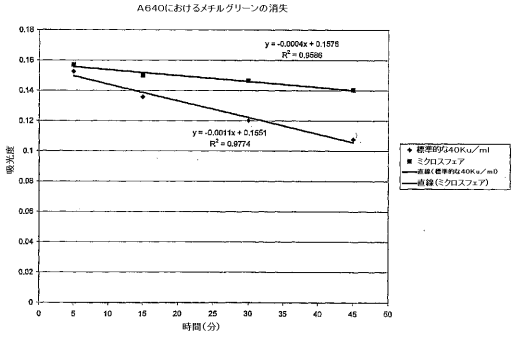


FIG. 39

【図４０】

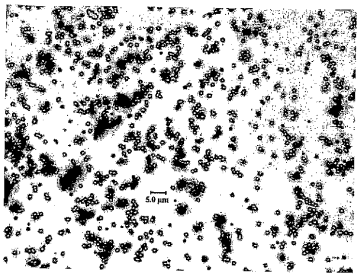


図40. Nikon光学顕微鏡、100×油浸レンズ、乾燥粉末サンプル

【図４１】

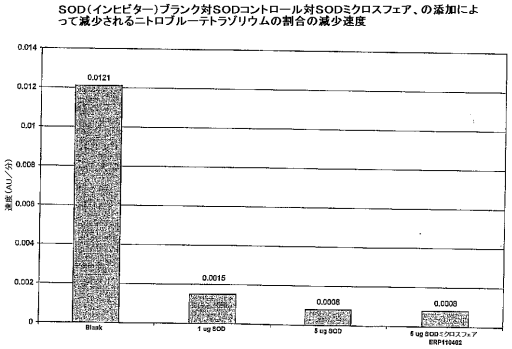


図41. Worthington Biochemical Catalogueに記載される活性アッセイ

【図４２】

FIG 42a

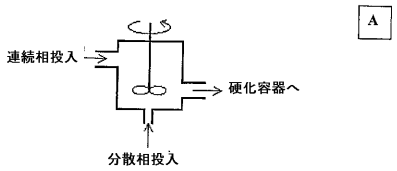


FIG 42b

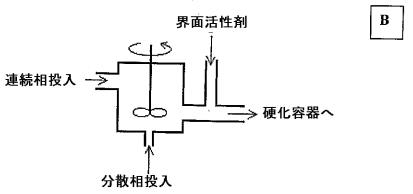


図41. 連続的乳化反応器の概略図:
A)界面活性化合物は、乳化前に連続相または分散相に添加される。
B)界面活性化合物は、乳化後に添加される。

フロントページの続き

(73)特許権者 501453189
バクスター・ヘルスケヤー・ソシエテ・アノニム
Ｂａｘｔｅｒ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＳＡ
スイス国 ８１５２ グラットパーク （オプフィコン）, サーガウアーシュトラーセ １３０
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 ブラウン, ラリー アール.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１５９, ニュートン, サマー ストリート ２５
(72)発明者 ビスカーライブ, ベレッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８０１, ウォバーン, ソウ ミル ブルック ウェイ １６
(72)発明者 ラフレニエール, デブラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２７１５, ディグトン, ウェリントン ストリート ２０９０
(72)発明者 マクギーハン, ジョン
アメリカ合衆国 ニュージャージー ０８０９６, ウッドベリー, ヘシアン アベニュー １５２
(72)発明者 ラシュバーステップ, ジュリア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４５９, ニュートン, アデライン ロード １２３
(72)発明者 スコット, テレンス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８９０, ウィンチェスター, フェンウィック ロード ６

合議体
審判長 田村 明照
審判官 齋藤 恵
審判官 岩下 直人

(56)参考文献 国際公開第０２／３９９８５（WO, Ａ１）
国際公開第０２／０２８３７０（WO, Ａ１）
国際公開第０３／０００１４（WO, Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K