(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002 年12 月5 日 (05.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/096396 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61K 9/52, 38/00, 47/04, 48/00, A61P 5/00, 5/06, 5/10, 5/18, 9/00, 9/10, 29/00, 31/00, 35/00, 37/06

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/04772

(22) 国際出願日: 2002 年5 月17 日 (17.05.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-158429 2001 年5 月28 日 (28.05.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社プロテック (PROTECK CO., LTD.) [JP/JP]; 〒105-6201 東京都 港区 愛宕二丁目５番１号 Tokyo (JP). 株式会社エルティーティー研究所 (LTT INSTITUTE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒105-6201 東京都 港区 愛宕二丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水島 裕 (MIZUSHIMA,Yutaka) [JP/JP]; 〒154-0022 東京都 世田谷区 梅丘１丁目１番１１号 Tokyo (JP). 高木 幸江 (TAKAGI,Yukie) [JP/JP]; 〒214-0035 神奈川県 川崎市 多摩区長沢４丁目３番２号 Kanagawa (JP). 檜垣 恵 (HIGAKI,Megumu) [JP/JP]; 〒156-0057 東京都 世田谷区 上北沢１−２８−２４−３０５ Tokyo (JP). 五十嵐 理慧 (IGARASHI,Rie) [JP/JP]; 〒214-0036 神奈川県 川崎市 多摩区南生田５丁目８番２号 Kanagawa (JP). 山口 葉子 (YAMAGUCHI,Yoko) [JP/JP]; 〒258-0003 神奈川県 足柄上郡 松田町松田惣領１７５９番地１ アンソレイユ２０２ Kanagawa (JP). 木村 道夫 (KIMURA,Michio) [JP/JP]; 〒253-0003 神奈川県 茅ヶ崎市 鶴が台９番８−３０４ Kanagawa (JP).

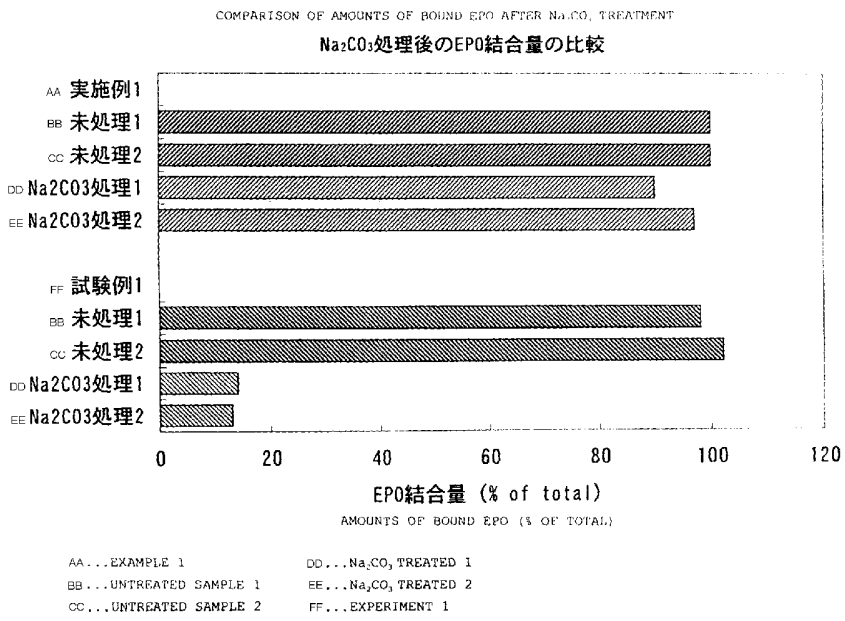
(74) 代理人: 高橋 剛, 外(TAKAHASHI,Takeshi et al.); 〒103-0027 東京都 中央区 日本橋３丁目６番10号 マスキチビル３Ｆ Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

[続葉有]

(54) Title: FINE INORGANIC PARTICLES HAVING DRUG INCLUDED THEREIN, METHOD FOR PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL PREPARATION COMPRISING FINE INORGANIC PARTICLES HAVING DRUG INCLUDED THEREIN

(54) 発明の名称: 薬物封入無機物微粒子、その製造法及び薬物封入無機物微粒子製剤



(57) Abstract: Fine inorganic particles having a drug included therein which comprises fine calcium-containing inorganic particles sparingly soluble in water and, included therein, a biologically active substance; a method for the inorganic particles having a drug included therein which comprises (1) providing an aqueous solution of a calcium salt, (2) admixing

[続葉有]

WO 02/096396 A1

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

the calcium solution with an aqueous solution of a biologically active substance and (3) admixing the resultant solution with an aqueous solution of a carbonate salt, a phosphate salt, an oxalate salt or a urate salt, to thereby form fine calcium-containing inorganic particles sparingly soluble in water having the biologically active substance included therein; and a pharmaceutical preparation comprising the inorganic particles having a drug included therein and a pharmaceutically acceptable additive. The fine inorganic particles having a drug included therein can be prepared with ease, has no pungency, can be applied to many medically effective proteins, medically effective low molecular weight compounds and genes, can stabilize the medically effective proteins, medically effective low molecular weight compounds and genes, and exhibits excellent sustained release effect and targeting effect.

(57) 要約:

製剤作製方法が簡単で、刺激性がなく、多くの薬効を有するタンパク質、薬効を有する低分子化合物、遺伝子に応用出来、かつ当該薬効を有するタンパク質、薬効を有する低分子化合物、遺伝子を安定させることが出来、そして優れた徐放効果、ターゲット効果の得られる薬物封入無機物微粒子、その製造法及び薬物封入無機物微粒子製剤を提供することにある。

薬物封入無機物微粒子は、カルシウム含有水難溶性無機物微粒子と、当該微粒子の内部に封入された生物学的活性物質と、からなる。その製造法は、（１）カルシウム塩水溶液を準備し、（２）この溶液に、生物学的活性物質水溶液を添加混合し、次いで（３）炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩または尿酸塩水溶液を添加混合することにより生物学的活性物質をカルシウム含有水難溶性無機物微粒子に封入せしめることからなる。その製剤は、前記の薬物封入無機物微粒子に、製剤学的に受容可能な添加物を加えたことから成る。

明細書

薬物封入無機物微粒子、その製造法及び薬物封入無機物微粒子製剤

技術分野

本発明は、薬効を有するタンパク質、薬効を有する低分子化合物、遺伝子を封入せしめたカルシウム含有水難溶性無機物微粒子、その製造法及びそのカルシウム含有水難溶性無機物微粒子を用いた薬物封入無機物微粒子製剤、詳しくは薬効を有するタンパク質、抗原、遺伝子、薬効を有する低分子化合物を封入せしめたカルシウム含有水難溶性無機物微粒子を用いた徐放製剤、ターゲット徐放製剤、及びその製造法に関する。

さらに同微粒子を再生医学に用いる乳酸重合体などからなるマトリックスに封入した製剤に関する。

背景技術

従来の技術としてカルシウム含有無機物質を薬物の担体として用いた報告はあり、ハイドロオキシアパタイトの微細結晶の表面に抗癌剤などを担持させ、動物に注射する方法は考案されている。このほか、多孔性のアパタイトを用いた徐放製剤も考えられている。しかし、リン酸カルシウム以外のカルシウム含有水難溶性無機物微粒子を用いた報告や特許は炭酸カルシウムを用いた点鼻薬としての特許(特開平 07-165613,特開平 08-027031)があるのみである。

又微粒子の表面に薬物をつけるということは行われていたがカルシウム含有水難溶性無機物微粒子の内部に薬物を封入するということは行われていなかった。

即ち、カルシウム含有水難溶性無機物微粒子を形成する際に生物学的活

性物質を共存させて、無機物微粒子が形成されると同時に生物学的活性物質をその無機物微粒子中に封入せしめたという技術は行われていなかった。

近年、バイオ技術の進歩によりタンパク医薬品は多くなった。しかしタンパク医薬品は注射によらなければ投与できず、また半減期の短いものが多い。従って、簡単な方法により半減期を長くする工夫が必要となってくる。

またマクロファージ、網内系組織、好中球、血管内皮細胞、ガン細胞、炎症部位、感染部位、ガン組織、動脈硬化壁への主として低分子薬物、活性蛋白、ワクチン、遺伝子のターゲットは今後ますます重要な課題となってくる。

発明の開示

そこで、本発明は、製剤作製方法が簡単で、刺激性がなく、多くの薬効を有するタンパク質、薬効を有する低分子化合物、遺伝子に応用出来、かつ当該薬効を有するタンパク質、薬効を有する低分子化合物、遺伝子を安定させることが出来、そして優れた徐放効果、ターゲット効果の得られる薬物封入無機物微粒子、その製造法及び薬物封入無機物微粒子製剤を提供することを目的とするものである。

前記目的を達成するため、本発明の薬物封入無機物微粒子はカルシウム含有水難溶性無機物微粒子と、当該微粒子の内部に封入された生物学的活性物質と、からなる。

カルシウム含有水難溶性無機物微粒子の内部に生物学的活性物質を封入した微粒子は製造が簡単で、刺激性がなく、又生物学的活性物質としては薬効を有するタンパク質、薬効を有する低分子化合物又は遺伝子が用いられるが、これらの薬効を有するタンパク質等、特に薬効を有するタンパク

質を安定させることが出来る。

カルシウム含有水難溶性無機物微粒子を形成する際に、生物学的活性物質を共存させてから無機物微粒子を形成させ、当該微粒子の内部に生物学的活性物質が結合していることを本発明においては封入といい、無機物微粒子を形成させた後に薬物を混和することにより無機物微粒子薬物を担持させる方法よりも薬物の封入率が高くかつ薬物の溶出が緩徐であるという効果を生じるものである。

薬効を有するタンパク質としては、エリスロポエチン(EPO)、顆粒球コロニー刺激因子(G － CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM － CSF)、トロンボポエチン、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター(t-PA)、インターロイキン-11(IL-11)、エンブレル、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮増殖因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経成長因子(NGF)、レプチン、ニュートロフィン－３（NT-3）、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、インスリン、ヒト成長ホルモン、抗体および抗原などが挙げられる。特に EPO、G － CSF、インターフェロンα、FGF、EGF、HGF、BDNF、NGF、レプチン、NT-3 などが望ましい。

又、生物学的活性物質が前記カルシウム含有水難溶性無機物に対し 0.0001 ～ 10 重量%含有されていることが望ましい。さらに生物学的活性物質がカルシウムに結合性のある薬物が良く、一般的にはカルシウムが陽性のチャージをもっているので陰性のチャージをもったものが好ましい。

薬効を有する低分子化合物としては、非抗炎症性ステロイドホルモン、ヒドロコルチゾン類などの抗炎症薬、抗微生物薬、抗ガン剤、プロスタグランジンなどの血管作動薬、抗動脈硬化薬、免疫抑制剤、カルシトニン、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)誘導体、他の脳下垂体ペプチドホ

ルモン、バンコマイシン、ティコプラニン、副甲状腺ホルモン(PTH)などが挙げられる。特に、抗菌剤、抗カビ剤などの抗微生物薬、抗炎症剤、抗ガン剤、血管作動薬などが望ましい。又カルシウム結合性の低い低分子薬物の場合は残基にリン酸などカルシウム結合性の高い結合物をエステル結合などで共有結合させた低分子薬物を用いると良い。

カルシウム含有水難溶性無機物としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（アパタイト、ハイドロオキシアパタイトなど）、シュウ酸カルシウム、尿酸カルシウムなどが望ましい。

本発明者らは、カルシウム含有無機物が水難溶性の微粒子であることに着目し、その微粒子内部に薬物を封入し、注射することにより病巣部へのターゲット効果と体内で少しずつ薬物が放出される徐放効果を狙ったものである。即ち、炎症部位、感染部位、ガン組織、動脈硬化壁などでは血管壁に数 10 から数 100nm のギャップがあり、本発明の微粒子のうち 10nm ～ 1,000nm 好ましくは 10nm ～ 500nm の大きさの微粒子はそのギャップを通り病巣に蓄積されることになるので、ターゲット効果を生じさせ、かつマクロファージなどの炎症細胞やガン細胞に貪食されるという二重のターゲット効果、また徐放効果を生じさせることが出来るのである。

又、当該微粒子の大きさが直径 100nm ～ 200 μ m の場合は徐放製剤として皮下注射又は筋肉内注射において有用である。

さらに、近年進歩の著しい再生医療に用いる成長因子の徐放にも大きな威力を発揮するものである。又再生医療に用いる場合は、微粒子がやや大きめの粒子をそのまま使う他、乳酸重合体（PLA）などからなるマトリックスに封入することが望ましい。

最終製剤の作製は、得られた薬物封入無機物微粒子に製剤学的に受容可能な添加物、即ちヒト血清アルブミン（HSA）などのタンパク質、酸性ムコ多糖体、乳酸グリコール酸重合体（PLGA）、乳酸重合体、界面活性

剤、マンニトールなどの分散剤、安定化剤、防腐剤を入れ、乾燥または凍結乾燥により最終製剤を作る。これを等張になるように水または緩衝溶液などで懸濁しヒトに投与する。また疼痛などを防ぐ意味、また分散をさらに優れたものにするためヒアルロン酸などに懸濁して用いることも可能である。あるいは分散剤などを入れた懸濁液をそのまま最終製剤にすることも可能である。

又当該最終製剤は皮下注射、筋肉内注射、血管内注射に適した形態のものである。

本発明の薬物封入無機物微粒子の製造方法は、（１）塩化カルシウム、臭化カルシウム、酢酸カルシウム等のカルシウム塩の水溶液を準備し、（２）この溶液に、生物学的活性物質水溶液を添加混合し、次いで（３）炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸塩、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸塩、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム等のシュウ酸塩、または尿酸ナトリウム、尿酸カリウム等の尿酸塩の水溶液を添加混合することにより生物学的活性物質をカルシウム含有水難溶性無機物微粒子に封入せしめることである。

又、（１）炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩または尿酸塩の水溶液を準備し、（２）この溶液に、生物学的活性物質水溶液を添加混合し、次いで（３）塩化カルシウム、臭化カルシウム、酢酸カルシウム等のカルシウム塩の水溶液を添加混合することにより生物学的活性物質をカルシウム含有水難溶性無機物微粒子に封入せしめることである。

さらに、生物学的活性物質を封入せしめたカルシウム含有水難溶性無機物微粒子が生成中に凝集することを防止するため、反応液にタンパク質、酸性ムコ多糖体、界面活性剤、マンニトールを添加すること、又、生物学的活性物質を封入せしめたカルシウム含有水難溶性無機物微粒子が生体内で凝集することを防止するため、また生体内での貪食作用を回避するため

、薬物封入無機物微粒子にタンパク質、酸性ムコ多糖体、乳酸グリコール酸重合体、乳酸重合体を添加することが望ましい。

なお、製造法において、二つまたはそれ以上の無機物を混合する場合は、pH7 前後で攪拌しながら混和することが好ましく、無機物濃度、薬物濃度、攪拌スピード、作用時間、温度により粒子サイズを調整させることができる。スターラーによる通常の攪拌では 1 μ m ～ 100 μ m の微粒子しかできないが、ボルテックス、ポリトロン、超音波などによりさらに攪拌力を増す事により、10nm ～ 100 μ m の微粒子を作ることも出来る。

又、水溶液はできるだけ中性とし、イオン強度をできるだけ低くし、カルシウムと結合しない緩衝液を使用することが望ましい。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 1 と試験例 1 の組成物中の EPO 量を示す図である。

図 2 は、実施例 2 と試験例 2 の組成物中の G － CSF 量を示す図である。

図 3 は、実施例 3 と試験例 3 の組成物中の HyC（Phos.）量を示す図である。

図 4 は、実施例 4 の組成物からの G － CSF の放出性を示した図であり、対照とした緩衝液中の G － CSF の安定性を合わせ示す図である。

図 5 は、実施例 5 の製剤のマウス筋注後の EPO 血中濃度推移を示す図である。

図 6 は、実施例 6 の製剤が、マウス静注後、コントロールに比し、脾臓に有意に移行することを示す図である。

図 7 は、実施例 7 の製剤が、マクロファージに取り込まれていることを観察した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例、試験例について記述する。

（実施例 1）

5M $CaCl_2$（和光）650 μl と 1mg/ml EPO（中外製薬）125 μl を攪拌を行いながら混和した。そこに 1M Na_2CO_3（和光）2.5ml を添加し攪拌を 10 分行って $CaCO_3$ 粒子を生成させ、$CaCO_3$ 粒子内部に EPO を封入せしめた。これに H_20 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清を除去した。得られた沈渣に H_20 6.25ml 加えて、1.5ml 試験管に 1ml ずつ 4 本に分注した。4 本を 2,000rpm，5min の遠心にかけ、上清を取り除いた。うち 2 本は $CaCO_3$ 粒子に封入されている EPO を定量するため ELISA 測定に供した。残りの 2 本を 1M Na_2CO_3 0.9ml 加えて、攪拌を行い、静置し、表面に結合している EPO を遊離させた。10 分間静置した後に遠心をかけ、上清を除去した。再度、同様の作業を行い、Na_2CO_3 処理で遊離した EPO を遠心にて除去した。残った沈渣を ELISA 測定用とした。$CaCO_3$ 粒子中に封入された EPO は、$CaCO_3$ 粒子を塩酸で溶解し、EPO を遊離させ ELISA を用いて測定した。

（試験例 1）

5M $CaCl_2$ 650 μl と 1M Na_2CO_3 2.5ml を先に混和して $CaCO_3$ 粒子を作製し、H_20 にて洗浄を行った後に 1mg/ml EPO 125 μ 1 加えサンプルを調製した。これに H_20 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清を除去した。以下実施例 1 と全く同じ操作を行い $CaCO_3$ 粒子表面に存在する EPO を測定した。

結果は図 1 に示したように、試験例 1 の粒子表面に EPO を結合させたサンプルとは異なり、本発明方法に基づく実施例 1 の封入法による微粒子サンプルでは Na_2CO_3 処理で EPO はほとんど遊離せず、粒子内にほぼ全て封入されていることが明らかになった。

（実施例 2）

5M $CaCl_2$650 μl と 500 μg/ml G－CSF（中外製薬）250 μl を攪拌を行いながら混和した。そこに 1M Na_2CO_3 2.5ml を添加し攪拌を 10 分行って $CaCO_3$ 粒子を調製した。これに H_2O 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清を除去した。沈渣に H_2O 6.25ml 加えて、1．5ml 試験管に 1ml ずつ 4 本に分注した。4 本を 2,000rpm，5min の遠心にかけ、上清を取り除いた。うち 2 本は $CaCO_3$ 粒子に封入されている G－CSF を定量するため ELISA 測定に供した。残りの 2 本を 1M Na_2CO_3 0.9ml 加えて、攪拌を行い、静置し、表面に結合している G－CSF を遊離させる作業を行った。10 分間静置した後に遠心をかけ、上清を除去した。再度、同様の作業を行い、Na_2CO_3 処理で遊離した G－CSF を遠心にて除去した。残った沈渣を ELISA 測定用とした。$CaCO_3$ 粒子中に封入された G－CSF は $CaCO_3$ 粒子を塩酸にて溶解し、遊離した G－CSF を G－CSF ELISA（IBL 社）を用いて測定した。

（試験例 2）

5M $CaCl_2$ 650 μl と 1M Na_2CO_3 2.5ml を先に混和して $CaCO_3$ 粒子を作製し、H_2O にて洗浄を行った後に 500 μg/ml G－CSF 250 μl 加えたサンプルを調製した。これに H_2O 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清中の G－CSF を除去した。以下実施例 2 と全く同じ操作を行い $CaCO_3$ 粒子に存在する G－CSF を測定した。

結果は図 2 に示したように、試験例 2 の粒子表面に G－CSF を結合させたサンプルとは異なり、実施例 2 の封入法によるサンプルでは Na_2CO_3 処理で G－CSF は多少は遊離するもののかなりの量は粒子内に封入されていることが証明された。

（実施例 3）

5M $CaCl_2$650 μl と 5％のリン酸ヒドロコルチゾン[HyC（Phos．）]を

含有する製剤（水溶性ハイドロコートン、萬有製薬）375 μl をボルテックスにて攪拌を行いながら混和した。そこに 1M $Na_2CO_3$2.5ml を添加し攪拌を 10 分行って $CaCO_3$ 粒子を調製した。これに H_2O 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、$CaCO_3$ 粒子に封入されていない HyC（Phos.）を除去した。この一部を ELISA 測定用とした。また、沈渣に H_2O 6.25ml 加えて、その 1ml を 1.5ml 試験管に移した。これに塩酸を加えて $CaCO_3$ 粒子を完全に溶かし、ELISA 測定用とした。ELISA 測定前に、マウスの肝臓ホモジネート液を 1：1 の割合で混和し、37 ℃で 2 時間インキュベートして HyC（Phos.）の加水分解を行いフリーの HyC とし、測定に供した。肝臓ホモジネート液は、マウスより肝臓を採取し一個体分に対して H_2O 5ml を加えて、ポリトロンでホモジネートした。15,000rpm，5min の遠心をかけ、その上清を回収し、これを肝臓ホモジネート液とした。

（試験例 3）

5M $CaCl_2$ 650 μl と 1M Na_2CO_3 2.5ml を先に混和して $CaCO_3$ 粒子を作製し、H_2O にて洗浄を行った後に HyC（Phos.）375 μl 加えサンプルを調製した。これに H_2O 5ml を加えて 2,000rpm，5min の遠心をかけ、$CaCO_3$ 粒子に結合していない HyC（Phos.）を除去した。以下実施例 3 と全く同じ操作を行い $CaCO_3$ 粒子に存在する HyC を測定した。

結果は図 3 に示したごとく、懸濁液中の総 HyC 量のうち粒子に結合ないし封入されている HyC 量は、実施例 3 のサンプルが 70 %以上、試験例 3 のサンプルが 20 %程度であり、低分子薬剤も $CaCO_3$ 粒子中に封入されることが証明された。

（実施例 4）

5M $CaCl_2$650 μl と 500 μg/ml G－CSF 250 μl を攪拌を行いながら混和した。そこに 1M Na_2CO_3 2.5ml を添加し攪拌を 10 分行って $CaCO_3$ 粒子

を調製した。H_2O 5ml を加えて 2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清を除去した。沈渣に H_2O 12.5ml 加えて、1ml を 2.0ml 試験管に移した。これに 2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清を ELISA 測定用とした。沈渣に 1 % BSA/Tris － HCl（pH7．2）を 1ml 加えて室温で振とうした。24 時間ごとに 2,000rpm，5min.の遠心をかけ上清を回収、沈渣に再び 1 % BSA/Tris － HCl（pH7．2）を 1ml 加えてこの作業を 7 日間行った。最後の沈渣は塩酸にて溶解させて ELISA 測定用とした。G － CSF の測定には IBL 社の ELISA Kit を使用し、G － CSF が封入された $CaCO_3$ 製剤から放出される G － CSF 量を総和（累積）で示した。また、対照として、同時に 100 μ g/ml G － CSF 30 μ l と 1 % BSA/Tris － HCl（pH7．2）5ml を試験管内で混和し、室温で振とうした。24 時間ごとに一部を採取し、G － CSF の量を ELISA にて測定し、室温での G － CSF の安定性を検討した。

結果を図 4 に示した。G － CSF の $CaCO_3$ 粒子からの放出試験で、7 日以上に亘り G － CSF が徐々に放出されることが明らかとなった。7 日後の沈査の G － CSF 量を合計すると 0．7 μ g となり使用した G － CSF 量(10 μ g)と比べかなり低いがこれは緩衝溶液中に溶出した G － CSF の不安定性に基づくものと思われる。緩衝溶液中の G － CSF の不安定性はフリーの G － CSF 溶液を室温で放置した時の失活曲線（白丸、破線）からも明らかである。$CaCO_3$ 粒子中の G － CSF の方が溶液中の G － CSF よりもはるかに安定していることが明らかとなった。

（実施例 5）

5M $CaCl_2$ 650 μ l と 1mg/mlEPO 125 μ l を攪拌を行いながら混和した。そこに 1M Na_2CO_3 2.5ml を添加し攪拌を 10 分行って $CaCO_3$ 粒子を調製した。H_2O 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清中の EPO を除去した。沈渣に H_2O 3ml 加えて、1ml を 1.5ml 試験管に移した。

2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清を完全に取り除いた。2 %コンドロイチン硫酸 A ナトリウム（CS-A，和光）0.3ml と 5%Mannitol（和光）2.1ml を加えて攪拌を行いサンプルを調整した。コントロールとして 1mg/ml EPO 30 μl と 5 % Mannitol 1.77ml を混和させたサンプルも調製した。これらを 5 ケ月齢オスの C3H/He マウスの筋肉に 200 μl 投与し、投与後 4 時間、1，2，3，4 日ごとに眼窩採血を行い、EPO の血中濃度を ELISA にて測定を行った。

結果は図 5 に示したが、凝集や組織結合を防ぐ意味で CS － A を作用させた EPO-$CaCO_3$ 製剤を筋注した場合、in vivo では徐放効果が得られた。

（実施例 6）

5M $CaCl_2$650 μl と 5%の HyC（Phos．）を含有する製剤 375 μl を攪拌を行いながら混和した。そこに 1M $Na_2CO_3$2.5ml を加え攪拌を行って $CaCO_3$ 粒子を調製した。作製された $CaCO_3$ 粒子どうしで結合するのを防ぐために、2%CS-A を 3.525ml 加え、10 分攪拌を行った。H_2O 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、$CaCO_3$ 粒子に結合していない HyC（Phos．）を除去した。沈渣に 1%CS-A/5% Mannitol を 1.397ml 加えてラット投与用とした。またコントロールとして、HyC（Phos．）300 μl と 0.1%Tween80/0.5%BSA/5%Mannitol 818 μl を混和して調整し 500 μl を 10 周齢オスの Wistar ラットに静脈内投与した。投与後 10 分および 1 時間後にマウスから血液を、48 時間後に脾臓を採取した。なお血液はリン酸エステルのまま残っている HyC（Phos．）を HyC に分解するためにマウス肝臓ホモジネート液を 37 ℃，2 時間作用させた。脾臓は十分ホモジネートし、細胞を破砕する作業を行ったのち、マウス肝臓ホモジネート液を作用させ、その後 DMSO で抽出して ELISA 測定を行った。未投与のラットの値を引き HyC 量とした。ELISA は CortisolEIA（IBL 社）を使用した。

結果は図6に示したように、$CaCO_3$ 粒子製剤の場合は、炎症巣やガン組織と同様血管壁にギャップのある脾臓に HyC が多くターゲットされることがわかった。

（実施例 7）

5M $CaCl_2$ 650 μl と 5%の HyC（Phos.）を含有する製剤 375 μl を攪拌を行いながら混和した。そこに 1M Na_2CO_3 2.5ml を加え攪拌を行って $CaCO_3$ 粒子を調製した。作製された $CaCO_3$ 粒子どうしで結合するのを防ぐために、2%CS-A を 3.525ml 加え、10 分攪拌を行った。H_2O 5ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、$CaCO_3$ 粒子に結合していない HyC（Phos.）を除去した。沈渣に 1%CS-A/5%Mannitol を 12.5ml 加えてサンプルを調整した。マウスの腹腔内に 10%プロテオースペプトン 2.0ml 注射し、3 日後に浸出腹腔マクロファージを採取した。$5X10^5$cells/ml に調整し、この細胞懸濁液 0.1ml をカバーグラスを入れた 24wells プレートに入れ培養し、マクロファージを付着させた。付着しない細胞を除去し培養液を入れ換えた後に、HyC（Phos.）封入 $CaCO_3$ 0.375.ml を加えて、37 ℃でインキュベートした。24 時間後、カバーグラスを取り風乾後にギムザ染色して、$CaCO_3$ 粒子の貪食の様子を顕微鏡で観察した。

結果が図 7 に示したように、マクロファージ内に明らかに HyC（Phos.）封入 $CaCO_3$ 粒子が貪食している像が認められた。

（実施例 8）

5M $CaCl_2$ 2.6ml と 500 μg/ml G－CSF1ml を攪拌しながら混和した。そこに 1M Na_2CO_3 10ml を添加し攪拌を 10 分行って $CaCO_3$ 粒子を調製した。H_2O 20ml を加えて、2,000rpm，5min の遠心をかけ、上清中の G－CSF を除去した。これに H_2O 3ml を加え、バイアル管に移した。これを凍結乾燥にかけ粉末を調整した。G－CSF 封入 $CaCO_3$ 粒子 50mg、PLGA2.61g、ジクロロメタン 3ml を混和した。これを 0.1%ポリビニルア

ルコール/0.7%酢酸亜鉛溶液に攪拌しながら混和した。3 時間攪拌後、1,000rpm の遠心にかけ沈渣を得た。H_2O で洗浄後 250 μ m のフィルターを通し、20% Mannitol 0.7 μ l を加え乾燥凍結し徐放性製剤を得た。

請求の範囲

1． カルシウム含有水難溶性無機物微粒子と、当該微粒子の内部に封入された生物学的活性物質と、からなる薬物封入無機物微粒子。

2． 前記生物学的活性物質が薬効を有するタンパク質、薬効を有する低分子化合物または遺伝子であることを特徴とする請求項1記載の薬物封入無機物微粒子。

3． 前記生物学的活性物質が前記カルシウム含有水難溶性無機物に対し0.0001 ～ 10 重量%含有されていることを特徴とする請求項1記載の薬物封入無機物微粒子。

4． 前記薬効を有するタンパク質が、EPO、G － CSF、GM-CSF、トロンボポエチン、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ウロキナーゼ、t-PA、IL-11、エンブレル、FGF、EGF、HGF、BDNF、NGF、レプチン、NT-3、SOD、インスリン、ヒト成長ホルモン、抗体および抗原であることを特徴とする請求項1記載の薬物封入無機物微粒子。

5． 前記薬効を有する低分子化合物が、非抗炎症性ステロイドホルモン、ヒドロコルチゾン類などの抗炎症薬、抗微生物薬、抗ガン剤、プロスタグランジンなどの血管作動薬、抗動脈硬化薬、免疫抑制剤、カルシトニン、LHRH 誘導体、他の脳下垂体ペプチドホルモン、バンコマイシン、ティコプラニン、PTH であることを特徴とする請求項1記載の薬物封入無機物微粒子。

6． 前記カルシウム含有水難溶性無機物が、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、シュウ酸カルシウム、尿酸カルシウムであることを特徴とする請求項1記載の薬物封入無機物微粒子。

7． 前記カルシウム含有水難溶性無機物微粒子が、直径 100nm ～ 200

μ m の微粒子であることを特徴とする請求項１記載の薬物封入無機物微粒子。

８． 前記カルシウム含有水難溶性無機物微粒子が、直径 10nm ～ 1,000nm の微粒子であることを特徴とする請求項１記載の薬物封入無機物微粒子。

９． 請求項１記載の薬物封入無機物微粒子に、製剤学的に受容可能な添加物を加えたことから成ることを特徴とする薬物封入無機物微粒子製剤。

１０． 前記製剤学的に受容可能な添加物がタンパク質、酸性ムコ多糖体、乳酸グリコール酸重合体、乳酸重合体、界面活性剤、マンニトール、防腐剤、安定化剤であることを特徴とする請求項９記載の薬物封入無機物微粒子製剤。

１１． 請求項９記載の薬物封入無機物微粒子製剤が皮下注射、筋肉内注射、血管内注射に適した形態であることを特徴とする請求項９または請求項１０記載の薬物封入無機物微粒子製剤。

１２． （１）カルシウム塩水溶液を準備し、（２）この溶液に、生物学的活性物質水溶液を添加混合し、次いで（３）炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩または尿酸塩水溶液を添加混合することにより生物学的活性物質をカルシウム含有水難溶性無機物微粒子に封入せしめることを特徴とする薬物封入無機物微粒子の製造法。

１３． （１）炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩または尿酸塩の水溶液を準備し、（２）この溶液に、生物学的活性物質水溶液を添加混合し、次いで（３）カルシウム塩水溶液を添加混合することにより生物学的活性物質をカルシウム含有水難溶性無機物微粒子に封入せしめることを特徴とする薬物封入無機物微粒子の製造法。

１４． 前記生物学的活性物質を封入せしめたカルシウム含有水難溶性無機物微粒子が生成中に凝集することを防止するため、反応液にタンパク質

、酸性ムコ多糖体、界面活性剤、マンニトールを添加することを特徴とする請求項１２または請求項１３に記載の薬物封入無機物微粒子の製造法。

図1

Na_2CO_3処理後のEPO結合量の比較

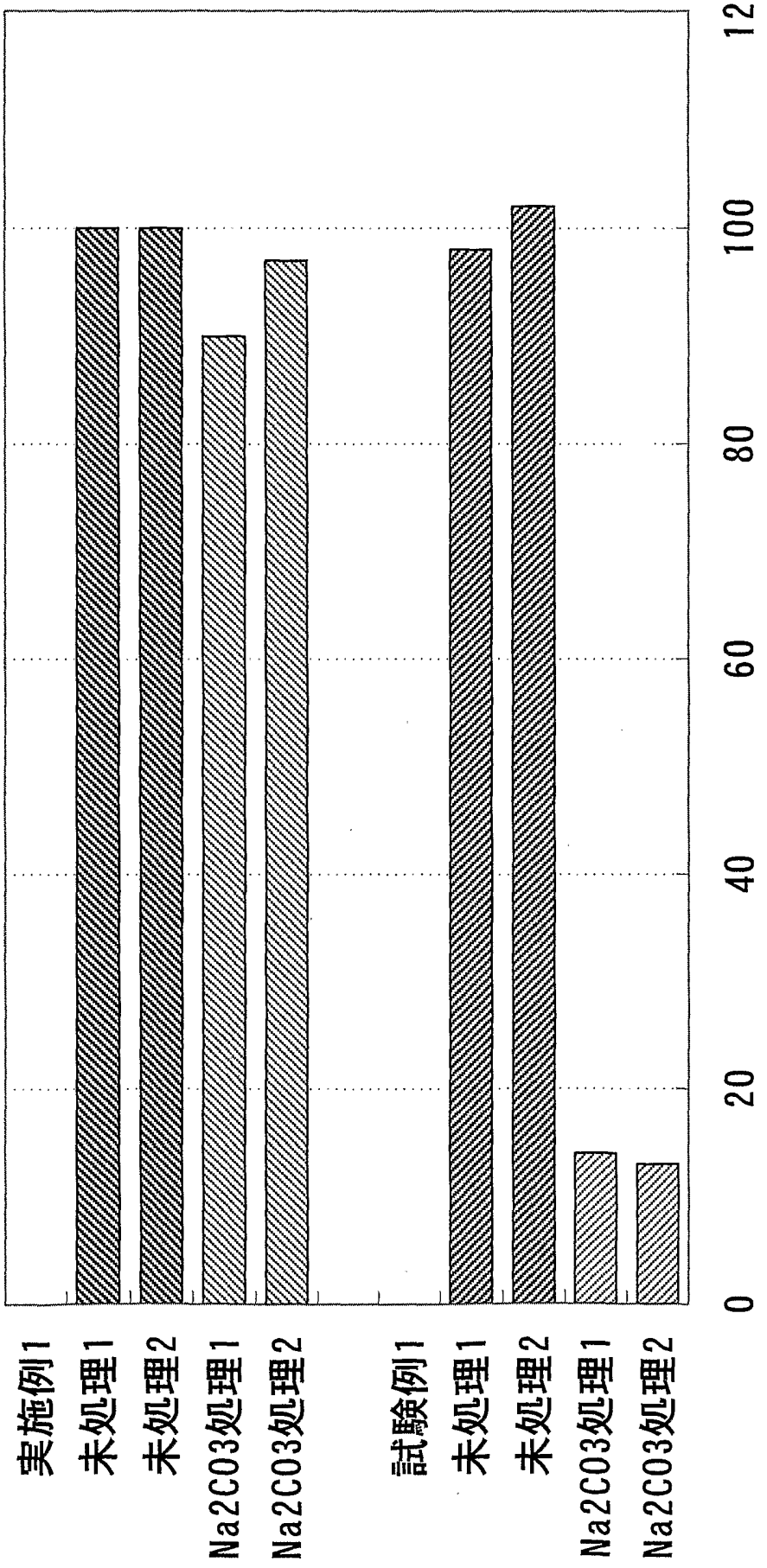


図2

Na_2CO_3処理後のG-CSF結合量の比較

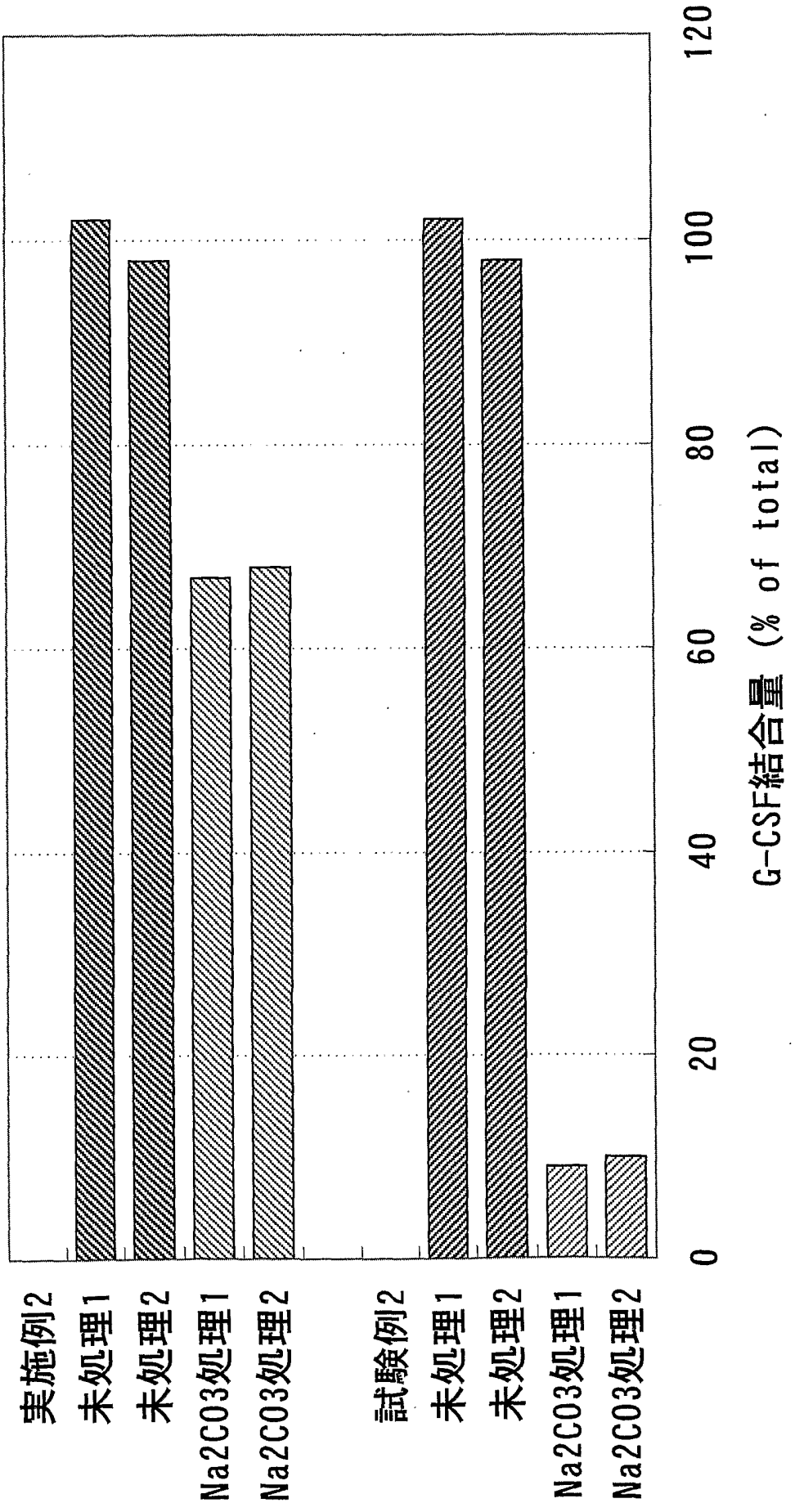
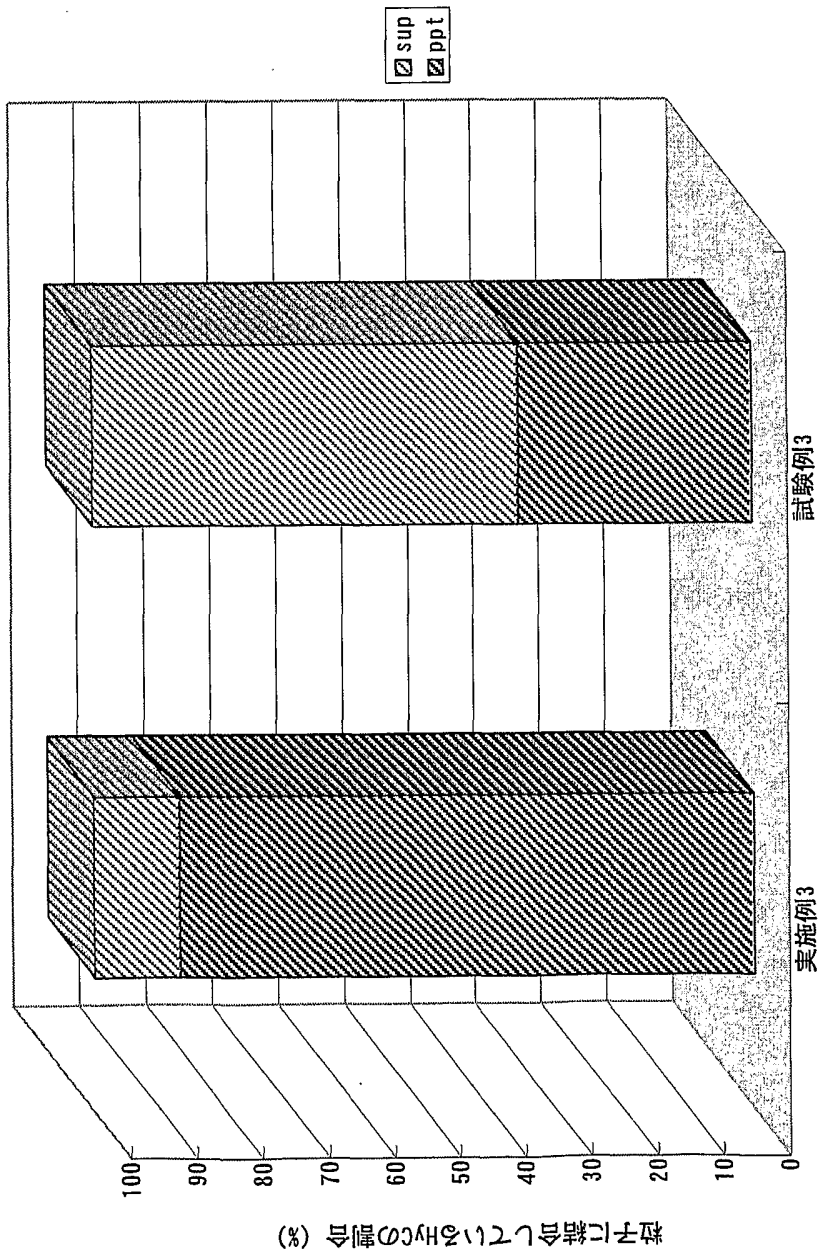


図3

HyC(Phos.)-CaCO3製剤のHyCの封入率



pptは沈査で結合・封入していることを示している。
supは上清で結合していないHyCを示している。

図4

G-CSF（in vitro）の徐放実験とG-CSFの安定性（室温）

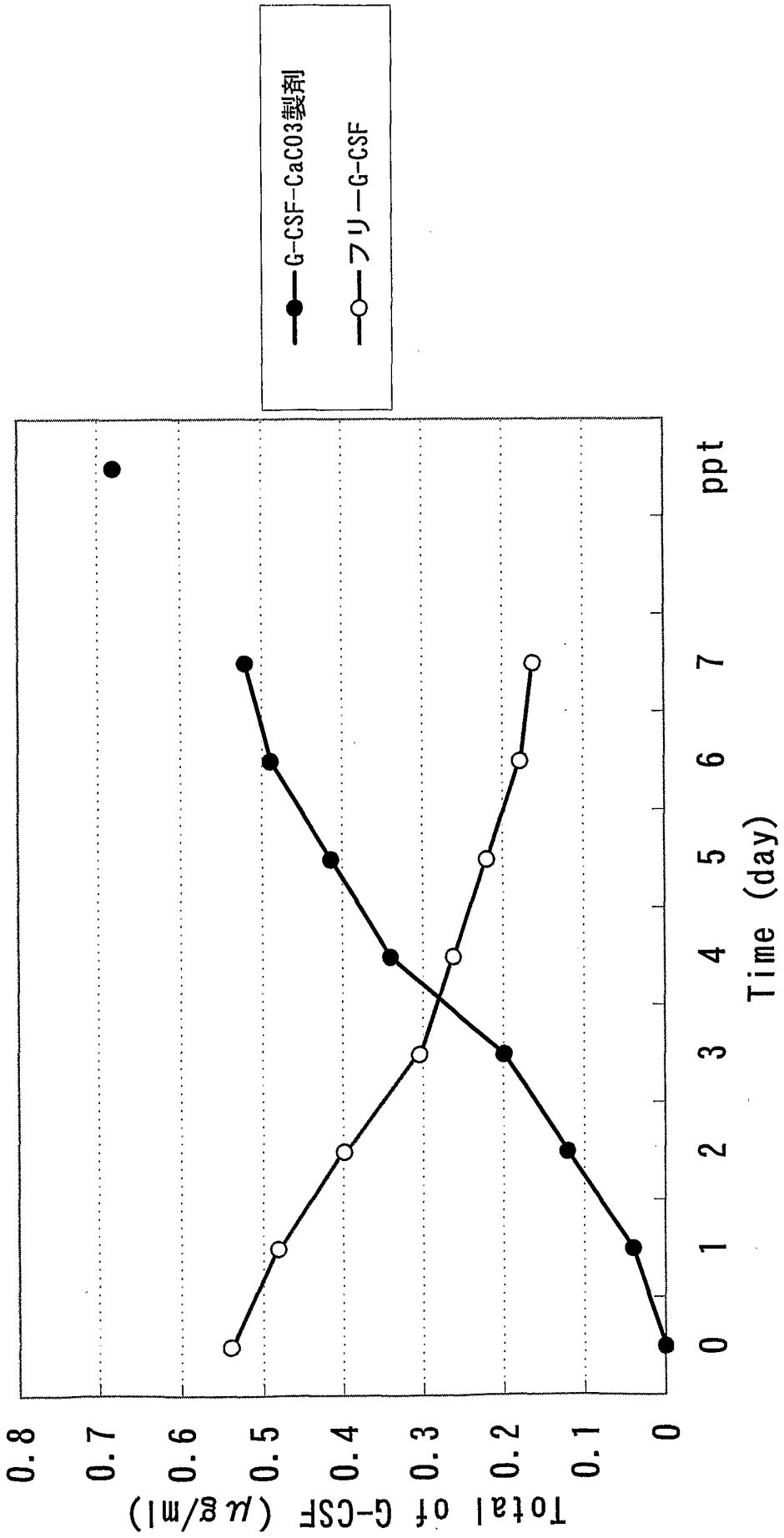


図5

EPO-$CaCO_3$製剤投与後のEPO血中濃度の推移（マウス、in vivo）

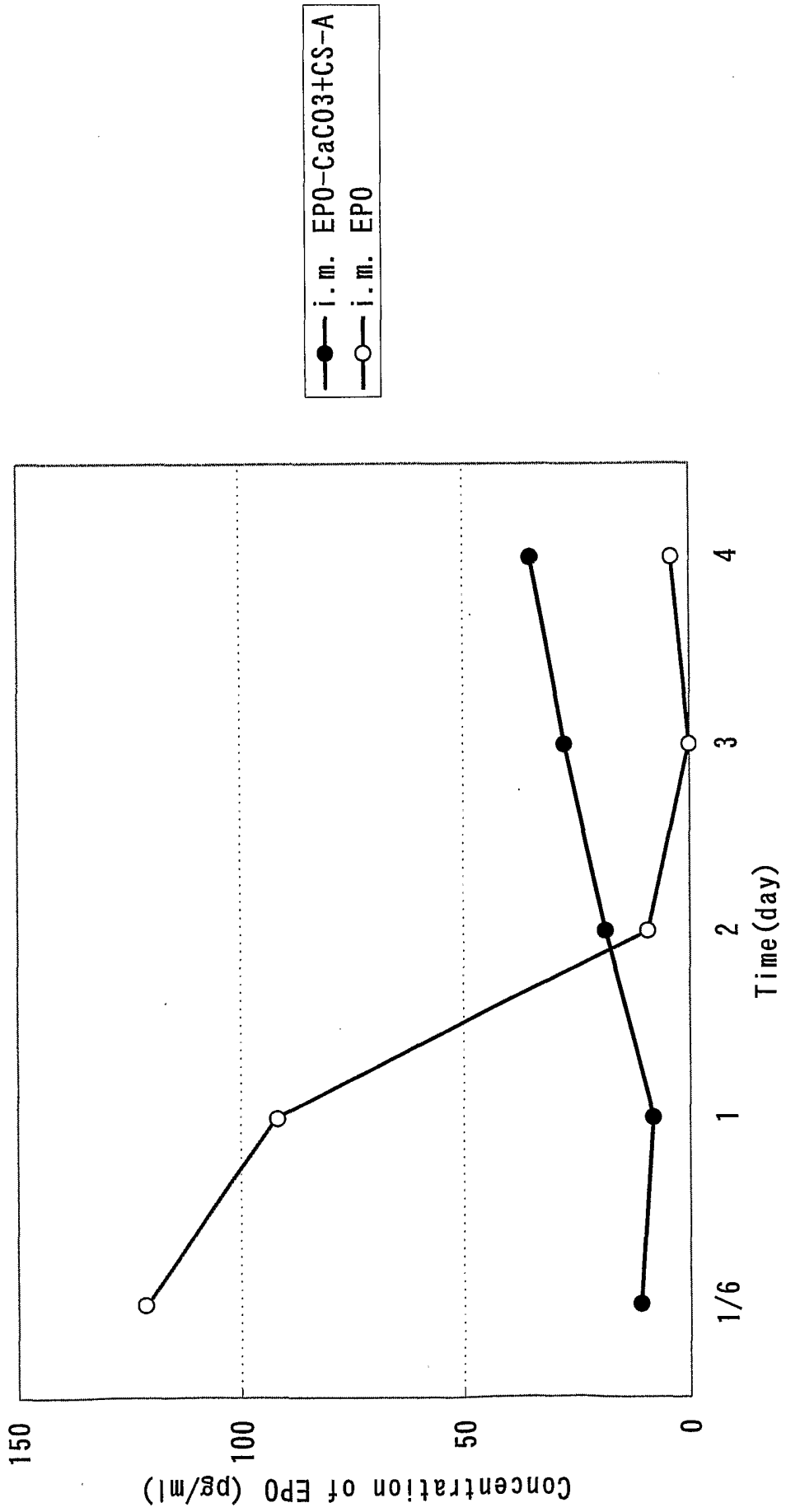


図6

HyC-CaCO3製剤とHyC(Phos.)投与後のHyCの臓器濃度（ラット）

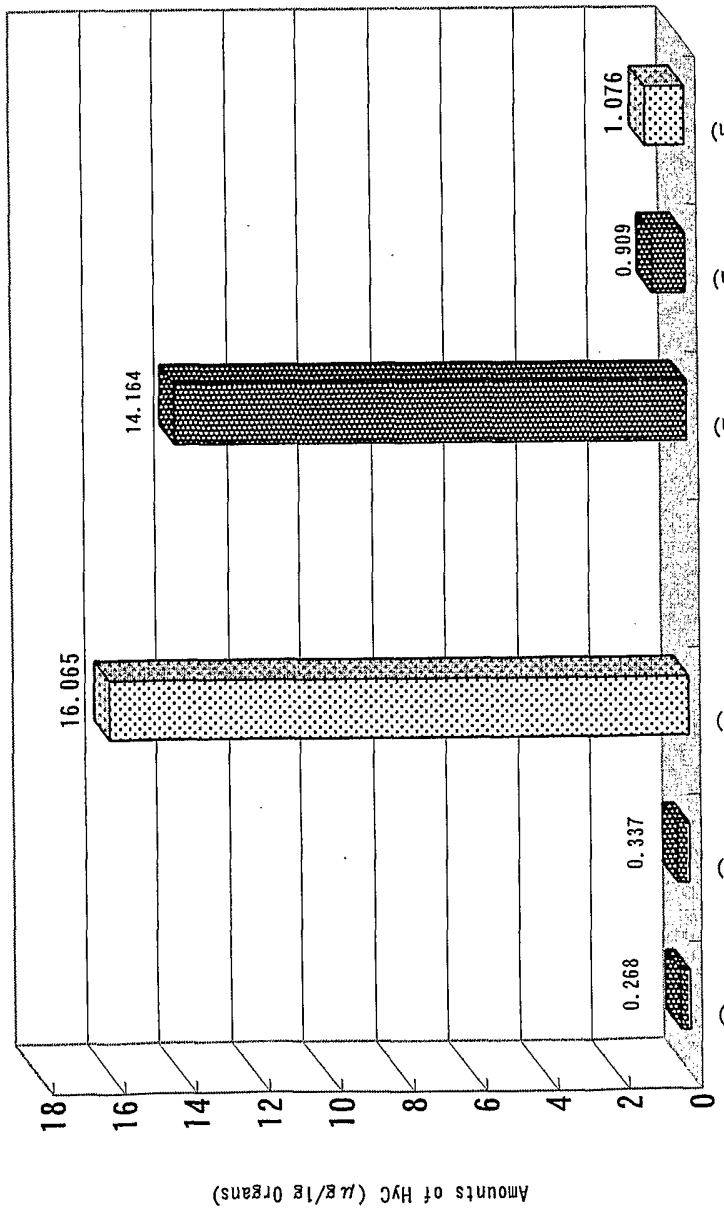
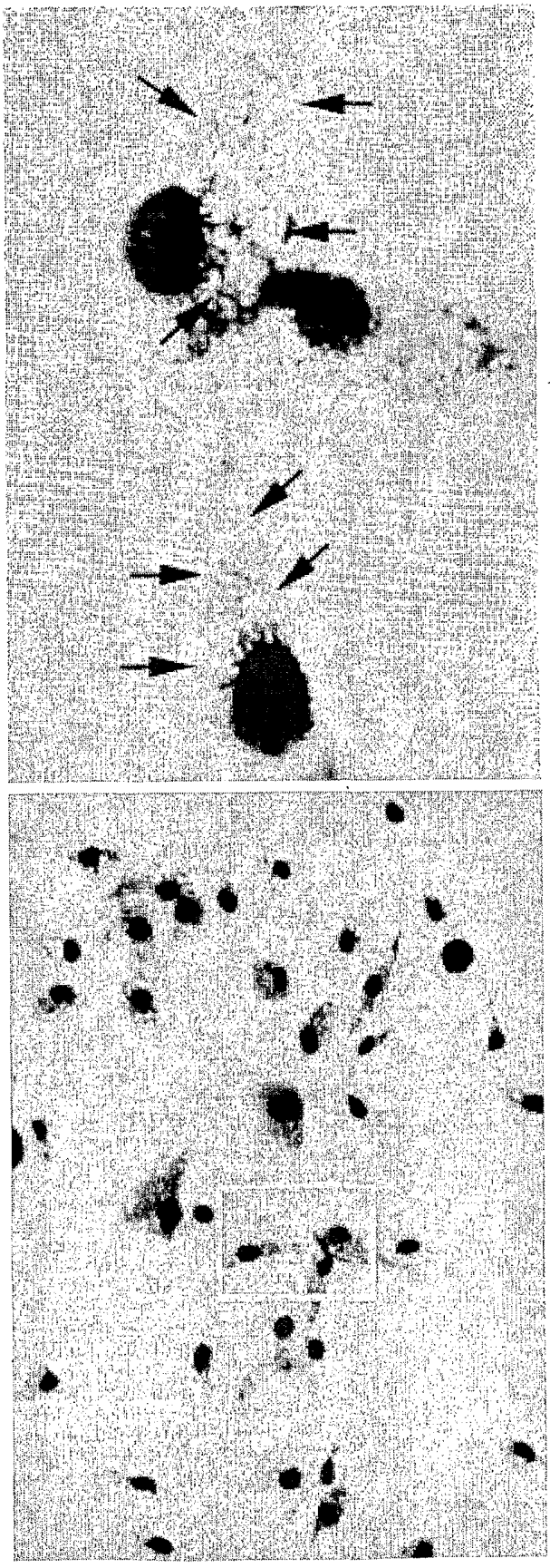


図7

腹腔マクロファージによるHyC(Phos.)封入 $CaCO_3$ 微粒子の取り込み



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/04772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K9/52, 38/00, 47/04, 48/00, A61P5/00, 5/06, 5/10, 5/18, 9/00, 9/10, 29/00, 31/00, 35/00, 37/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] A61K9/52, 38/00, 47/04, 48/00, A61P5/00, 5/06, 5/10, 5/18, 9/00, 9/10, 29/00, 31/00, 35/00, 37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1992-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/04916 A1 (BIOMEASURE INC.), 03 February, 2000 (03.02.00), Page 18, examples 1, 1(f); page 6, line 7 to page 7, line 23; Claims & EP 1098660 A1 & JP 2002-521343 A	1-14
X	JP 4-112832 A (Sangi Co., Ltd.), 14 April, 1992 (14.04.92), Page 2, lower right column, line 4 to page 3, upper right column, line 15 (Family: none)	1-5,7-14
X	Translated under the supervision of Ikunoshin KATO, Lab Manual Dobutsu Saibo no Idenshi Kogaku, Takara Shuzo Kabushiki Kaisha, 27 March, 1994 (27.03.94), pages 115 to 118	1-8,12,13

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 August, 2002 (01.08.02)	20 August, 2002 (20.08.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/04772

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Protein, nucleic acid and enzyme Rinji Zokan, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., 05 December, 1983 (05.12.83), Vol.28, No.14, pages 1570 to 1571	1-8,12,13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０２／０４７７２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ９／５２，３８／００，４７／０４，４８／００，Ａ６１Ｐ５／００，５／０６，５／１０，５／１８，９／００，９／１０，２９／００，３１／００，３５／００，３７／０６

Ｂ．　調査を行った分野
調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ９／５２，３８／００，４７／０４，４８／００，Ａ６１Ｐ５／００，５／０６，５／１０，５／１８，９／００，９／１０，２９／００，３１／００，３５／００，３７／０６

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報　１９９２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２００２年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２００２年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２００２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｘ	ＷＯ　００／０４９１６　Ａ１（ＢＩＯＭＥＡＳＵＲＥ　ＩＮＣ）２０００．０２．０３，第１８頁Example１，１（ｆ），第６頁第７行－第７頁第２３行，CLAIMS ＆　ＥＰ　１０９８６６０　Ａ１ ＆　ＪＰ　２００２－５２１３４３　Ａ	１－１４
Ｘ	ＪＰ　４－１１２８３２　Ａ（株式会社サンギ）１９９２．０４．１４，第２頁右下欄第４行－第３頁右上欄第１５行（ファミリーなし）	１－５，７－１４

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　０１．０８．０２

国際調査報告の発送日　20.08.02

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　伊藤　幸司　４Ｃ　３１２７

電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５０

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｘ	加藤郁之進監訳，ラボマニュアル動物細胞の遺伝子工学，宝酒造株式会社，１９９４．０３．２７，第１１５－１１８頁	１－８，１２，１３
Ｘ	蛋白質核酸酵素臨時増刊，共立出版株式会社，１９８３．１２．０５，第２８巻，第１４号，第１５７０－１５７１頁	１－８，１２，１３