

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5085313号
(P5085313)

(45) 発行日 平成24年11月28日(2012.11.28)

(24) 登録日 平成24年9月14日(2012.9.14)

(51) Int.Cl.	F I
B 0 1 J 13/04 (2006.01)	B O 1 J 13/02 A
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/14

請求項の数 17 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-500604 (P2007-500604)
 (86) (22) 出願日 平成18年1月27日 (2006.1.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/301342
 (87) 国際公開番号 W02006/080451
 (87) 国際公開日 平成18年8月3日 (2006.8.3)
 審査請求日 平成20年12月1日 (2008.12.1)
 (31) 優先権主張番号 特願2005-22240 (P2005-22240)
 (32) 優先日 平成17年1月28日 (2005.1.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000001029
 協和発酵キリン株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (72) 発明者 八木 信宏
 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和
 発酵工業株式会社 医薬研究センター内
 (72) 発明者 徳田 拓弥
 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和
 発酵工業株式会社 医薬研究センター内
 (72) 発明者 中倉 政司
 大阪府堺市堺区高須町一丁目5番3号 協
 和発酵工業株式会社 堺研究所内
 (72) 発明者 加藤 泰己
 静岡県裾野市千福が丘2-8-7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被覆微粒子の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コア微粒子が、脂質膜となる脂質および界面活性剤から選ばれる1つ以上の物質である被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法であって、

被覆層成分が可溶性有機溶媒を含み、該被覆層成分が溶解した液(液A)を調製する工程、

液Aと混合可能であり、かつ該コア微粒子が分散し、該有機溶媒を含まないまたは液Aより低い割合で該有機溶媒を含む液(液B)を調製する工程、および

液Aと液Bを混合し、該コア微粒子が該被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程を含み、

液Aおよび液Bの有機溶媒の濃度を、液Aと液Bの混合液中の有機溶媒の濃度が20~80vol%であり、かつ液Aと液Bの混合液中でコア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能である有機溶媒の濃度にすることを特徴とする該コア微粒子が該被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法。

【請求項2】

コア微粒子が、脂質膜となる脂質および界面活性剤から選ばれる1つ以上の物質である被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法であって、

該被覆層成分が分散した液(液D)を調製する工程、

液Dと混合可能であり、かつ該コア微粒子が分散した液(液E)を調製する工程、および

液Dと液Eを混合し、該コア微粒子が該被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置また

は混合する工程を含み、

液Dおよび液Eの少なくとも一方を、被覆層成分が可溶性極性有機溶媒を含む液とし、液Dおよび液Eの極性有機溶媒の濃度を、液Dと液Eの混合液中の極性有機溶媒の濃度が20～80vol%であり、かつ液Dと液Eの混合液中でコア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能である極性有機溶媒の濃度にすることを特徴とする該コア微粒子が該被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法。

【請求項3】

コア微粒子が、脂質膜となる脂質および界面活性剤から選ばれる1つ以上の物質である被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法であって、

極性有機溶媒以外の溶媒中に、該被覆層成分が分散し、かつ該コア微粒子が分散した液(液H)を調製する工程、ならびに

液Hと混合可能であり、かつ極性有機溶媒を含有する液を、液Hに混合し、該コア微粒子が該被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程を含み、

極性有機溶媒が、該被覆層成分が可溶性極性有機溶媒であり、極性有機溶媒を含有する液中の極性有機溶媒の濃度を、該極性有機溶媒を含有する液と液Hの混合液中の極性有機溶媒の濃度が20～80vol%であり、かつ該極性有機溶媒を含有する液と液Hの混合液中でコア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能である極性有機溶媒の濃度にすることを特徴とする該コア微粒子が該被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法。

【請求項4】

極性有機溶媒がアルコール、グリコールおよびポリアルキレングリコールから選ばれる一つ以上であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の製造方法。

【請求項5】

被覆層成分が、被覆層が脂質膜となる脂質および界面活性剤から選ばれる1つ以上の物質、ならびに糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤である請求項1～4のいずれかに記載の製造方法。

【請求項6】

コア微粒子が、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤を含む請求項1～5のいずれかに記載の製造方法。

【請求項7】

糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤が、ポリエチレングリコール化脂質、ポリグリセリン化脂質、ポリエチレングリコールアルキルエーテル、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールおよびグリセリン脂肪酸エステルから選ばれる一つ以上である請求項5または6記載の製造方法。

【請求項8】

コア微粒子が該被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程の後、極性有機溶媒を含む液から極性有機溶媒を除去または極性有機溶媒の濃度を減少させる工程を含む請求項1～7のいずれかに記載の製造方法。

【請求項9】

コア微粒子が、薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドおよび微粒子製剤から選ばれる一つ以上を構成成分とする微粒子である請求項1～8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項10】

コア微粒子が、薬物を構成成分とする微粒子である請求項1～8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項11】

10

20

30

40

50

コア微粒子が、薬物と、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドおよび微粒子製剤から選ばれる一つ以上との複合体を構成成分とする微粒子である請求項1~8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項12】

脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤が、薬物と静電的に逆の電荷をもつものである請求項11記載の製造方法。

【請求項13】

コア微粒子が、アニオン性の薬物と、カチオン性脂質を含有するリポソームとの複合体を構成成分とする微粒子である請求項1~8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項14】

コア微粒子が、カチオン性の薬物と、アニオン性脂質を含有するリポソームとの複合体を構成成分とする微粒子である請求項1~8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項15】

コア微粒子が、さらに付着競合剤を含む微粒子である請求項12~14のいずれかに記載の製造方法。

【請求項16】

薬物が、ペプチド、蛋白質、核酸、低分子化合物、糖類および高分子化合物から選ばれる一つ以上である請求項9~15のいずれかに記載の製造方法。

【請求項17】

薬物が、遺伝子、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミドおよびsiRNAから選ばれる一つ以上である請求項9~15のいずれかに記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被覆微粒子の製造方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

従来から、医薬品、食品、農薬、動物用薬等の分野において、被覆微粒子の製造方法に関して多くの技術の開示が行われている。微粒子（被覆される微粒子）の被覆層成分による被覆は、例えば外的因子から受ける影響を抑制するため、外的因子の影響を選択的に受け入れ、それをトリガーとして微粒子に変化を起こすため等、微粒子に機能を付与する目的で行われている。その一つとして、液体中で微粒子を脂質膜で被覆する方法が報告されている（特許文献1参照）。該方法においては、微粒子が分散し、かつ脂質が溶解した極性有機溶媒含有水溶液中の極性有機溶媒の割合を減少させることによって、微粒子が脂質膜で被覆されており、液体中において被覆が行われ、例えば静脈注射用微粒子等に好適な大きさの被覆微粒子が、すぐれた効率で製造されている。

【0003】

また、液体中でミセル粒子を脂質膜で被覆する方法が報告されている（特許文献2および3参照）。特許文献2における該方法は、例えば、カチオン性脂質をクロロホルムに予め溶解し、次いでオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の水溶液とメタノールを加え混合後、遠心分離することでクロロホルム層にカチオン性脂質/ODNの複合体を移行させ、さらに該クロロホルム層を取り出し、これにポリエチレングリコール化リン脂質と中性の脂質と水を加えて油中水型（W/O）エマルジョンを形成し、逆相蒸発法で処理してODN内包リポソームを製造する方法であり、一方、特許文献3における該方法は、例えば、10~90%エタノール中で、ヒスチジン/フソジェニックペプチド結合体を有するプラスミドまたはオリゴヌクレオチドDNAと脂質成分との間の複合体（ミセル）を形成させ、水を用いた希釈と、予め作製されたリポソームまたは脂質との混合を行って、ミセルをリポソームに変換し、透析および膜を介して該リポソームを押し出して、プラスミドまたはオリゴヌクレオチドをエンラップしたリポソームを製造する方法である。

【特許文献1】国際公開第02/28367号パンフレット

10

20

30

40

50

【特許文献2】特表2002-508765号公報

【特許文献3】特表2003-535832号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、より簡便な方法によるコア微粒子が被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は以下の(1)~(27)に関する。

10

(1) 被覆層成分が可溶性極性有機溶媒を含む液中に、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能な濃度で該極性有機溶媒を含ませ、該液中に該コア微粒子および該被覆層成分を分散させる工程(工程A)および該コア微粒子を該被覆層成分で被覆する工程(工程B)を含むことを特徴とする該コア微粒子が該被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法。

(2) 工程Bが、工程Aで得られる液を、該コア微粒子が該被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程であることを特徴とする前記(1)の製造方法。

(3) 工程Aが、該被覆層成分が溶解した極性有機溶媒を含む液(液A)を調製する工程、

液Aと混合可能であり、かつ該コア微粒子が分散し、該極性有機溶媒を含まないまたは液Aより低い割合で該極性有機溶媒を含む液(液B)を調製する工程、および

20

液Aと液Bを混合して液Cを調製する工程を含むことを特徴とする前記(1)または(2)の製造方法。

(4) 工程Aが、該被覆層成分が分散した液(液D)を調製する工程、

液Dと混合可能であり、かつ該コア微粒子が分散した液(液E)を調製する工程、および

液Dと液Eを混合して液Fを調製する工程を含み、

液Dおよび液Eの少なくとも一方を、極性有機溶媒を含有する液とすることを特徴とする前記(1)または(2)の製造方法。

(5) 工程Aが、該被覆層成分が分散した極性有機溶媒を含む液(液G)を調製する工程および

30

液Gに該コア微粒子を分散させる工程を含むことを特徴とする前記(1)または(2)の製造方法。

(6) 工程Aが、該被覆層成分および該コア微粒子が分散した液(液H)を調製する工程、ならびに

液Hと混合可能であり、かつ極性有機溶媒を含有する液を、液Hと混合して液Iを調製する工程を含むことを特徴とする前記(1)または(2)の製造方法。

(7) 極性有機溶媒がアルコール、グリコールおよびポリアルキレングリコールから選ばれる一つ以上であることを特徴とする前記(1)~(6)のいずれかの製造方法。

(8) 工程Bにおいて極性有機溶媒を含有する液中の極性有機溶媒の濃度を1~80vol%とすることを特徴とする前記(1)~(7)のいずれかの製造方法。

40

(9) 被覆層成分が、被覆層が脂質膜となる脂質および界面活性剤から選ばれる一つ以上の物質である前記(1)~(8)のいずれかの製造方法。

(10) 被覆層成分が、被覆層が脂質膜となる脂質および界面活性剤から選ばれる一つ以上の物質、ならびに糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる一つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤である前記(1)~(8)のいずれかの製造方法。

(11) コア微粒子が、糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる一つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤を含む前記(1)~(10)のいずれかの製造方法。

50

(12) 糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤が、ポリエチレングリコール化脂質、ポリグリセリン化脂質、ポリエチレングリコールアルキルエーテル、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールおよびグリセリン脂肪酸エステルから選ばれる一つ以上である前記(10)または(11)の製造方法。

(13) 工程Bの後、極性有機溶媒を含む液から極性有機溶媒を除去または極性有機溶媒の濃度を減少させる工程を含む前記(1)~(12)のいずれかの製造方法。

(14) コア微粒子が、薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドおよび微粒子製剤から選ばれる一つ以上を構成成分とする微粒子である前記(1)~(13)のいずれかの製造方法。

10

(15) コア微粒子が、薬物を構成成分とする微粒子である前記(1)~(13)のいずれかの製造方法。

(16) コア微粒子が、薬物と、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドおよび微粒子製剤から選ばれる一つ以上との複合体を構成成分とする微粒子である前記(1)~(13)のいずれかの製造方法。

(17) 脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤が、薬物と静電的に逆の電荷をもつものである前記(16)の製造方法。

(18) コア微粒子が、アニオン性の薬物と、カチオン性脂質を含有するリポソームとの複合体を構成成分とする微粒子である前記(1)~(13)のいずれかの製造方法。

20

(19) コア微粒子が、カチオン性の薬物と、アニオン性脂質を含有するリポソームとの複合体を構成成分とする微粒子である前記(1)~(13)のいずれかの製造方法。

(20) コア微粒子が、さらに付着競合剤を含む微粒子である前記(17)~(19)のいずれかの製造方法。

(21) 薬物が、ペプチド、蛋白質、核酸、低分子化合物、糖類および高分子化合物から選ばれる一つ以上である前記(14)~(20)のいずれかの製造方法。

(22) 薬物が、遺伝子、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミドおよびsiRNAから選ばれる一つ以上である前記(14)~(20)のいずれかの製造方法。

(23) 前記(1)~(22)のいずれかの製造方法によって被覆微粒子を調製するための、少なくともコア微粒子、被覆層成分および極性有機溶媒を含有する液から構成されるキット。

30

(24) 前記(1)~(22)のいずれかの製造方法を用いて製造できる被覆微粒子。

(25) 前記(15)~(22)のいずれかの製造方法を用いて製造できる被覆微粒子のうち、薬物が抗腫瘍薬である該被覆微粒子を含有する腫瘍の治療剤。

(26) 前記(15)~(22)のいずれかの製造方法を用いて製造できる被覆微粒子のうち、薬物が抗炎症薬である該被覆微粒子を含有する炎症の治療剤。

(27) 前記(15)~(22)のいずれかの製造方法を用いて製造できる被覆微粒子からなる腫瘍または炎症部位への薬物含有キャリアー。

【発明の効果】

【0006】

40

本発明により、コア微粒子が被覆層成分で被覆された被覆微粒子の簡便な製造方法等が提供される。また、本発明によって、効率よくおよび/または堅固に薬物を含有させた被覆微粒子の製造方法等が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】実施例4および比較例2で得られた各製剤について、ラットに投与後の血中動態推移を表わしている。は実施例4、は比較例2で得られた製剤の投与群をそれぞれ表わしている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

50

本発明における被覆微粒子とは、少なくともコア微粒子と被覆層からなる微粒子のことであり、被覆層を構成する被覆層成分がコア微粒子の外側を被覆して形成される微粒子のことである。

【0009】

本発明におけるコア微粒子とは、例えば、薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等を構成成分とする微粒子のことであり、好ましくは少なくとも薬物を構成成分とする微粒子があげられる。また、本発明におけるコア微粒子は、薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等を2つ以上組み合わせた複合体を構成成分としていてもよく、薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等と他の化合物（例えば糖、脂質、無機化合物等）とを組み合わせた複合体を構成成分としていてもよく、好ましくは薬物と、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドおよび微粒子製剤から選ばれる1つ以上との複合体を構成成分とする微粒子があげられ、より好ましくは薬物とリポソームとの複合体を構成成分とする微粒子があげられる。

10

【0010】

薬物は、極性有機溶媒を含有する液における溶媒中で微粒子の形態をとる薬物、コア微粒子を構成する他の構成成分と複合体を形成して該溶媒中で微粒子の形態をとる薬物等を包含し、例えば蛋白質、ペプチド、核酸、低分子化合物、糖類、高分子化合物、脂質性化合物、金属化合物等のうち薬理的活性を有する物質があげられ、好ましくは、核酸があげられ、より好ましくは、遺伝子、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド(ODN)、プラスミドおよびsiRNAから選ばれる1つ以上の物質があげられる。

20

【0011】

蛋白質またはペプチドとしては、例えばブラジキニン、アンジオテンシン、オキシトシン、バソプレシン、アドレノコルチコトロピン、カルシトニン、インスリン、グルカゴン、コレシストキニン、 β -エンドルフィン、メラノサイト阻害因子、メラノサイト刺激ホルモン、ガストリンアンタゴニスト、ニューロテンシン、ソマトスタチン、ブルシン、シクロスポリン、エンケファリン、トランスフェリン、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)ペプチド、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、性腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、ウリカーゼ、カルボキシペプチダーゼ、グルタミナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、ストレプトキナーゼ、インターロイキン、インターフェロン、ムラミルジペプチド、サイモポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、トロンボポエチン、トリプシンインヒビター、リゾチーム、表皮成長因子(EGF)、インスリン様成長因子、神経成長因子、血小板由来成長因子、形質転換成長因子、内皮細胞成長因子、フィブロblast(繊維芽細胞)成長因子、グリア細胞成長因子、サイモシン、特異抗体(例えば、抗EGF受容体抗体等があげられる)等があげられる。

30

【0012】

核酸としては、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、センスオリゴヌクレオチド等のODN、遺伝子、DNA、RNA、プラスミド、siRNA等があげられ、該核酸は、核酸の構造中のリン酸部、エステル部等に含まれる酸素原子等が、例えば硫黄原子等の他の原子に置換された誘導体を包含する。なお、siRNAとは、短い二本鎖RNAのことである。

40

【0013】

低分子化合物としては、例えばイプシロン-アミノカプロン酸、塩酸アルギニン、L-アスパラギン酸カリウム、トラネキサム酸、硫酸プレオマイシン、硫酸ピンクリスチン、セファゾリンナトリウム、セファロチンナトリウム、シチコリン、シタラピン、硫酸ゲンタマイシン、塩酸バンコマイシン、硫酸カナマイシン、硫酸アミカシン等があげられる。

【0014】

50

糖類としては、例えばコンドロイチン硫酸ナトリウム、ヘパリンナトリウム、デキストランフルオレセイン等があげられる。

【0015】

高分子化合物としては、例えばポリエチレンスルホン酸ナトリウム、ジビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体(DIVEMA)、スチレン無水マレイン酸共重合体-ネオカルチノスタチン結合体(SMANCS)等があげられる。

脂質性化合物としては、例えばビタミンD、ビタミンE等があげられる。

金属化合物としては、例えばシスプラチン等があげられる。

【0016】

脂質集合体またはリポソームは、例えば脂質および/または界面活性剤等によって構成され、脂質としては、単純脂質、複合脂質または誘導脂質のいかなるものであってもよく、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴイド、ステロール、カチオン性脂質等があげられ、好ましくはリン脂質、カチオン性脂質等があげられる。また、脂質としては、例えば界面活性剤(後記の界面活性剤と同義)、高分子(後記の高分子と同義、具体的にはデキストラン等)、ポリオキシエチレン誘導體(具体的にはポリエチレングリコール等)等の脂質誘導體もあげられ、好ましくはポリエチレングリコール化リン脂質があげられる。界面活性剤としては、例えば非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤等があげられる。

10

【0017】

リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン(具体的には大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン(EPG)、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン等)、ホスファチジルエタノールアミン(具体的にはジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン等)、グリセロリン脂質(具体的にはホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン等)、スフィンゴリン脂質(具体的にはスフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホグリセロール、セラミドホスホグリセリン酸等)、グリセロホスホノ脂質、スフィンゴホスホノ脂質、天然レシチン(具体的には卵黄レシチン、大豆レシチン等)、水素添加リン脂質(具体的には水素添加大豆ホスファチジルコリン等)等の天然または合成のリン脂質があげられる。

20

30

【0018】

グリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリド等があげられる。

【0019】

スフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド等があげられる。

【0020】

スフィンゴイドとしては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガン、スフィンゴシン、それらの誘導體等があげられる。誘導體としては、例えばスフィンガン、イコサスフィンガン、スフィンゴシン等の $-NH_2$ を $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (式中、 x は0~18の整数を表し、中でも6、12または18が好ましい)に変換したもの等があげられる。

40

【0021】

ステロールとしては、例えばコレステロール、ジヒドロコレステロール、ラノステロール、 β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、エルゴカステロール、フコステロール、3 β -[N-(N', N'-ジメチルアミノエチル)カルバモイル]コレステロール(DC-Chol)等があげられる。

50

【 0 0 2 2 】

カチオン性脂質等としては、例えば、N - [1 - (2 , 3 - ジオレオイルプロピル)] - N , N , N - トリメチル塩化アンモニウム (DOTAP)、N - [1 - (2 , 3 - ジオレオイルプロピル)] - N , N - ジメチルアミン (DODAP)、N - [1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシプロピル)] - N , N , N - トリメチル塩化アンモニウム (DOTMA)、2 , 3 - ジオレイルオキシ - N - [2 - (スペルミンカルボキシアミド) エチル] - N , N - ジメチル - 1 - プロパナミニウムトリフルオロ酢酸 (DOSPA)、N - [1 - (2 , 3 - ジテトラデシルオキシプロピル)] - N , N - ジメチル - N - ヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DMRIE)、N - [1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシプロピル)] - N , N - ジメチル - N - ヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DORIE) 等があげられる。

10

【 0 0 2 3 】

非イオン性界面活性剤としては、例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (具体的にはポリソルベート 80 等)、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール (具体的にはプルロニック F 68 等)、ソルビタン脂肪酸 (具体的にはソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレート等)、ポリオキシエチレン誘導體 (具体的にはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、ポリオキシエチレンラウリルアルコール等)、グリセリン脂肪酸エステル等があげられる。

【 0 0 2 4 】

アニオン性界面活性剤としては、例えばアシルサルコシン、アルキル硫酸ナトリウム、アルキルベンゼンスルホン酸塩、炭素数 7 ~ 22 の脂肪酸ナトリウム等があげられる。具体的にはドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム等があげられる。

20

【 0 0 2 5 】

カチオン性界面活性剤としては、例えばアルキルアミン塩、アシルアミン塩、第四級アンモニウム塩、アミン誘導體等があげられる。具体的には塩化ベンザルコニウム、アシルアミノエチルジエチルアミン塩、N - アルキルポリアルキルポリアミン塩、脂肪酸ポリエチレンポリアミド、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムプロミド、アルキルポリオキシエチレンアミン、N - アルキルアミノプロピルアミン、脂肪酸トリエタノールアミンエステル等があげられる。

30

【 0 0 2 6 】

両性界面活性剤としては、例えば 3 - [(3 - コールアミドプロピル) ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホン酸、N - テトラデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホン酸等があげられる。

【 0 0 2 7 】

リポソームにおいては、これら脂質および界面活性剤は、単独でまたは組み合わせて用いられ、好ましくは組み合わせて用いられる。組み合わせて用いる場合の組み合わせとしては、例えば水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール化リン脂質およびコレステロールから選ばれる 2 成分以上の組み合わせ、ジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール化リン脂質およびコレステロールから選ばれる 2 成分以上の組み合わせ、EPC と DOTAP の組み合わせ、EPC、DOTAP およびポリエチレングリコール化リン脂質の組み合わせ、EPC、DOTAP、コレステロールおよびポリエチレングリコール化リン脂質の組み合わせ等があげられる。

40

【 0 0 2 8 】

また、リポソームは、必要に応じて、例えばコレステロール等のステロール等の膜安定化剤、例えばトコフェロール等の抗酸化剤等を含もよい。

【 0 0 2 9 】

脂質集合体としては、例えば球状ミセル、球状逆ミセル、ソーセージ状ミセル、ソーセージ状逆ミセル、板状ミセル、板状逆ミセル、ヘキサゴナル I、ヘキサゴナル II および脂質 2 分子以上からなる会合体等があげられる。

50

【0030】

エマルジョン粒子としては、例えば脂肪乳剤、非イオン性界面活性剤と大豆油からなるエマルジョン、リピッドエマルジョン、リピッドナノスフェア等の水中油型(O/W)エマルジョンや水中油中水型(W/O/W)エマルジョン粒子等があげられる。

【0031】

高分子としては、例えばアルブミン、デキストラン、キトサン、デキストラン硫酸、DNA等の天然高分子、例えばポリ-L-リジン、ポリエチレンイミン、ポリアスパラギン酸、スチレンマレイン酸共重合体、イソプロピルアクリルアミド-アクリルピロリドン共重合体、ポリエチレングリコール修飾デンドリマー、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸、ポリエチレングリコール化ポリ乳酸等の合成高分子、またはそれらの塩等があげられる。

10

【0032】

ここで、高分子における塩は、例えば金属塩、アンモニウム塩、酸付加塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等を包含する。金属塩としては、例えばリチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等があげられ、アンモニウム塩としては、例えばアンモニウム、テトラメチルアンモニウム等の塩があげられ、酸付加塩としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、および酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩等の有機酸塩があげられ、有機アミン付加塩としては、例えばモルホリン、ピペリジン等の付加塩があげられ、アミノ酸付加塩としては、例えばグリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン等の付加塩があげられる。

20

【0033】

金属コロイドとしては、例えば金、銀、白金、銅、ロジウム、シリカ、カルシウム、アルミニウム、鉄、インジウム、カドミウム、バリウム、鉛等を含む金属コロイドがあげられる。

【0034】

微粒子製剤としては、例えばマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノクリスタル、リピッドナノパーティクル、高分子ミセル等があげられる。

【0035】

また、本発明におけるコア微粒子は、例えば糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤等を含有することが好ましい。糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤は、コア微粒子の構成成分として含有させてもよく、コア微粒子の構成成分に加えて用いても構わない。

30

【0036】

糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤としては、好ましくは、糖脂質、または水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体等があげられ、より好ましくは、水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体等があげられる。糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤は、分子の一部がコア微粒子の他の構成成分と例えば疎水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもち、他の部分がコア微粒子の製造時の溶媒と例えば親水性親和力、静電的相互作用等で結合する性質をもつ、2面性をもつ物質であるのが好ましい。

40

【0037】

糖、ペプチドまたは核酸の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体としては、例えばショ糖、ソルビトール、乳糖等の糖、例えばカゼイン由来ペプチド、卵白由来ペプチド、大豆由来ペプチド、グルタチオン等のペプチド、または例えばDNA、RNA、プラスミド、siRNA、ODN等の核酸と、例えば前記のコア微粒子の定義の中であげた脂質、例えばステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸等の脂肪酸とが結合してなるもの等があげられ、より具体的に糖の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えば前記の

50

コア微粒子の定義の中であげたグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質等の糖脂質等があげられる。

【 0 0 3 8 】

水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンジイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール等またはそれらの誘導体と、例えば前記のコア微粒子の定義の中であげた脂質、または例えばステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸等の脂肪酸とが結合してなるもの等があげられ、より好ましくは、ポリエチレングリコール誘導体、ポリグリセリン誘導体等の脂質誘導体または脂肪酸誘導体があげられ、さらに好ましくは、ポリエチレングリコール誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体があげられる。

10

【 0 0 3 9 】

ポリエチレングリコール誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリエチレングリコール化脂質（具体的にはポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン（より具体的には1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG-DSPPE)等)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、クレモフォアイーエル(CREMOPHOR EL)等)、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル（具体的にはモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン等）、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル等があげられ、より好ましくは、ポリエチレングリコール化脂質があげられる。

20

【 0 0 4 0 】

ポリグリセリン誘導体の脂質誘導体または脂肪酸誘導体としては、例えばポリグリセリン化脂質（具体的にはポリグリセリン-ホスファチジルエタノールアミン等）、ポリグリセリン脂肪酸エステル等があげられ、より好ましくは、ポリグリセリン化脂質があげられる。

【 0 0 4 1 】

界面活性剤としては、例えば前記のコア微粒子の定義の中であげた界面活性剤、ポリエチレングリコールアルキルエーテル等があげられ、好ましくは、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、グリセリン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコールアルキルエーテル等があげられる。

30

【 0 0 4 2 】

コア微粒子が、薬物と、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドおよび微粒子製剤から選ばれる1つ以上との複合体を構成成分とする微粒子である場合、該脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤は、薬物と静電的に逆の電荷をもつものであるのがより好ましい。ここで、薬物と静電的に逆の電荷とは、薬物分子内の電荷、分子内分極等に対して静電的引力を生じる電荷、表面分極等を包含する。脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤が、薬物と静電的に逆の電荷をもつには、好ましくは、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤は、薬物と静電的に逆の電荷をもつ荷電物質を含有し、より好ましくは、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤は、薬物と静電的に逆の電荷をもつ脂質（前記のカチオン性脂質または後記のアニオン性脂質）を含有する。

40

【 0 0 4 3 】

薬物と静電的に逆の電荷をもつ脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤に含有される荷電物質は、カチオン性を呈するカチオン性物質とアニオン性を呈するアニオン性物質とに分類されるが、カチオン性の基とアニオン性の基の両方をもつ両性の物質であっても、pHや、他の物質との結合等により相対的な陰性度が変化するので、その時々に応じてカチオン性物質またはアニオン性物質に分類さ

50

れ得る。これら荷電物質は、コア微粒子の構成成分として含有させてもよく、コア微粒子の構成成分に加えて用いても構わない。

【0044】

カチオン性物質としては、例えば前記のコア微粒子の定義で例示したもののうちのカチオン性物質〔具体的には、カチオン性脂質（前記と同義）、カチオン性ステロール、カチオン性界面活性剤（前記と同義）、カチオン性高分子等〕、等電点以下の値のpHで、複合体の形成を行える蛋白質またはペプチド等があげられる。

【0045】

カチオン性ステロールとしては、例えばDC-Chol等があげられる。

【0046】

カチオン性高分子としては、例えばポリ-L-リジン、ポリエチレンジイミン、ポリフェクト(polyfect)、キトサン等があげられる。

【0047】

等電点以下の値のpHで、複合体の形成を行える蛋白質またはペプチドとしては、その物質の等電点以下の値のpHで、複合体の形成を行える蛋白質またはペプチドであれば、特に限定されない。例えば、アルブミン、オロソムコイド、グロブリン、フィブリノーゲン、ペプシン、リボヌクレアーゼT1等があげられる。

【0048】

アニオン性物質としては、例えば前記のコア微粒子の定義で例示したもののうちのアニオン性物質〔具体的には、アニオン性脂質、アニオン性界面活性剤（前記と同義）、アニオン性高分子等〕、等電点以上の値のpHで、複合体の形成を行える蛋白質またはペプチド、核酸等があげられる。

【0049】

アニオン性脂質としては、例えばホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸等があげられる。

【0050】

アニオン性高分子としては、例えばポリアスパラギン酸、スチレンマレイン酸共重合体、イソプロピルアクリルアミド-アクリルピロリドン共重合体、ポリエチレングリコール修飾 dendrimer、ポリ乳酸、ポリ乳酸ポリグリコール酸、ポリエチレングリコール化ポリ乳酸、デキストラン硫酸、デキストラン硫酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸、コンドロイチン、デルタマン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケタラン硫酸、デキストランフルオレセインアニオニック等があげられる。

【0051】

等電点以上の値のpHで、複合体の形成を行える蛋白質またはペプチドとしては、その物質の等電点以上の値のpHで、複合体の形成を行える蛋白質またはペプチドであれば、特に限定されない。例えば、アルブミン、オロソムコイド、グロブリン、フィブリノーゲン、ヒストン、プロタミン、リボヌクレアーゼ、リゾチーム等があげられる。

【0052】

アニオン性物質としての核酸としては、例えばDNA、RNA、プラスミド、siRNA、ODN等があげられ、生理活性を示さないものであれば、どのような長さ、配列のものであってもよい。

【0053】

コア微粒子が、薬物と、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドおよび微粒子製剤から選ばれる1つ以上との複合体を構成成分とする微粒子であり、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤が、薬物と静電的に逆の電荷をもつものである場合、コア微粒子は、付着競合剤を含むことがさらに好ましい。

【0054】

付着競合剤としては、例えば薬物と静電的に同じ電荷をもつ物質等があげられ、分子内

10

20

30

40

50

の電荷、分子内分極等によるカチオンまたはアニオンへの静電的引力により、コア微粒子の構成成分の脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤に静電的に付着する物質を包含し、例えば脂質、界面活性剤、核酸、蛋白質、ペプチド、高分子等があげられる。脂質、界面活性剤、核酸、蛋白質、ペプチドおよび高分子としては、例えば前記の荷電物質の定義の中であげたカチオン性脂質、アニオン性脂質、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、核酸、蛋白質、ペプチド、カチオン性高分子、アニオン性高分子等があげられ、好ましくは前記の荷電物質の定義の中であげたカチオン性高分子、アニオン性高分子等があげられ、より好ましくはデキストラン硫酸、デキストラン硫酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸、コンドロイチン、デルタマン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケタラン硫酸、デキストランフルオレセインアニオニック、ポリ-L-リジン、ポリエチレンイミン、ポリフェクト (polyfect)、キトサン等から選ばれる1つ以上の物質があげられる。付着競合剤は、コア微粒子の構成成分の脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤に静電的に付着することが好ましく、コア微粒子の構成成分の脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤に付着してもコア微粒子の構成成分の脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤を凝集させるような架橋を形成しない大きさの物質であるか、分子内に該脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤と付着する部分と、付着に反発して該脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイドまたは微粒子製剤の凝集を抑制する部分をもつ物質であることが好ましい。

【0055】

本発明におけるコア微粒子は、公知の製造方法またはそれに準じて製造することができ、いかなる製造方法で製造されたものであってよい。例えば、コア微粒子の1つであるリポソームを構成成分とするコア微粒子の製造には、公知のリポソームの調製方法が適用できる。公知のリポソームの調製方法としては、例えばバンガム (Bangham) らのリポソーム調製法 [“ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J . M o l . B i o l .) ” , 1965年, 第13巻, p . 238 - 252 参照]、エタノール注入法 [“ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J . C e l l B i o l .) ” , 1975年, 第66巻, p . 621 - 634 参照]、フレンチプレス法 [“エフイービーエス・レターズ (F E B S L e t t .) ” , 1979年, 第99巻, p . 210 - 214 参照]、凍結融解法 [“アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s .) ” , 1981年, 第212巻, p . 186 - 194 参照]、逆相蒸発法 [“プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A) ” , 1978年, 第75巻, p . 4194 - 4198 参照]、pH 勾配法 (例えば特許第2572554号公報、特許第2659136号公報等参照) 等があげられる。リポソームの製造の際にリポソームを分散させる溶液としては、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液、アミノ酸輸液等を用いることができる。また、リポソームの製造の際には、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システイン、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) 等の抗酸化剤、例えばグリセリン、ブドウ糖、塩化ナトリウム等の等張化剤等の添加も可能である。また、脂質等を例えばエタノール等の有機溶媒に溶解し、溶媒留去した後、生理食塩水等を添加、振とう攪拌し、リポソームを形成させることによってリポソームを製造することができる。

【0056】

また、例えば非イオン性界面活性剤 (前記と同義)、カチオン性界面活性剤 (前記と同義)、アニオン性界面活性剤 (前記と同義)、高分子、ポリオキシエチレン誘導体等によるリポソーム表面改質も任意に行うことができ、これらの表面改質リポソームも本発明におけるコア微粒子の構成成分として用いられる [ラジック (D . D . L a s i c)、マーティン (F . M a r t i n) 編, “ステルス・リポソームズ (S t e a l t h L i p o

10

20

30

40

50

somes) ” (米国), シーアールシー・プレス・インク (CRC Press Inc), 1995年, p. 93 - 102 参照]。高分子としては、例えばデキストラン、プルラン、マンナン、アミロペクチン、ヒドロキシエチルデンプン等があげられる。ポリオキシエチレン誘導体としては、例えばポリソルベート80、プルロニックF68、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリオキシエチレンラウリルアルコール、PEG-DSPE等があげられる。リポソーム表面改質は、コア微粒子に糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤を含有させる方法の1つとしても用いることができる。

【0057】

リポソームの平均粒子径は、所望により自由に選択できる。平均粒子径を調節する方法としては、例えばエクストルージョン法、大きな多重膜リポソーム (MLV) を機械的に粉碎 (具体的にはマントンゴウリン、マイクロフルイダイザー等を使用) する方法 [ミュラー (R. H. Muller)、ベニタ (S. Benita)、ボーム (B. Bohm) 編著, “エマルジョン・アンド・ナノサスペンションズ・フォー・ザ・フォーミュレーション・オブ・ポアリー・ソラブル・ドラッグズ (Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs)”, ドイツ, サイエントフィック・パブリッシャーズ・シュットガルト (Scientific Publishers Stuttgart), 1998年, p. 267 - 294 参照] 等があげられる。

【0058】

また、コア微粒子を構成する例えば薬物、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等から選ばれる2つ以上を組み合わせた複合体 (具体的には、例えばカチオン性脂質を含有するリポソームまたは脂質集合体と核酸との複合体、ポリ-L-リジン等のカチオン性高分子を含有する高分子と核酸との複合体、ホスファチジン酸等のアニオン性脂質を含有するリポソームまたは脂質集合体と蛋白質との複合体、スチレンマレイン酸等のアニオン性高分子を含有する高分子と蛋白質との複合体、カチオン性脂質を含有するリポソームまたは脂質集合体と蛋白質との複合体、ポリ-L-リジン等のカチオン性高分子を含有する高分子と蛋白質との複合体等があげられる) の製造方法は例えば水中で薬物と脂質集合体、リポソーム、高分子等とを混合するだけの製造方法でもよく、この際、必要であればさらに整粒工程や無菌化工程等を加えることもできる。また、複合体形成を例えばアセトン、エーテル等種々の溶媒中で行うことも可能である。例えば、核酸と脂質とをエタノール等の有機溶媒に溶解し、溶媒留去した後、生理食塩水等を添加、振とう攪拌し、核酸複合体を形成させることもできる。

【0059】

本発明におけるコア微粒子の大きさは平均粒子径が数nm~数百 μ mであるのが好ましく、10nm~5 μ mであるのがより好ましく、30nm~300nmであるのがさらに好ましく、50nm~200nmであるのが最も好ましい。

【0060】

本発明における被覆層成分は、本発明で使用される極性有機溶媒の濃度を調整することにより該有機溶媒を含有する液中に分散可能な被覆層成分であり、該被覆層成分としては、例えば前記のコア微粒子の定義の中であげた脂質、界面活性剤、高分子等があげられ、好ましくは、前記のコア微粒子の定義の中であげた脂質および界面活性剤から選ばれる1つ以上の物質があげられ、より好ましくは、被覆層が脂質膜となる脂質および界面活性剤から選ばれる1つ以上の物質があげられ、さらに好ましくは、脂質、界面活性剤のうちの中性脂質があげられる。ここで、中性脂質とは、前記のコア微粒子の定義の中であげた脂質および界面活性剤のうち、前記のカチオン性脂質、カチオン性界面活性剤、アニオン性脂質およびアニオン性界面活性剤を除いたものことであり、中性脂質としてより好ましくは、リン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質等があげられ、さらに好ましくはリン脂質があげられ、最も好ましくはEPCがあげられる。

【0061】

本発明におけるコア微粒子と被覆層成分の組み合わせは、特に限定されないが、コア微粒子が薬物とリポソームの複合体を構成成分とする微粒子であって、被覆層成分が脂質および/または界面活性剤である組み合わせが好ましい。コア微粒子がリポソームを構成成分とする微粒子であって、被覆層成分が脂質および/または界面活性剤であって、被覆層が脂質膜である被覆微粒子は、その構成から狭義のリポソームと分類され、微粒子がリポソームを構成成分とする微粒子以外で、被覆層成分が脂質および/または界面活性剤であって、被覆層が脂質膜である被覆微粒子は、広義のリポソームと分類される。本発明において、コア微粒子の構成成分も被覆微粒子もリポソームであることがより好ましい。

【0062】

また、該被覆層成分は、分子内に本発明で使用される極性有機溶媒と親和性のある疎水性部分を有し、その疎水性部分により該極性有機溶媒に対して可溶であることが好ましく、分子内に親水性部分も有することがさらに好ましい。また、工程Aにおいて、好ましくは0.1~1000nm、より好ましくは0.3~500nmの大きさをもつ凝集体またはミセルの形態となる被覆層成分が好ましい。該凝集体またはミセル形態の大きさは、所望の大きさの孔を有するメンブランフィルターに通過可能であるかどうかによって測定が可能である。

10

【0063】

本発明において、被覆層成分が極性有機溶媒に対して可溶とは、被覆層成分が極性有機溶媒に溶解する性質をもつ場合、可溶化剤等を用いることにより被覆層成分が極性有機溶媒に溶解する性質をもつ場合、被覆層成分が極性有機溶媒中で凝集体またはミセル等を形成して乳濁もしくはエマルジョン化し得る性質をもつ場合等を包含し、被覆層成分が極性有機溶媒に溶解する性質をもつ場合であることが好ましい。

20

【0064】

また、被覆層が脂質膜である場合に用いられる脂質として、例えば合成脂質等もあげられる。合成脂質としては、例えばフッ素添加ホスファチジルコリン、フッ素添加界面活性剤、臭化ジアルキルアンモニウム等があげられ、これらは単独でまたは他の脂質等と組み合わせ用いられてもよい。また、被覆層が脂質膜である場合には、被覆層成分は、好ましくは水溶性物質の脂質誘導体、脂肪酸誘導体もしくは脂肪族炭化水素誘導体、あるいは前記の糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤を含み、前記の水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体を含有することがより好ましく、前記のポリエチレングリコール化リン脂質を含有することがさらに好ましく、ポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミンを含有することが最も好ましい。

30

【0065】

本発明における水溶性物質の脂質誘導体、脂肪酸誘導体または脂肪族炭化水素誘導体としては、例えば前記の糖、蛋白質およびペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体、または糖、蛋白質およびペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂肪族炭化水素誘導体があげられ、好ましくは、糖脂質、または水溶性高分子の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体があげられ、より好ましくは、水溶性高分子の脂質誘導体または脂肪酸誘導体があげられる。

40

【0066】

水溶性物質の脂肪族炭化水素誘導体としては、水溶性物質と、例えば長鎖脂肪族アルコール、ポリオキシプロピレンアルキル、グリセリン脂肪酸エステルアルコール性残基等とが結合してなるものがあげられる。

【0067】

糖、ペプチドまたは核酸の脂肪族炭化水素誘導体としては、例えばショ糖、ソルビトール、乳糖等の糖、例えばカゼイン由来ペプチド、卵白由来ペプチド、大豆由来ペプチド、グルタチオン等のペプチド、または例えばDNA、RNA、プラスミド、siRNA、ODN等の核酸の脂肪族炭化水素誘導体があげられる。

【0068】

50

水溶性高分子の脂肪族炭化水素誘導体としては、例えばポリエチレングリコール、ポリグリセリン、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、オリゴ糖、デキストリン、水溶性セルロース、デキストラン、コンドロイチン硫酸、ポリグリセリン、キトサン、ポリビニルピロリドン、ポリアスパラギン酸アミド、ポリ-L-リジン、マンナン、プルラン、オリゴグリセロール等またはそれらの誘導体の脂肪族炭化水素誘導体があげられ、より好ましくは、ポリエチレングリコール誘導体、ポリグリセリン誘導体等の脂肪族炭化水素誘導体があげられ、さらに好ましくは、ポリエチレングリコール誘導体の脂肪族炭化水素誘導体があげられる。

【0069】

本発明における被覆微粒子は、被覆層成分が可溶性極性有機溶媒を含む液中に、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能な濃度で該極性有機溶媒を含ませ、該液中に該コア微粒子および該被覆層成分を分散させる工程（工程A）および該コア微粒子を該被覆層成分で被覆する工程（工程B）を含むことを特徴とする製造方法、例えばコア微粒子が分散し、被覆層成分が溶解した極性有機溶媒を含有する液を、被覆層成分が析出して分散するまで極性有機溶媒濃度を減少させて、コア微粒子と被覆層成分を、極性有機溶媒を含有する液中に分散させる工程、得られたコア微粒子および被覆層成分の分散液を、コア微粒子が被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程を含む製造方法等で製造され、被覆微粒子は分散液の状態を得られる。本発明の製造方法は、工程Aで得られるコア微粒子および被覆層成分の分散液に、被覆層成分が可溶性極性有機溶媒が含まれ、該工程で得られる液中の極性有機溶媒の濃度が、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分の少なくとも一部が溶解しないで分散状態で存在することが可能な濃度であることでコア微粒子を該被覆層成分で被覆することを特徴とし、工程Bは工程Aに引き続いて行われるかまたは工程Bは工程Aに包含する。コア微粒子が分散するとは、コア微粒子が懸濁、乳濁またはエマルジョン化、好ましくは懸濁している状態のことであり、コア微粒子の大部分が分散して、残りの部分が溶解している状態または一部が沈殿している状態も包含するが、コア微粒子のできるだけ全部が分散していることが好ましい。また、被覆層成分が分散するとは、被覆層成分が凝集体またはミセル等を形成して懸濁、乳濁もしくはエマルジョン化、好ましくは乳濁もしくはエマルジョン化している状態のことであり、被覆層成分の大部分が凝集体またはミセル等を形成して乳濁もしくはエマルジョン化し、残りの部分が溶解している状態、被覆層成分の大部分が凝集体またはミセル等を形成して懸濁、乳濁もしくはエマルジョン化、好ましくは乳濁もしくはエマルジョン化し、残りの部分が沈殿している状態等を包含する。極性有機溶媒を、使用する被覆層成分が可溶性極性有機溶媒とし、工程Aにより得られる分散液中の該極性有機溶媒の濃度が、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能な濃度となるならば、分散液の調製方法はいかなる形態をも取ることができる。例えば、コア微粒子が分散し、被覆層成分が溶解した極性有機溶媒を含有する液を、被覆層成分が析出して分散するまで極性有機溶媒濃度を減少させて、コア微粒子と被覆層成分を、極性有機溶媒を含有する液中に分散させる場合には、被覆層成分を極性有機溶媒を含む液に溶解し、一方、コア微粒子を、極性有機溶媒を含まないまたはコア微粒子が溶解しない濃度で極性有機溶媒を含む液に分散させ、両液を混合して、コア微粒子が分散し被覆層成分が溶解した極性有機溶媒を含有する液を調製し、該液を被覆層成分が析出して分散するまで極性有機溶媒濃度を減少させて、コア微粒子と被覆層成分を、極性有機溶媒を含有する液中に分散させる調製方法等があげられる。

【0070】

また、工程Bは、工程Aで得られる液を、該コア微粒子が該被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程であることが好ましく、静置または混合する時間は、コア微粒子および被覆層成分を、極性有機溶媒を含有する液中に分散させた後に瞬時に終了させるのでなければ制限はないが、被覆層成分や、極性有機溶媒を含有する液の種類に応じて任意に設定することができ、得られた被覆微粒子の収率が定常量となる時間を設定することが好ましく、例えば3秒～30分である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 1 】

また、工程 A は、被覆層成分が溶解した極性有機溶媒を含む液（液 A）を調製する工程、液 A と混合可能であり、かつコア微粒子が分散し、極性有機溶媒を含まないまたは液 A より低い割合で極性有機溶媒を含む液（液 B）を調製する工程、および液 A と液 B を混合して液 C を調整する工程であってもよい。液 A および液 B は、混合後の液 C 中の極性有機溶媒の濃度が、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能な濃度であれば、その供給方法はいかなる形態をも取ることができ、コア微粒子が被覆層成分で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程を含むことが好ましく、静置または混合する時間は、前記と同様である。

【 0 0 7 2 】

また、工程 A は、被覆層成分が分散した液（液 D）を調製する工程、液 D と混合可能であり、かつコア微粒子が分散した液（液 E）を調製する工程、および液 D と液 E を混合して液 F を調整する工程を含む工程であってもよい。液 D および液 E は、液 D および液 E のすくなくとも一方が、極性有機溶媒を含有する液であり、極性有機溶媒が、被覆層成分が可溶性極性有機溶媒であり、液 F 中の極性有機溶媒の濃度が、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能な濃度であれば、その供給方法はいかなる形態をも取ることができ、コア微粒子が被覆層で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程を含むことが好ましく、静置または混合する時間は、前記と同様である。

【 0 0 7 3 】

また、工程 A は、被覆層成分が分散した極性有機溶媒を含む液（液 G）を調製する工程および液 G にコア微粒子を分散させる工程を含む工程であってもよい。液 G が、極性有機溶媒を含有する液であり、極性有機溶媒が、被覆層成分が可溶性極性有機溶媒であり、液 G 中の極性有機溶媒の濃度が、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能な濃度であれば、その供給方法はいかなる形態をも取ることができ、コア微粒子が被覆層で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程を含むことが好ましく、静置または混合する時間は、前記と同様である。

【 0 0 7 4 】

また、工程 A は、被覆層成分およびコア微粒子が分散した液（液 H）を調製する工程、液 H と混合可能であり、かつ極性有機溶媒を含有する液を、液 H と混合して液 I を調製する工程を含む工程であってもよい。液 H は、コア微粒子および被覆層成分のそれぞれを極性有機溶媒以外の溶媒中に分散させ、両分散液を混合したものでよく、コア微粒子または被覆層成分のどちらか一方を極性有機溶媒以外の溶媒中に分散させ、その分散液に、固体状態のコア微粒子または被覆層成分の残る一方を加えて分散させたものであってもよい。また、極性有機溶媒は、被覆層成分が可溶性極性有機溶媒であり、液 I 中の極性有機溶媒の濃度が、コア微粒子が溶解せず、被覆層成分が分散状態で存在することが可能な濃度であれば、その供給方法は、いかなる形態をも取ることができ、コア微粒子が被覆層で被覆されるに十分な時間、静置または混合する工程を含むことが好ましく、静置または混合する時間は、前記と同様である。

【 0 0 7 5 】

本発明で用いられる極性有機溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、n - プロパノール、2 - プロパノール、n - ブタノール、2 - ブタノール、tert - ブタノール等のアルコール、グリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルまたはエーテル等のポリアルキレングリコール等があげられ、好ましくはエタノールがあげられる。極性有機溶媒以外の溶媒としては、例えば、水、液体二酸化炭素、液体炭化水素、ハロゲン化炭素、ハロゲン化炭化水素等があげられ、好ましくは水があげられる。また、工程 A で得られる液は緩衝成分等を含んでいてもよい。

【 0 0 7 6 】

極性有機溶媒と極性有機溶媒以外の溶媒の組み合わせは、相互に混合可能である組み合わせであるのが好ましく、各工程における極性有機溶媒を含む液中の溶媒に対する、前記

10

20

30

40

50

のコア微粒子の溶解度、前記の被覆層成分の溶解度等を考慮して選択できる。一方、コア微粒子については、各工程における極性有機溶媒を含む液中の溶媒のいずれに対しての溶解度も低いことが好ましく、また用いられる極性有機溶媒および用いられる極性有機溶媒以外の溶媒のいずれに対しての溶解度も低いことが好ましく、被覆層成分については、用いられる極性有機溶媒に対しての溶解度が高いことが好ましく、用いられる極性有機溶媒以外の溶媒に対しての溶解度が低いことが好ましい。

【0077】

また、コア微粒子が用いられる極性有機溶媒に溶解する場合、その溶解度は被覆層成分の溶解度より低いことが好ましい。ここで、コア微粒子の溶解度が低いとは、コア微粒子の各構成成分の、溶媒中における溶出性が小さいことであり、各構成成分の個々の溶解度が高くても各構成成分間の結合等によって各構成成分の溶出性が小さくなっていればよい。

10

【0078】

工程Aで得られる液の極性有機溶媒の割合は、本発明におけるコア微粒子と、被覆層成分がともに分散されている条件さえ満たしていれば特に限定されるものではなく、用いる溶媒やコア微粒子、被覆層成分の種類等により異なるが、工程Aで得られる液中の極性有機溶媒の濃度は、好ましくは1～80vol%、より好ましくは10～60vol%、さらに好ましくは20～50vol%、最も好ましくは30～40vol%である。

【0079】

また、工程Aで得られる液において、分散液の溶媒中で、被覆層成分と、コア微粒子表面との間で、親水性相互作用の引力が働くことが好ましく、従って、コア微粒子表面と被覆層成分は親水性部分を有することが好ましい。

20

【0080】

各工程における混合または分散方法としては、特に限定されるものではなく、例えばインラインミキサー、スタティック式ミキサー、プロペラ型ミキサー、ローター/ステーター式ミキサー、ダービン式ミキサー、のこぎり歯ブレード、コロイドミル、高圧ホモジナイザー等による混合または分散があげられ、好ましくはインラインミキサー、スタティック式ミキサー、プロペラ型ミキサー、ローター/ステーター式ミキサーまたはダービン式ミキサーによる混合または分散があげられる。

【0081】

例えば被覆層が脂質膜である本発明における被覆微粒子の好ましい製造方法としては、以下の方法があげられる。

30

【0082】

(工程1) 極性有機溶媒含有水溶液または極性有機溶媒に脂質膜となる脂質および/または界面活性剤(脂質膜を構成する成分)を溶解または分散する。このとき、さらに糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤(例えば、ポリエチレングリコール修飾脂質誘導体等)を添加してもよく、ここで添加する糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤の量は特に限定されるものではない。

40

(工程2) コア微粒子を水溶液に分散(懸濁)させる。

(工程3) 工程1で得られた液と工程2で得られた液を混合する。

【0083】

用いるコア微粒子の種類や、用いる被覆層成分の種類によらず基本的には前記と同様な方法で本発明における被覆微粒子を製造することができる。

【0084】

本発明の被覆微粒子の製造方法において、工程Aで得られる液中のコア微粒子の濃度は、コア微粒子を被覆層成分で被覆できれば特に限定されるものではないが、1 μ g/mL～1g/mLであるのが好ましく、0.1～500mg/mLであるのがより好ましい。また、工程Aで得られる液中の被覆層成分(例えば脂質等)の濃度は、コア微粒子を被覆

50

できれば特に限定されるものではないが、 $1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1 \text{g}/\text{mL}$ であるのが好ましく、 $0.1 \sim 400 \text{mg}/\text{mL}$ であるのがより好ましい。本発明の被覆微粒子の製造方法によって得られる被覆微粒子において、コア微粒子に対する被覆層成分の割合は、重量比で $1:0.1 \sim 1:1000$ であるのが好ましく、 $1:1 \sim 1:10$ であるのがより好ましい。

【0085】

また、本発明の被覆微粒子の製造方法によって得られる被覆微粒子の大きさは、平均粒子径が 300nm 以下であるのが好ましく、 200nm 以下であるのがより好ましく、 130nm 以下であるのがさらに好ましく、 115nm 以下であるのが最も好ましく、例えば注射可能な大きさであるのが好ましい。得られる被覆微粒子の大きさを大きくするには、被覆されるコア微粒子の大きさを大きくすればよく、逆に得られる被覆微粒子の大きさを小さくするには、被覆されるコア微粒子の大きさを小さくすればよい。

【0086】

さらに、上記で得られる被覆微粒子に抗体等の蛋白質、糖類、糖脂質、アミノ酸、核酸、種々の低分子化合物、高分子化合物等の物質による修飾を行うこともでき、これらで得られる被覆微粒子も本発明の被覆微粒子に包含される。また、例えば、ターゲティングに応用するため、上記で得られる被覆微粒子に対して、抗体等の蛋白質、ペプチド、脂肪酸類等による脂質膜表面修飾を行うこともでき[ラジック(D. D. Lasic)、マーティン(F. Martin)編, “ステルス・リポソームズ(Stealth Liposomes)” (米国), シーアールシー・プレス・インク(CRC Press Inc), 1995年, p. 93 - 102参照]、また、微粒子の構成成分であるリポソームのときと同様に例えば非イオン性界面活性剤(前記と同義)、カチオン性界面活性剤(前記と同義)、アニオン性界面活性剤(前記と同義)、高分子(前記と同義)、ポリオキシエチレン誘導体(前記と同義)等による表面改質も任意に行うことができ、これら脂質膜表面修飾または表面改質されたものも本発明の被覆微粒子に包含される。また、同様に例えば水溶性物質の脂質誘導体、脂肪酸誘導体または脂肪族炭化水素誘導体、あるいは糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤等による表面改質も任意に行うことができ、これら表面改質に用いられる水溶性物質の脂質誘導体、脂肪酸誘導体または脂肪族炭化水素誘導体、あるいは糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤は、前記の脂質膜の構成成分としての水溶性物質の脂質誘導体、脂肪酸誘導体または脂肪族炭化水素誘導体、あるいは前記のコア微粒子の定義の中のコア微粒子表面の一部または全部に親水性部分を有させるための糖、ペプチド、核酸および水溶性高分子から選ばれる1つ以上の物質の脂質誘導体もしくは脂肪酸誘導体または界面活性剤と同義であり、脂質膜の構成成分に包含される。

【0087】

本発明の製造方法を用いて製造できる被覆微粒子は、例えば血液成分等の生体成分(例えば血液、消化液等)中での薬剤の安定化、副作用の低減、腫瘍等の標的臓器への薬剤集積性の増大、経口や経粘膜での薬剤の吸収の改善等を目的とする製剤として使用できる。

【0088】

本発明の製造方法を用いて製造できる被覆微粒子は、コア微粒子の構成成分の少なくとも1つが例えば抗腫瘍薬、抗炎症薬等の薬物である場合、該薬物の腫瘍または炎症部位への薬物含有キャリアーとして、該被覆微粒子を投与することで、該薬物を腫瘍または炎症部位へ送達することができ、該薬物が抗腫瘍薬である場合、例えば、腫瘍の治療剤として該被覆微粒子を投与することで、腫瘍の治療を行うことができ、また該薬物が抗炎症薬である場合、例えば、炎症の治療剤として該被覆微粒子を投与することで、炎症の治療を行うことができる。また、血管新生が亢進する組織または臓器は、本発明の製造方法を用いて製造できる被覆微粒子が良好に送達できる部位の1つとしてあげられ、被修飾微粒子の構成成分の少なくとも1つが該組織または臓器における疾患の治療薬である場合、該微粒子を該疾患の治療薬として投与することで、該疾患の治療を行うことができる。

【0089】

本発明の被覆微粒子を製剤として使用する場合、上述の方法により調製した被覆微粒子の分散液をそのまま例えば注射剤等の形態として用いることも可能であるが、該分散液に含まれる極性有機溶媒と混合可能な極性有機溶媒以外の溶媒を含む溶媒を加えること、および/または、蒸発留去、半透膜分離、分留等によって、選択的に該極性有機溶媒を取り除くことで、極性有機溶媒の割合を減少させて用いることもできる。また、分散液または極性有機溶媒の割合を減少させた分散液から例えば濾過、遠心分離等によって溶媒を除去して使用することも、該分散液、または例えばマンニトール、ラクトース、トレハロース、マルトース、グリシン等の賦形剤を加えた該分散液を凍結乾燥して使用することもできる。

10

【0090】

注射剤の場合、前記の被覆微粒子の分散液もしくは極性有機溶媒の割合を減少させた分散液または前記の溶媒を除去または凍結乾燥した被覆微粒子に、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液、アミノ酸輸液等を混合して注射剤を調製することが好ましい。また、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システイン、EDTA等の抗酸化剤、グリセリン、ブドウ糖、塩化ナトリウム等の等張化剤等を添加して注射剤を調製することも可能である。また、例えばグリセリン等の凍結保存剤を加えて凍結保存することもできる。

【0091】

また、本発明の被覆微粒子は、適当な賦形剤等と共に造粒、乾燥する等して例えばカプセル剤、錠剤、顆粒剤等の経口用製剤に加工してもよい。

20

【0092】

本発明の製造方法には、キットを用いることも可能である。キットの構成としては、例えば、本発明の製造方法によって被覆微粒子を調製するための、少なくともコア微粒子、被覆層成分および極性有機溶媒を含有する液からなる構成等があげられる。例えば、少量の容器に、本発明の製造方法によって被覆微粒子を調製するための、コア微粒子、被覆層成分、極性有機溶媒を含有する液等をそれぞれ充填し、本発明の製造方法に従って混合することにより被覆微粒子を調製することができ、その混合において例えば徐々に混合しなければならない等の制約がないので、キットとしての簡便性が高いという利点もある。

【0093】

次に、実施例により、本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

30

【実施例1】

【0094】

被覆層成分の溶解液(液A)；EPC(日本油脂製、以下同様)60mgおよびPEG-DSP(日本油脂製、以下同様)12.5mgを、エタノール/水混液(8:5)2mLに溶かした(A1液)。

コア微粒子の分散液(液B)；デキストランフルオレセインアニオン(FD、モレキュラーブローブス社製、以下同様)10mg、DOTAP(アバンチポーラルリピッズ社製、以下同様)60mgおよびPEG-DSP 24mgを水2mLに分散させた。得られた分散液を、孔径0.1μmのポリカーボネートメンブレン(ワットマン製、以下同様)に31回通した(B1液)。

40

A1液に、B1液0.5mLを滴下し(エタノール濃度はおよそ50vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した)、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた分散液と水22.5mLを混合し、超遠心(1時間、110,000×g、25)によって上清を除去し、製剤を得た。

【実施例2】

【0095】

被覆層成分の分散液(液D)；EPC 60mgおよびPEG-DSP 12.5mgを、エタノール/水混液(1:1)1.6mLに分散させた(D2液)。

50

コア微粒子の分散液（液E）；FD 10mg、DOTAP 60mgおよびPEG-DSPE 24mgを、水1mLに分散させた。得られた分散液を、孔径0.1μmのポリカーボネートメンブレンに31回通し、コア分散液を得た。この液0.25mLに、エタノール0.25mLを加えエタノール濃度をおよそ50vol%とした。（E2液）。

D2液と、E2液を混合し（エタノール濃度はおよそ50vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水23mLを混合し、実施例1と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

【実施例3】

【0096】

被覆層成分およびコア微粒子の分散液（液H）；FD 10mg、DOTAP 60mgおよびPEG-DSPE 24mgを、水1mLに分散させた。得られた分散液を、孔径0.1μmのポリカーボネートメンブレンに31回通した。別に、EPC 120mgおよびPEG-DSPE 25mgを水2mLに分散させた。得られた分散液を、孔径0.4μmのポリカーボネートメンブレン（ワットマン製、以下同様）に11回、孔径0.1μmのポリカーボネートメンブレンに21回通した。得られたFD、DOTAPおよびPEG-DSPEの分散液と、得られたEPCおよびPEG-DSPEの分散液を混合した（H3液）。

H3液に、エタノール1.25mLを加え（エタノール濃度はおよそ50vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水22.5mLを混合し、実施例1と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

【0097】

比較例1

被覆層成分の溶解液（液A）；EPC 60mgおよびPEG-DSPE 12.5mgを、エタノール1mLに溶かした（a1液）。

コア微粒子の分散液（液B）；FD 30mg、DOTAP 180mgおよびPEG-DSPE 72mgを、水9mLに分散させた。得られた分散液を、孔径0.1μmのポリカーボネートメンブレンに31回通した（b1液）。

a1液0.25mLと、b1液0.75mLを混合（エタノール濃度はおよそ62.5vol%であり、この濃度で被覆層成分は溶解し、コア微粒子は分散した）とし、さらに攪拌しながら1mL/分の速度で蒸留水23mLを加え、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた分散液について、実施例1と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

【0098】

試験例1

実施例1～3および比較例1で得られた各製剤について、以下の方法に従って、平均粒子径、FDおよびEPCの回収率、ならびに牛胎児血清（FBS）中の安定性について検討を行った。結果を第1表に示す。

【0099】

平均粒子径

動的光散乱法（DLS）（使用機器：A model ELS-800、大塚電子、以下同様）で被覆微粒子のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中での平均粒子径を測定した。

【0100】

FDおよびEPCの回収率

各製剤をPBSで、総脂質濃度が30mg/mLになるように希釈した。さらにPBSで1000倍希釈し、希釈後の各50μLに、10w/v%トライトンエックス-100（Triton X-100、和光純薬製、以下同様）50μLおよびPBS 400μLをそれぞれ加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。また、各実施例および比較例での超遠心上清をPBSで10倍希釈し、希釈後の各50μLに、10w/v% Triton X-100 50μLおよびPBS 400μLをそれぞれ加え、ボルテックスミキサーで

10

20

30

40

50

攪拌した。それぞれ100 μLを96穴マイクロプレートにとり、蛍光プレートリーダー（アルボエスエックス-4（ARVOSx-4）、ワラック（Wallac）社製、以下同様）を使用して励起波長485 nmおよび蛍光波長530 nmでの蛍光強度を測定した。一方、1、0.5および0.25 μg/mLの各FD-PBSの蛍光強度を測定し、検量線を得た。検量線から各製剤中のFD濃度を求めた。一方、各製剤中のEPC濃度は、リン脂質C-テストワコー（和光純薬製、以下同様）を用いて測定することにより求めた。

各製剤におけるFD回収率およびEPC回収率は、下記式（1）および（2）で算出した。

【0101】

10

【数1】

$$\text{FDの回収率(\%)} = A_1 / (A_1 + B_1) \times 100 \quad (1)$$

A₁: 被覆微粒子中のFD含量(μg)

$$= \text{被覆微粒子画分中のFD濃度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{被覆微粒子の体積}(\text{mL})$$

B₁: 上清中のFD含量(μg)

$$= \text{上清中のFD濃度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{上清の体積}(\text{mL})$$

【0102】

20

【数2】

$$\text{EPCの回収率(\%)} = A_2 / (A_2 + B_2) \times 100 \quad (2)$$

A₂: 被覆微粒子中のEPC含量(μg)

$$= \text{被覆微粒子画分中のEPC濃度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{被覆微粒子の体積}(\text{mL})$$

B₂: 上清中のEPC含量(μg)

$$= \text{上清中のEPC濃度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{上清の体積}(\text{mL})$$

【0103】

FBS中の安定性

30

各製剤をPBSで、総脂質濃度が30 mg/mLになるように希釈した。希釈後の30 μLに、FBS 2970 μLを加え混合した。

混合直後および37℃で3時間静置後に各500 μLを取りゲルろ過クロマトグラフィー（Gel Permeation Chromatography（GPC））を行い、そのフラクション（100滴，10本）を回収した。各フラクションをボルテックスミキサーで振とう攪拌してサンプルとし、FDを定量するため、各50 μLに、10 w/v % Triton X-100 50 μLおよびPBS 400 μLをそれぞれ加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。その100 μLを96穴マイクロプレートにとり、ARVOSx-4を使用して励起波長485 nmおよび蛍光波長530 nmでの蛍光強度を測定し、0時間後および3時間後の微粒子中の薬物残存率を下記式（3）で算出した。

40

【0104】

【数3】

$$0 \text{ 時間後のFDの残存率}(\%) = A_3/B_3 \times 100$$

(3)

$$3 \text{ 時間後のFDの残存率}(\%) = C_3/D_3 \times 100$$

$$A_3 = \sum \left\{ \left(\text{各フラクション蛍光強度} \right)_{\text{被覆微粒子画分}(0\text{時間後})} \times \left(\text{各フラクション体積} \right)_{\text{被覆微粒子画分}(0\text{時間後})} \right\}$$

$$B_3 = \sum \left\{ \left(\text{各フラクション蛍光強度} \right)_{\text{全画分}(0\text{時間後})} \times \left(\text{各フラクション体積} \right)_{\text{全画分}(0\text{時間後})} \right\}$$

$$C_3 = \sum \left\{ \left(\text{各フラクション蛍光強度} \right)_{\text{被覆微粒子画分}(3\text{時間後})} \times \left(\text{各フラクション体積} \right)_{\text{被覆微粒子画分}(3\text{時間後})} \right\}$$

10

$$D_3 = \sum \left\{ \left(\text{各フラクション蛍光強度} \right)_{\text{全画分}(3\text{時間後})} \times \left(\text{各フラクション体積} \right)_{\text{全画分}(3\text{時間後})} \right\}$$

【0105】

【表1】

第1表

	平均粒子径 (nm)	回収率(%)		FBS中の残存率(%)	
		FD	EPC	0時間	3時間
実施例1	128	92	93	測定せず	測定せず
実施例2	150	85	84	61	58
実施例3	114	86	82	63	59
比較例1	145	96	88	68	67

20

【0106】

第1表によると、実施例1～3で得られた製剤は、比較例1で得られた製剤と比較し、同程度に小さな粒子径（ただし、実施例1および3で得られた製剤は、それぞれ130nm以下および115nm以下のより小さな粒子径であった）で、同程度に効率よくまた堅固に薬物が内封された被覆微粒子であった。本発明の被覆微粒子の製造方法は、従来法と比較し、例えば徐々に混合しなければならない等の制約がない簡便な製造方法であるにも関わらず、該方法により、従来法と同程度に優れた被覆微粒子が得られることが明らかとなった。

30

【実施例4】

【0107】

実施例1で得られた製剤にPBSを加えて、EPC濃度を24mg/mLに調整し、その0.5mLと、PEG-DSPE 2.5mgをエタノール0.02mLに溶解したものを混合した後、70℃で2分間加熱してPEGで表面修飾された製剤を得た。

【0108】

比較例2

比較例1で得られた製剤にPBSを加えて、EPC濃度を24mg/mLに調整し、その0.5mLと、PEG-DSPE 2.5mgをエタノール0.02mLに溶解したものを混合した後、70℃で2分間加熱してPEGで表面修飾された製剤を得た。

40

【0109】

試験例2

実施例4および比較例2で得られた各製剤について、以下の方法に従って、血中動態について検討を行った。それぞれの結果を第2表および第1図に示す。

【0110】

血中動態

各製剤を、PBSで総脂質濃度が5mg/mLになるように希釈し、ラットに対して、投与量を脂質量/ラット体重比で10mg/kgとして投与した。投与後1分、10分、

50

30分、1時間、3時間、6時間および24時間に採血し、遠心操作を行って血漿を取得した。血漿中のFDを定量するため、血漿各50 μ Lに、10w/v% Triton X-100 50 μ LおよびPBS 400 μ Lをそれぞれ加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。その100 μ Lを96穴マイクロプレートにとり、ARVOs x-4を使用して励起波長485nmおよび蛍光波長530nmでの蛍光強度を測定した。一方、1、0.5、0.25 μ g/mLの各FD-PBSの蛍光強度を測定し、検量線を得た。検量線から各血漿中のFD濃度を求めた。ラット体重100gあたりの血漿量を7.8mLと計算し、投与量に対する血中残存率(%)を算出するとともに、台形法でAUC_{0-24h}(μ g \cdot min/dose)を算出した。

【0111】

【表2】

第2表

	平均粒子径 (nm)	AUC (μ g \cdot min/dose)
実施例4	128	423
比較例2	145	342

【0112】

第2表によると、実施例4で得られた製剤は、比較例2で得られた製剤と比較し、生体内において同程度に優れた血中滞留性を示した。本発明の被覆微粒子の製造方法は、簡便な製造方法であるにも関わらず、該方法により、従来法と同程度に優れた被覆微粒子が得られることが明らかとなった。

【実施例5】

【0113】

被覆層成分の溶解液(液A); EPC 15mgおよびPEG-DSPE 3.125mgを、エタノール/水混液(8:5)1mLに溶かした(A5液)。

コア微粒子の分散液(液B); DOTAP 90mgおよびPEG-DSPE 36mgを水2mLに分散させた。得られた分散液を、孔径0.4 μ mのポリカーボネートメンブレンに11回、孔径0.1 μ mのポリカーボネートメンブレンに11回、孔径0.05 μ mのポリカーボネートメンブレン(ワットマン製、以下同様)に25回通した。得られた分散液0.167mLに、ODN(フルオレセインイソチオシアネートラベル化ホスフォロチオエート型オリゴデオキシリボヌクレオチド(配列:(5') CCT CTT ACC TCA G(3'))、塩基数13、分子量4573.57、サイメディア社製、以下同様)1.87mgを水0.083mLに溶解したものを加えた(B5液)。

A5液と、B5液を混合し(エタノール濃度はおよそ50vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した)、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水11.25mLを混合し、超遠心(1時間、110,000 \times g、25)によって上清を除去し、製剤を得た。

【実施例6】

【0114】

被覆層成分の溶解液(液A); 実施例5のA1液と同量のEPCおよびPEG-DSPEを、エタノール/水混液(8:5)0.9mLに溶かした(A6液)。

コア微粒子の分散液(液B); 実施例5のB5液に0.1mLの蒸留水を加えた(B6液)。

A6液と、B6液を混合し(エタノール濃度はおよそ45vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した)、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水10mLを混合し、実施例5と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

10

20

30

40

50

【実施例 7】

【0115】

被覆層成分の溶解液（液 A）；実施例 5 の A 5 液と同量の E P C および P E G - D S P E を、エタノール / 水混液（8 : 5）0.8 mL に溶かした（A 7 液）。

コア微粒子の分散液（液 B）；実施例 5 の B 5 液に 0.2 mL の水を加えた（B 7 液）。

A 7 液と、B 7 液を混合し（エタノール濃度はおよそ 40 vol % であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水 8.75 mL を混合し、実施例 5 と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

10

【実施例 8】

【0116】

被覆層成分の溶解液（液 A）；実施例 5 の A 5 液と同量の E P C および P E G - D S P E を、エタノール / 水混液（8 : 5）0.7 mL に溶かした（A 8 液）。

コア微粒子の分散液（液 B）；実施例 5 の B 5 液に 0.3 mL の蒸留水を加えた（B 8 液）。

A 8 液と、B 8 液を混合し（エタノール濃度はおよそ 35 vol % であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水 7.5 mL を混合し、実施例 5 と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

20

【実施例 9】

【0117】

被覆層成分の溶解液（液 A）；実施例 5 の A 5 液と同量の E P C および P E G - D S P E を、エタノール / 水混液（8 : 5）0.5 mL に溶かした（A 9 液）。

コア微粒子の分散液（液 B）；実施例 5 の B 5 液に 0.5 mL の蒸留水を加えた（B 9 液）。

A 9 液と、B 9 液を混合し（エタノール濃度はおよそ 25 vol % であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水 5 mL を混合し、実施例 5 と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

30

【0118】

比較例 3

被覆層成分の溶解液（液 A）；E P C 30 mg および P E G - D S P E 6.25 mg を、エタノール 1 mL に溶かした（a 3 液）。

コア微粒子の分散液（液 B）；D O T A P 60 mg および P E G - D S P E 24 mg を、水 2 mL に分散させた。得られた分散液を、孔径 0.4 μm のポリカーボネートメンブレンに 11 回、孔径 0.1 μm のポリカーボネートメンブレンに 11 回、孔径 0.05 μm のポリカーボネートメンブレンに 21 回通した。得られた分散液 0.5 mL に、O D N 3.75 mg を水 0.25 mL に溶解したものを加えた（b 3 液）。

a 3 液 0.25 mL と、b 3 液を混合し（エタノール濃度はおよそ 62.5 vol % であり、この濃度で被覆層成分は溶解し、コア微粒子は分散した）、さらに攪拌しながら 1 mL / min の速度で水 23 mL を加え、被覆微粒子の分散液を得た。

40

得られた被覆微粒子の分散液について、実施例 5 と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

【0119】

試験例 3

実施例 5 ~ 9 および比較例 3 で得られた各製剤について、以下の方法に従って、平均粒子径、O D N および E P C の回収率、ならびに F B S 中の安定性について検討を行った。結果を第 3 表に示す。

【0120】

50

平均粒子径

D L Sで被覆微粒子のP B S中での平均粒子径を測定した。

【 0 1 2 1 】

O D NおよびE P Cの回収率

各製剤をP B Sで、総脂質濃度が3 0 m g / m Lになるように希釈した。さらにP B Sで1 0 0 0倍希釈し、希釈後の各5 0 μ Lに、1 0 w / v % T r i t o n X - 1 0 0 5 0 μ LおよびP B S 4 0 0 μ Lをそれぞれ加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。また、各実施例および比較例での超遠心上清をP B Sで1 0倍希釈し、希釈後の各5 0 μ Lに、1 0 w / v % T r i t o n X - 1 0 0 5 0 μ LおよびP B S 4 0 0 μ Lをそれぞれ加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。それぞれ1 0 0 μ Lを9 6穴マイクロプレートにとり、A R V O s x - 4を使用して励起波長4 8 5 n mおよび蛍光波長5 3 0 n mでの蛍光強度を測定した。一方、1 . 5、1 . 5 / 4、1 . 5 / 4²、1 . 5 / 4³、1 . 5 / 4⁴および1 . 5 / 4⁵ μ g / m Lの各O D N - P B Sの蛍光強度を測定し、検量線を得た。検量線から各製剤中のO D N濃度を求めた。一方、各製剤中のE P C濃度は、リン脂質C - テストワコーを用いて測定することにより求めた。

10

各製剤におけるO D N回収率およびE P C回収率は、下記式(4)および(5)で算出した。

【 0 1 2 2 】

【 数 4 】

$$\text{ODNの回収率(\%)} = A_4 / (A_4 + B_4) \times 100 \quad (4)$$

20

A₄: 被覆微粒子中のODN含量(μ g)

= 被覆微粒子画分中のODN濃度(μ g/mL) × 被覆微粒子の体積(mL)

B₄: 上清中のODN含量(μ g)

= 上清中のODN濃度(μ g/mL) × 上清の体積(mL)

【 0 1 2 3 】

【 数 5 】

$$\text{EPCの回収率(\%)} = A_5 / (A_5 + B_5) \times 100 \quad (5)$$

30

A₅: 被覆微粒子中のEPC含量(μ g)

= 被覆微粒子画分中のEPC濃度(μ g/mL) × 被覆微粒子の体積(mL)

B₅: 上清中のEPC含量(μ g)

= 上清中のEPC濃度(μ g/mL) × 上清の体積(mL)

【 0 1 2 4 】

F B S中の安定性

各製剤をP B Sで、総脂質濃度が3 0 m g / m Lになるように希釈した。希釈後の3 0 μ Lに、5 0 m g / m Lのデキストラン硫酸ナトリウム6 0 μ LおよびF B S 2 9 1 0 μ Lを加え混合した。

40

混合直後および3 7 °Cで3時間静置後に各5 0 0 μ Lを取りG P Cを行い、そのフラクション(1 0 0滴, 1 0本)を回収した。各フラクションをボルテックスミキサーで振とう攪拌してサンプルとし、O D Nを定量するため、各5 0 μ Lに、1 0 w / v % T r i t o n X - 1 0 0 5 0 μ LおよびP B S 4 0 0 μ Lをそれぞれ加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。その1 0 0 μ Lを9 6穴マイクロプレートにとり、A R V O s x - 4を使用して励起波長4 8 5 n mおよび蛍光波長5 3 0 n mでの蛍光強度を測定し、0時間後および3時間後の薬物の回収率を下記式(6)で算出した。

【 0 1 2 5 】

【数 6】

$$0 \text{ 時間後のODNの回収率 (\%)} = A_0/B_0 \times 100$$

(6)

$$3 \text{ 時間後のODNの回収率 (\%)} = C_3/D_3 \times 100$$

$$A_0 = \sum \left\{ \text{各フラクション蛍光強度}_{\text{被覆微粒子百分(0時間後)}} \times (\text{各フラクション体積})_{\text{被覆微粒子百分(0時間後)}} \right\}$$

$$B_0 = \sum \left\{ \text{各フラクション蛍光強度}_{\text{全百分(0時間後)}} \times (\text{各フラクション体積})_{\text{全百分(0時間後)}} \right\}$$

$$C_3 = \sum \left\{ \text{各フラクション蛍光強度}_{\text{被覆微粒子百分(3時間後)}} \times (\text{各フラクション体積})_{\text{被覆微粒子百分(3時間後)}} \right\}$$

10

$$D_3 = \sum \left\{ \text{各フラクション蛍光強度}_{\text{全百分(3時間後)}} \times (\text{各フラクション体積})_{\text{全百分(3時間後)}} \right\}$$

【 0 1 2 6 】

【表 3】

第 3 表

	平均粒子径 (nm)	回収率 (%)		FBS中の残存率 (%)	
		ODN	脂質	0h	3h
実施例 5	124	84	45	68	43
実施例 6	125	85	57	84	62
実施例 7	119	88	70	87	73
実施例 8	129	88	70	79	61
実施例 9	110	85	29	55	32
比較例 3	145	97	59	測定せず	測定せず

20

【 0 1 2 7 】

第 3 表によると、実施例 5 ~ 9 で得られた製剤は、比較例 3 で得られた製剤と比較し、同程度に小さな粒子径（ただし、実施例 5 ~ 8 および 9 で得られた製剤は、それぞれ 130 nm 以下および 115 nm 以下）で、同程度に効率よく薬物が内封された被覆微粒子であり、また堅固に薬物が内封された被覆微粒子であった。実施例 5 ~ 9 は、被覆層成分が溶解した極性有機溶媒を含む液（液 A）を調製する工程、液 A と混合可能であり、かつコア微粒子が分散し、極性有機溶媒を含まないまたは液 A より低い割合で極性有機溶媒を含む液（液 B）を調製する工程、および液 A と液 B を混合して液 C を調製する工程を含むコア微粒子が被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法に関するものである。該方法は従来法と比較し、例えば徐々に混合しなければならない等の制約がない簡便な製造方法であるにも関わらず、該方法により、比較的大きな薬物である ODN を含有するコア微粒子を用いた場合でも、既存の製造方法と同程度に優れた被覆微粒子が得られることが明らかとなった。

30

【実施例 10】

40

【 0 1 2 8 】

被覆層成分およびコア微粒子の分散液（液 H）； E P C 30 mg および P E G - D S P E 6 . 25 mg を、水 0 . 75 mL 水に分散させた。得られた分散液を、孔径 0 . 4 μm のポリカーボネートメンブレンに 11 回、孔径 0 . 1 μm のポリカーボネートメンブレンに 25 回通し、脂質分散液を得た。得られた脂質分散液 0 . 375 mL と、実施例 5 の B 5 液を混合した（H 10 液）。

H 10 液に、エタノール 0 . 625 mL を加え（エタノール濃度はおよそ 50 vol % であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、30 分間攪拌して、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水 11 . 25 mL を混合し、実施例 5 と同様に超遠心操

50

作を行い、製剤を得た。

【実施例 11】

【0129】

被覆層成分およびコア微粒子の分散液（液H）；実施例10のH10液の調製において、水の量を1mLとし、得られた脂質分散液0.5mLに実施例5のB5液を混合した（H11液）。

H11液に、エタノール0.5mLを加え（エタノール濃度はおよそ40vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、30分間攪拌して、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水8.75mLを混合し、実施例5と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

10

【実施例 12】

【0130】

被覆層成分およびコア微粒子の分散液（液H）；実施例10のH10液の調製において、水の量を1.125mLとし、得られた脂質分散液0.563mLに実施例5のB5液を混合した（H12液）。

H12液に、エタノール0.438mLを加え（エタノール濃度はおよそ35vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、30分間攪拌して、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水7.5mLを混合し、実施例5と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

20

【実施例 13】

【0131】

被覆層成分およびコア微粒子の分散液（液H）；実施例10のH10液の調製において、水の量を1.375mLとし、得られた脂質分散液0.688mLに実施例5のB5液を混合した（H13液）。

H13液に、エタノール0.313mLを加え（エタノール濃度はおよそ25vol%であり、この濃度で被覆層成分およびコア微粒子は分散した）、30分間攪拌して、被覆微粒子の分散液を得た。

得られた被覆微粒子の分散液と水5mLを混合し、実施例5と同様に超遠心操作を行い、製剤を得た。

30

【0132】

試験例 4

実施例10～13で得られた各製剤について、試験例3と同様の方法に従って、平均粒子径、ODNおよびEPCの回収率、ならびにFBS中の安定性について検討を行った。結果を第4表に示す。

【0133】

【表 4】

第4表

	平均粒子径 (nm)	回収率(%)		血漿残存率(%)	
		ODN	EPC	0時間	3時間
実施例 10	108	79	43	56	29
実施例 11	98	90	76	82	61
実施例 12	99	93	74	88	70
実施例 13	95	90	79	73	60
比較例 3	145	97	59	測定せず	測定せず

40

【0134】

50

第4表によると、実施例10～13で得られた製剤は、比較例3で得られた製剤と比較し、同程度に小さな粒子径（ただし、実施例10および11～13は、それぞれ115nm以下および100nm以下）で、同程度に効率よく薬物が内封された被覆微粒子であり、また堅固に薬物が内封された被覆微粒子であった。実施例10～13は、被覆層成分およびコア微粒子が分散した液（液H）を調製する工程、液Hと混合可能であり、かつ極性有機溶媒を含有する液を、液Hと混合して液Iを調製する工程を含むコア微粒子が被覆層成分で被覆された被覆微粒子の製造方法に関するものである。該方法は、従来法と比較し、例えば徐々に混合しなければならない等の制約がない簡便な製造方法であるにも関わらず、該方法により、比較的大きな薬物であるODNを含有するコア微粒子であっても、従来法と同程度に優れた被覆微粒子が得られることが明らかとなった。

10

【0135】

なお、第3表および第4表からわかるように、実施例9および13で得られる製剤は、極性有機溶媒の濃度がわずか25%程度であるにも関わらず、従来法と同程度に小さな粒子径で、従来法と同程度に効率よく製造でき、また堅固に薬物が内封された被覆微粒子であった。このことから、本発明の被覆微粒子の製造方法は、従来法と比較し、用いる極性有機溶媒を減量できる利点もあることが明らかとなった。

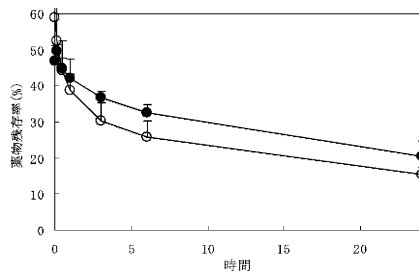
【産業上の利用可能性】

【0136】

本発明により、コア微粒子が被覆層成分で被覆された被覆微粒子の簡便な製造方法等が提供される。また、本発明によって、効率よくおよび/または堅固に薬物を含有させた被覆微粒子の製造方法等が提供される。

20

【図1】



第1図

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 K 47/24	(2006.01)	A 6 1 K 47/24

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 国際公開第02/028367(WO, A1)
特開平03-169808(JP, A)
特開平06-100353(JP, A)
特表2001-503735(JP, A)
特開昭63-239213(JP, A)
特表2002-538096(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K9/00-9/72,
A61K31/00-31/80,
A61K47/00-47/48,
B01J13/00-13/02