

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4156665号
(P4156665)

(45) 発行日 平成20年9月24日(2008.9.24)

(24) 登録日 平成20年7月18日(2008.7.18)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 9/14	(2006.01)
A 61 K 38/00	(2006.01)
A 61 K 39/00	(2006.01)
A 61 K 47/36	(2006.01)
	A 61 K 9/14
	A 61 K 37/02
	A 61 K 39/00
	A 61 K 47/36

請求項の数 23 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願平9-502167
(86) (22) 出願日	平成8年6月6日(1996.6.6)
(65) 公表番号	特表平11-507382
(43) 公表日	平成11年6月29日(1999.6.29)
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/010031
(87) 国際公開番号	W01996/040069
(87) 国際公開日	平成8年12月19日(1996.12.19)
審査請求日	平成15年6月4日(2003.6.4)
(31) 優先権主張番号	08/480,624
(32) 優先日	平成7年6月7日(1995.6.7)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	エス アール アイ インターナショナル アメリカ合衆国 94025 カリフォルニア州, メンロパーク, レブンスウッド アベニュー 333
(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	弁理士 石井 貞次
(74) 代理人	弁理士 間山 世津子
(72) 発明者	ポンバーガー, デビッド, シー. アメリカ合衆国 94002 カリフォルニア州, ベルモント, アーバー アベニュー - 2021

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤を充填した微粒子を製造するためのシステムと方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬剤を充填した微粒子を形成するためのシステムであって、

A. 所定量の前記薬剤と微粒子形成性の重合体からなる第一の溶液の第一の流れを当該第一の混合チャンバ中に導入するための第一の口、および、当該第一の混合チャンバ内でエマルジョンを形成するために、乳化剤の第二の流れを前記第一の流れの中に前記第一の流れからずらして導入するための第二の口を含む第一の混合チャンバ、ならびに、

B. 前記第一の混合チャンバに隣接しており、所定量の架橋剤を架橋用溶媒中に含有する架橋用溶液を当該第二の混合チャンバに導入するための第三の口を含んでいる第二の混合チャンバ

からなる、前記システム。

【請求項 2】

前記第一と第二の混合チャンバの少なくとも一方が非金属材料である、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 3】

前記薬剤が、細胞間接着分子 I C A M - 1、I C A M - 1 の 1 つ以上の機能性ドメイン、1 つ以上の生物学的に活性な I C A M - 1 断片、前記生物学的に活性な I C A M - 1 断片のアナログ、これらの組み合わせおよび機能性誘導体、タンパク質、ペプチド、ワクチンならびに水溶性薬剤から成る群の 1 つである、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 4】

前記重合体がアルギネートである、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 5】

前記アルギネートが、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カルシウムナトリウム、アルギン酸カリウムおよびアルギン酸プロピレングリコールから成る群の 1 つである、請求項 4 記載のシステム。

【請求項 6】

前記乳化剤が酢酸エチルおよびヘキサンから成る群の 1 つである、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 7】

前記乳化剤があらかじめ水で湿らせた酢酸エチルからなる、請求項 6 記載のシステム。

10

【請求項 8】

前記架橋剤が塩化カルシウムである、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 9】

前記架橋用溶媒がイソプロピルアルコール、エタノール、アセトン / エタノール混合物から成る群の 1 つである、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 10】

前記第一の混合チャンバが前記第二の混合チャンバと連続している、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 11】

前記薬剤が I C A M - 1 であり、前記重合体がアルギン酸ナトリウムからなり、前記乳化剤があらかじめ湿らせた酢酸エチルからなり、前記架橋剤が塩化カルシウムからなり、前記架橋用溶媒がエタノール / アセトン混合物からなる、請求項 1 記載のシステム。

20

【請求項 12】

薬剤を充填した微粒子の製造方法であって、

A . アルギネートと薬剤からなる第一の溶液の第一の流れを所定の流量で第一の混合ブロック中に導入して薬剤を含有するアルギネート液滴を形成し、

B . 乳化剤の第二の流れを第一の流れからずらして所定の流量で前記第一の混合ブロック中に導入し、

C . 前記第一の混合ブロック内で前記アルギネート液滴と前記乳化剤のエマルションを形成し、

30

D . 前記エマルションの第三の流れを前記第一の混合ブロックから第二の混合ブロック中に輸送し、

E . 架橋剤を所定の割合で前記第二の混合ブロック中に導入して前記薬剤を含有するアルギネートの微粒子を形成する

ステップからなる、前記方法。

【請求項 13】

架橋剤を導入する前記ステップがさらに、前記架橋剤を前記第三の流れに対して実質的に正接して前記第二の混合ブロック中に導入することを含んでいる、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記薬剤が、細胞間接着分子 I C A M - 1 、 I C A M - 1 の 1 つ以上の生物学的に活性な断片、 I C A M - 1 の 1 つ以上の機能性ドメイン、前記生物学的に活性な I C A M - 1 断片のアナログ、これらの組み合わせおよび誘導体から成る群の 1 つからなる、請求項 12 記載の方法。

40

【請求項 15】

前記アルギネートが、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カルシウムナトリウム、アルギン酸カリウムおよびアルギン酸プロピレングリコールから成るアルギネートの群の 1 つである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 16】

アルギネートがアルギン酸ナトリウムである、請求項 15 記載の方法。

50

【請求項 17】

前記乳化剤が酢酸エチルおよびヘキサンから成る溶媒の群の 1 つである、請求項 15 記載の方法。

【請求項 18】

さらに、架橋ステップの後に、前記微粒子を濯ぎ溶液で濯いで前記微粒子を実質的に脱水するステップを含んでいる、請求項 15 記載の方法。

【請求項 19】

前記濯ぎ溶液が酢酸エチル、イソプロパノール、エタノールおよびこれらの混合物から成る群の 1 つである、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

前記薬剤が I C A M - 1 であり、前記アルギネットがアルギン酸ナトリウムであり、前記乳化剤があらかじめ水で湿らせた酢酸エチルからなり、前記架橋剤が塩化カルシウムからなる、請求項 12 記載の方法。

【請求項 21】

薬剤を充填した微粒子の製造方法であって、

A . アルギネットと薬剤からなる第一の流れを所定の流量で第一の混合ブロック中に導入して薬剤を含有するアルギネット液滴を形成し、

B . 乳化剤の第二の流れを前記第一の流れからはずらして所定の流量で前記第一の混合ブロック中に導入し、

C . 前記第一の混合ブロック内で前記アルギネット液滴と前記乳化剤のエマルションを形成し、

D . 前記エマルションを前記第一の混合ブロックから一定量の架橋剤を含有する容器中に輸送する、

ステップからなる、前記方法。

【請求項 22】

さらに、前記薬剤を充填した微粒子の固体のものを形成するのに充分な量の時間前記架橋剤内で前記エマルションをインキュベートすることを含んでいる、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

前記薬剤が I C A M - 1 であり、前記アルギネットがアルギン酸ナトリウムであり、前記乳化剤があらかじめ水で湿らせた酢酸エチルからなり、前記架橋剤が塩化カルシウムからなる、請求項 21 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

序

技術分野

本発明は、一般に、薬剤を充填した微粒子の製造分野に係り、特に、一定期間にわたって薬剤を持続・制御放出する微粒子を製造する分野に係る。さらに特定的にいふと、本発明は、細胞間接着分子 I C A M - 1 、 I C A M - 1 の 1 つ以上の機能性ドメイン、

1 つ以上の生物学的に活性な I C A M - 1 断片、このような生物学的に活性な I C A M - 1 断片のアナログ、またはこれらの組合せもしくは機能性誘導体で微粒子を充填するシステムと方法に係る。この微粒子は、鼻腔内に付着し、数時間にわたって I C A M - 1 を持続・制御的に放出する。

発明の背景

近年鼻の中の空間経路 (nasal passageway) は、ペプチドやタンパク質のような全身的に活性な薬剤を投与するための代替ルートとして注目されつつある。細胞間接着分子 I C A M - 1 のようないくつかのタンパク質はこの鼻内空間に送達 (deliver) するのが最も良い。

薬剤を鼻内空間 (または鼻経路) に送達するのに使用できる微粒子の望ましい大きさの範囲はかなり狭い。すなわち、空気力学的径が約 20 ~ 80 μm である。微粒子が小さ過ぎて約 10 μm 未満であると、空気の流れに伴なって下降して気管気管支部中に運ばれ得る

10

20

30

40

50

。したがって、直径が約10μm未満の微粒子は、気管気管支経路を介して薬剤を送達するのに使用できるであろう。微粒子が大き過ぎて約100μmより大きいと、そのような微粒子は比較的速く鼻経路から除去される。

局所または全身性作用のための鼻粘膜への薬剤送達は、薬剤を充填した粒子との接触時間によって影響を受ける。ポンプまたは加圧計測用量吸入器 (pressurized metered dose inhaler) を用いて投与された鼻用スプレー製剤は主として鼻腔の前部に付着する。

この部分はほとんど纖毛がなく、クリアランスは比較的ゆっくりである。一般に、物質は、粘膜纖毛 (mucociliary) 作用により、流量を次第に大きくしながら平均して約6mm/分の速さで鼻甲介から鼻咽頭中へクリアランスされる。鼻からのクリアランスは薬剤を充填した粒子の粒子サイズおよび鼻経路内の付着部位に依存する。纖毛が薄いかまたは纖毛がない鼻腔前部に付着した粒子は、遅い動き (drag) のために、よりゆっくりした速度で接触している粘液からクリアランスされる。

感冒の主たる原因であるヒトライノウイルスはその大部分が、宿主細胞上の受容体として細胞間接着分子1 (ICAM-1) を利用する。ICAM-1は大きなN末端細胞外タンパク質、膜貫通アンカー、および短いC末端細胞質ドメインをもつ膜内在性タンパク質である。ICAM-1の正常な生理学的機能は、白血球インテグリンリンパ球機能関連抗原1 (LFA-1) の膜結合リガンドとして働き、白血球と各種タイプの細胞との細胞間接着を媒介することである (Greve et al., "Mechanisms of Receptor-Mediated Rhinovirus Neutralization Defined by Two Soluble Forms of ICAM-1", J. Virol. 65 (11): 6015-6023 (1991) 参照)。ICAM-1はヒトライノウイルスと結合するので、切断 (truncated) 形態のICAM-1、すなわちt-ICAM-453を、鼻から送達されるライノウイルス感染予防薬として臨床使用することが提案されている。ICAM-1の鼻腔内滞留時間を長くすることによって、反復投与の必要性を最小にできれば望ましいことであろう。

微粒子の生産技術は薬剤送達に広く応用されている。溶媒蒸発や噴霧乾燥を始めとして多くの技術がそのような微粒子を作成するのに利用されている。現在利用できる技術の中で最も簡単なものひとつは、アルギン酸ナトリウム溶液を塩化カルシウム溶液中に液滴として押出しかまたは噴霧することによってアルギン酸カルシウム微粒子を製造するものである。

タンパク質を始めとする薬剤の制御放出用の微粒子が許容されるためには、直径が小さく (すなわち、1ミリメートルよりかなり小さく)、一定したサイズおよび薬剤分布で製造でき、しかも制御された分解 (減成) 特性をもつ生成物が必要である。

アルギン酸カルシウム微粒子を製造するひとつの方法は、薬剤を含有するアルギン酸ナトリウム水溶液を有機相に分散させた後、エマルションを形成した液滴を硬化させるべく塩化カルシウムを加えることである。このようなバッチ法で許容され得る薬剤充填粒子を製造するためには、2つの界面活性剤 (ソルビタントリオレエートとポリオキシエチレンソルビタントリオレエート) を3:2の比で、濃度を界面活性剤が約1重量/重量 (w/w) %の最小濃度として混合物に添加する必要がある (たとえば、"Drug Encapsulation in Alginate Microspheres by Emulsification." Microencapsulation 9 (3): 309-316 (1992) を参照されたい)。これ以外の界面活性剤の混合比および濃度では、微粒子のサイズ、凝集の程度、薬剤充填および薬剤放出特性に影響が出る可能性がある。すなわち、このアルギン酸カルシウム微粒子製造法は界面活性剤の種類と濃度による影響を受けやすい。

バッチ法によるエマルション形成および硬化技術では、微粒子のサイズ/形状および薬剤のカプセル封入効率を改善するのに通常界面活性剤が必要である。そのような界面活性剤を使用する結果生じ易い問題として、製品から界面活性剤を洗浄除去し、残留レベルを測定するのが困難であること、残留する界面活性剤が健康に有害な作用を及ぼし得ること、薬剤を浸出させてしまうことなく製品から界面活性剤を洗浄除去するのが困難であること、そして、その微粒子の生物接着 (bioadhesion)、膨潤挙動および薬剤放出特性に影響があり得ることがある。

10

20

30

40

50

微粒子を製造するための噴霧液滴形成技術では、大きい粒子、すなわち直径 1 ミリメートル (mm) を越えるものが生成する傾向がある。噴霧液滴形成技術を用いると約 20 ~ 80 μm の所望のサイズ範囲の微粒子を製造することができるであろうが、この液滴形成技術は、その技術のスケーリング (scaling) が困難であり、プロセスに可変性 (process variability) があり、また製薬プロセスの洗浄適性を欠くために望ましくない。

ミクロスフェアを製造するのに使用できる数多くの化学薬品、重合体および制御放出剤が知られており、市販されている。経鼻送達用のミクロスフェアを製造するのに使われる材料の例は、セルロース重合体、特にセルロースの低級アルキルエーテル、澱粉、ゼラチン、コラーゲン、デキストランおよびデキストラン誘導体、タンパク質重合体、たとえばアルブミン、クロモグリシン酸二ナトリウム、セファデックス、または D E A E - セファデックスである。これらには、ミクロスフェアの生物接着または制御放出特性を改善するために、ポリアクリル酸のような他の物質との混合物またはコーティングが含まれ得る。たとえば、Illum の米国特許第 5,204,108 号を参照されたい。

微粒子を製造するのに使用できる他の材料も知られており、中でもアルギネート、キサンタンガムおよびゲランガム (gellan gum) がある。これら 3 つの物質はいずれも、腸溶性コーティングとして有効である。アルギネートは均一なフィルムを生成し、ペーパーコーティング、織物コーティングおよび食品などさまざまな産業上利用性があることが知られている。アルギネートフィルムは、通常可溶性のナトリウム塩形態で使用された後胃液によって不溶性のアルギン酸形態に変換されるので、腸溶性コーティングとして特に有用である。薬剤充填量の高い錠剤においてはアルギン酸ナトリウムをアルギン酸カルシウムナトリウムと組合せることによって改良がなされている。

アルギネートはまた、胃液と接触した時にゲルを形成する性質があることから、長年にわたり懸濁液中に使用されている。さらにまた、アルギン酸カルシウムゲルビーズは、食品産業における香味、バイオリアクター用の酵素、生きている細胞、および生きている生物のような各種物質を含有せしめるのに使用されている。アルギン酸カルシウムは、その製造時に温和な条件が用いられること、および試薬の毒性がないために、特に好ましい。

アルギネートは、1,4-結合した -D-マンヌロン酸残基と -L-グルロン酸残基をさまざまな割合と配列で含有する一群の共重合体に対する集合的な用語である。アルギネートはカルシウムのような二価のイオンと共にゲルを形成し、このゲル形成特性は重合体鎖中の連続した L-グルロン酸残基のブロックの割合と長さに深い関係がある。アルギネートのこれらの特性は Martinsen et al., "Alginic acid as Immobilization Material," Biochemical. Bioeng. 33:79-89 (1989) に記載されている。

アルギネートビーズを用いてペプチドやタンパク質をマイクロカプセル化したという報告がいくつかあるが、ほとんどすべての報告でビーズサイズは直径が 100 μm を越えるとされている。またほとんどすべての報告で、アルギネートゲルビーズを調製するには、アルギン酸ナトリウム溶液を塩化カルシウム水溶液中に滴下してビーズを形成している。そのような方法でマイクロカプセル化されたビーズが生成するが、このような方法は、所望のサイズ範囲の微粒子が生成する操作条件の調節が困難であり、スケーリング (scaling) が困難であり、また製薬プロセスの洗浄適性を欠くために、I C A M - 1 のようなタンパク質を含有する微粒子の工業生産には実用できない。

薬剤を充填したミクロスフェアの調製は Illum の米国特許第 5,204,108 号に概略的に記載されている。この特許では、ゼラチン、アルブミン、コラーゲン、デキストランおよびデキストラン誘導体から作成したミクロスフェア中に活性な剤を入れている。最終的なミクロスフェアを架橋し、最後に経粘膜送達用に処理する。しかし、長期にわたって薬剤を鼻経路内に制御放出するように鼻経路に薬剤を送達するミクロスフェアであって、粘膜閑門を通過せず、かつ鼻経路から除去されないものが相変わらず必要とされている。すなわち、薬剤やタンパク質を制御・持続放出するのに使用できる、薬剤、ペプチドまたはタンパク質を充填した微粒子を製造するための方法とシステムが依然として必要とされている。好ましい方法とシステムでは、薬剤を鼻内経路中に送達するための微粒子であって予測可能な充填率をもちサイズの範囲が約 20 ~ 約 80 μm であるものが、約 80 ~ 約

10

20

30

40

50

100%の回収率で、しかも薬剤の効力を大きく損なうことなく、確実に生成しなければならない。

発明の概要

本発明は、経鼻経路を介して送達することができる、細胞間接着ICAM-1のようなタンパク質を始めとする薬剤を充填したアルギネット（アルギン酸塩またはエステル）微粒子を製造するためのシステムと方法に係る。

本発明のシステムは半連続流系を含んでおり、この系は薬剤を充填したアルギネットの流れ、最も好ましくは低粘度のアルギン酸ナトリウム（LVCR）を、乳化剤の流れと混合して混合チャンバ内でエマルションを形成するものである。同じかまたは隣接する混合チャンバ内の下流の点で、カルシウム塩のような架橋剤を含有する流れをエマルションに添加する。この架橋プロセスではアルギン酸ナトリウム中のナトリウムがカルシウムで置き換えられて、薬剤が充填された非水溶性のアルギン酸カルシウム微粒子を形成する。収集後微粒子を濾過し、洗浄し、真空オーブン中で乾燥し、必要であれば穏やかな圧力を用いて脱凝集すると、経鼻経路を介して送達できる個々の薬剤充填微粒子が生成する。

本発明のシステムと方法では、空気力学的径が約20～約80μmで、空気力学的質量メジアン径（AMMD）が好ましくは約40～約50μm、ICAM-1充填率が約10重量%の微粒子が生成する。このシステムの収率は約100%に達する。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の具体例である代表的な混合ブロックの縦断面の概略図である。

図2は、本発明の具体例である方法とシステムの概略を示す。

図3は、本発明の方法のひとつの具体例のフローチャートである。

図4は、本発明の具体例である代表的な混合ブロックの縦断面の概略図である。

図4Aは、図4の混合ブロックの縦断面を管およびマイラー製継手と共に示す。

図4Bは、図4Aの4B-4B線に沿ってとった断面図である。

図4Cは、図4Aの4C-4C線に沿ってとった断面図である。

図5は、本発明の具体例であるシステムの第二の混合チャンバを有する代表的な第二の混合ブロックの縦断面図である。

図6は、本発明の具体例であるシステムの第二の混合チャンバを有する代表的な第二の混合ブロックの縦断面図である。

特定態様の説明

本発明は、所望の薬剤またはICAM-1のようなタンパク質の制御放出用に鼻の経路を介して送達できる薬剤を充填した微粒子を製造するための新規なシステムと方法に係る。鼻経路を利用するほとんどの薬物送達系（ドラッグデリバリーシステム）は薬剤の全身的伝達を増大することを目指している。タンパク質の細胞間接着分子ICAM-1のメカニズムでは、粒子が宿主系に吸収されることなく、かつ効率的な鼻のクリアランス系によって除去されることなく、鼻経路の表面に止まる必要がある。したがって、ICAM-1の場合、鼻経路に送達することができ、かつICAM-1が吸収その他により除去される前にICAM-1分子が標的のライノウイルス分子に結合するのに充分な時間その経路内に止まるICAM-1充填微粒子を製造するシステムを同定することが重要である。

本明細書に説明するシステムでは、空気力学的径が約20～約80μmの範囲、好ましくはAMMDが約40～約50μmの範囲で概略薬剤充填率が10重量%である微粒子が、ICAM-1回収率約80%以上で確実に生成する。

添付図面の図4を参照すると、本発明のシステムの好ましい具体例は、通常、軸方向に連結された円筒状の第一と第二の混合チャンバが配置されている混合ブロックをもっている。第二のチャンバの直径は第一のチャンバの直径より多少大きいのが好ましい。

第一の薬剤／重合体の流れは、第一のチャンバの第二のチャンバから離れた方の端壁に位置する第一の長軸方向の口を介して、軸方向に第一のチャンバ内に導入される。第二の乳化剤の流れは、第一のチャンバの第一の口と同じ端に近接して位置しており第一の流れとほぼ直交して（しかしそれとずらして）第二の流れを注入するための第二の口を介して第一のチャンバ中に導入される。この第二の口は、第一のチャンバの円筒壁に正接して第二

10

20

30

40

50

の流れを注入するように位置しているのが好ましい。第二の円筒チャンバの第一のチャンバと反対側の端は開放されていて、液体が渦を生じることなく滑らかに第二のチャンバを出していくことができるようになっている。

第一および第二の流れの流量と第一および第二のチャンバの寸法は、両方のチャンバが注入された液体で満たされるようになっている。すなわち、注入された液体は第一および第二の口から入って第一および第二のチャンバを通って流れ、第二のチャンバの開放端に形成された第三の口から出していく。第二の口を介して正接方向に注入された乳化剤流は、チャンバを通過する液体流による軸方向の速度成分ももち、そのためほぼ螺旋状に進行する。この結果、第一チャンバ内部で、第一チャンバに入る際に乳化剤と接触する薬剤／重合体溶液によって形成された液滴のエマルションが生成するのに充分な調節された乱流が起10 こるが、最初に形成された液滴のサイズが大幅に低下することはない。

第二のチャンバ内で液滴は、架橋剤を含む架橋用溶液の流れが第二のチャンバの長軸に直交して（しかしそれとすれば）第二のチャンバ中に注入されるように位置する第四の口を介して導入される架橋剤によって架橋される。第四の口は、第二のチャンバの円筒壁に正接して架橋剤流を注入して架橋剤の螺旋状乱流を形成するように位置しているのが好ましい。このようなシステムの結果はいくつかのパラメーターの影響を受けると思われる。たとえば、極性や親水性のような溶媒特性は混和性、薬剤充填および水性エマルションとの相互作用に影響を与える可能性がある。システムの混合チャンバへの流量は混合ブロック内での混合特性や乱流に影響する可能性があり、その結果微粒子サイズ、微粒子のサイズ分布および混合チャンバ内での凝集の可能性に影響する。架橋剤の濃度は架橋プロセスの速度と完全性に影響を与える可能性がある。洗浄・濾過プロセスは薬剤の浸出、小さい粒子の損失および微粒子の凝集に影響を与える可能性がある。

本明細書で使用する以下の略語および用語は必ずしも限定されるわけではないが以下のように定義される。

「I C A M - 1」は、細胞間接着分子I C A M - 1を意味するものであり、全長（膜貫通）形態および切断（非膜貫通）形態のI C A M - 1、特定の生物活性断片、ならびにこれらの機能性アナログの組合せおよび誘導体、特にt - I C A M - 4 5 3を含めて示すのに使用する。

「L V C R」は、低粘度のアルギン酸ナトリウムを意味するものとする。

「微粒子」は、標的薬剤と重合体の実質的に中実の小さい凝集体であって、直径が約20～約80μmであり、サイズと薬剤分布が一定で分解特性が制御されているものを意味するものとする。

「レイノルズ数」は、粘度の影響が流体の速度または流れパターンを調節するのに重要な系のモデルの設計において有意義な無次元数であり、次式で表わされる。

D V L / μ

ここで、Dは流体の密度に等しく、Vは流体の速度に等しく、Lは流体が移動していく口またはチャンバの直径に等しく、μは流体の粘度に等しい。

「アルギネット」は、1,4-結合した-D-マンヌロン酸残基と-L-グルロン酸残基をさまざまな割合と配列で含有する一群の共重合体を意味するものとする。

「薬剤」は、病気の診断、治療、軽減、処置または予防に使用することを意図したあらゆる物質、たとえば、薬理学的に活性なタンパク質およびペプチド、ならびに小さい分子、ホルモン、ポリペプチド、ワクチンおよびこれらの成分を含めて意味するものとする。

「エマルション」は、酢酸エチルとL V C Rのような2種の不混和性の液体を組合せた結果生じるもので、一方の液体が小さい液滴として他方の液体中に分散しているものを意味するものとする。

図1に断面を示した本発明のシステムの具体例は、軸方向に連結された円筒状の混合チャンバ(102、108)と、そこに形成された口(104、106、110)とを有する混合ブロック(100)を含む半連続流システムである。図1に示されているように、混合ブロック(100)は、第一の混合チャンバ(102)を有する第一の混合ブロック(132)と、第二の混合チャンバ(108)を有する第二の混合ブロック(134)とを

10

20

30

40

50

含んでいる。第二の混合チャンバ(108)は、エマルションと架橋剤溶液を通過させるための複数の通路(110、113)を含んでいる。これら2つのプロック(132、134)は、可撓性の管または剛性の通路を介して繋がっている別々のプロックでもよい。あるいはまた、図4に関連して以下に論じるように、2つの混合チャンバ(102、108)は単一の混合プロックとして一体化してもよい。

好みの具体例の場合、混合プロック(132、134)は、テフロン(Teflon、登録商標)やデルリン(Delrin、登録商標)(いずれも広く市販されている)のような非金属材料で形成されている。あるいは、混合チャンバ(102、108)の内面を、テフロン(登録商標)やデルリン(登録商標)のような非粘着材料または他の非湿潤性剛性材料で被覆してもよい。10 またはこのように材料から形成してもよい。というのは、アルギン酸ナトリウムまたはアルギン酸カルシウムは金属表面に沈殿する可能性があり、その結果1つ以上の口(104、106、110、113)が金属表面をもっているとそれらが遮蔽されることがあり得るからである。たとえば、アセトンまたはエタノール中にカルシウム塩を含有する架橋剤溶液が金属の存在下で重合体と接触すると、その金属の表面効果によって微粒子の凝集が起り、その口が閉塞されることになる。もう一つの可能性は、チャンバ(102、108、110)と内部の第三の口(113)の中にテフロン(登録商標)製の挿入管を使用して金属による表面効果を低減することであろう。

ひとつの態様では、第二の混合チャンバ(108)が、そのチャンバ(108)内の乱流を増大させるためにインライン形静止ミキサー(112)をもっている。このミキサー(112)は、流れしていくエマルションに曲がった通り道を与える急な端をもつ螺旋でよい。他の装置を用いて、第二のチャンバ(108)を通って流れるエマルションおよび/またはそこに流入するエマルションを増やし、そのチャンバ(108)内の乱流を増大させてもよい。しかし、さまざまな口(104、106、110、113)を通過する流れの流量を調節することによって追加のミキサー装置を用いることなく充分な乱流を作り出すことが可能であろう。

混合プロック(100)は工業規模の生産に適したいかなる大きさでもよい。図4に示した具体例の場合、一体型プロック(400)はデルリン(登録商標)から製造されており、約7.6cm×5.1cm×5.1cmの大きさである。この具体例の場合、フロントチャンバ(404)の直径は0.32cm(0.125インチ)であり、広い方のチャンバ(406)の直径は0.48cm(0.19インチ)である。チャンバ(402)の内部の全長は約8.4cm(3.5インチ)である。所望により、パラメーターを適当に調節すればこれ以外のサイズも使用できる。図示した具体例の場合、混合プロック(400)は、第一の「パンハンドル(フライパンの柄)」セグメント(404)とそれより大きいセグメント(406)をもつ単一の混合チャンバ(402)をもっている。矢印は、このチャンバ(402)に流入し、また流出する流れの方向を示している。混合プロック(400)の全長は約5.1cm、混合チャンバの狭いセグメント(404)は直径が約0.32cmであり、それより大きいセグメント(406)では直径が約0.48cmに広がっている。

基本的に、第一の口(104)はプロック(100)の水平軸に沿っている。後により詳しく述べる薬剤/重合体溶液は、第一の口(104)を介して所定の流速で第一の混合チャンバ(102)に導入される。第二の口(106)は第一のチャンバ(102)の内壁に対してほぼ直角に、かつ第一の口(104)から流入する流れの線からは外れて位置している。乳化剤はこの口(106)を通って所定の流速で第一の混合チャンバ(102)に導入され、この第一の混合チャンバ(102)内部で薬剤/重合体溶液と共にエマルションを形成する。図4に示した具体例の場合、どちらの口(408、410)も同じ直径0.034cmである。

ひとつの口の内径を他の口の内径と変えて2つの成分の相対流速を調節し、それでも所望の平均直径の微粒子を得ることが可能である。レイノルズ数から予想されるようにひとつの口の内径を少し変えると乱流に影響があり、したがって得られる微粒子のサイズに影響があり得る。

架橋剤溶液を導入するための口(412)は、エマルション流の線から外れており、その直径は他の2つの口より少し大きく、約0.16cmである。

図4A(縮尺は正確ではないが拡大してある)に示されているように、各々の口は、混合チャンバ(402)に通じる管(450)が嵌合したSwagelok(登録商標)継手のような通常の管用ねじ(NPT)継手(452)をもっている。ここに図示した例の場合、管(450)は各々の口(408、410、412)でNPT継手(452)内に固定されている。口(408、410)のところで、口の直径は管の内径より小さくて、薬剤/重合体溶液がチャンバ(402)に入る際にその流れの分裂がないのが好ましい。

口(408、410)から流入する溶液のそれぞれの流れによって作り出される乱流の助けにより、ほとんどの重合体が確実に乳化剤と接触することになる。エマルションは形成されると混合チャンバの大きい方のセグメント(406)中に移動し、そこで三番目の口(412)から流入する架橋剤の流れと出会う。混合チャンバのこのセグメント(406)で生じる乱流は、架橋用溶液流と混合チャンバのパンハンドルセグメント(404)からのエマルションの流れとによって生成する。得られた微粒子と溶媒は、次いでチャンバの大きい方のセグメント(406)の出口(414)を介して排出される。

図4C(縮尺は正確ではないが拡大してある)に、混合チャンバのパンハンドルセグメント(404)を示す。この図示した具体例の場合、第一の口(408)は長軸に沿っており、薬剤/重合体溶液流をチャンバの「パンハンドル」部分(404)に導入する。乳化剤を導入する第二の口(410)は、第二の口(410)の外壁がチャンバ(404)の内壁と直交して薬剤/重合体溶液の流れに対して正接して乳化剤流を導入するように配置されている。図示したように第二の口(410)は第一の口(408)の線とはずれている。

第二の口(410)が第一の口(408)からずれている割合は、チャンバ内の(404)で薬剤/重合体液滴と乳化剤の乱流が生成するのに充分なものである。口(408)および(410)からのそれぞれの流れが交差しないのが最も好ましい。口(408)からの流れの前方運動と口(410)からの流れの正接方向の運動とが相俟って螺旋状の流路を形成し、チャンバの狭い方の部分(404)を通ってそのチャンバの大きい方の部分(406)へ入り、最後はブロックの出口(414)から出していく。

同様に、図4Bに示されているように、第三の口(412)が内側のチャンバ(406)とほぼ直交し、かつそのチャンバ(406)に入るエマルションの流れからずれて位置している。

薬剤/重合体溶液と乳化剤を同じ軸に沿って導入すると、すなわち、2つの溶液を同軸で第一の混合チャンバ内に導入すると、所望のサイズの微粒子が生成しない。第一の混合チャンバ(102)内に形成される乱流の量は、乳化剤および薬剤/重合体溶液の導入方向によって影響される。チャンバ(102)の壁とほぼ正接して、かつ薬剤/重合体溶液流からずらして乳化剤を導入すると、所望のサイズ範囲の微粒子が生成するのに充分な乱流が作り出される。図5に、第一の混合チャンバ(図示せず)から入口(506)を介して第二の混合チャンバ(502)内に移動するエマルション中に架橋剤の流れを導入するための第二の混合チャンバ(502)を含む別の態様の第二の混合ブロック(500)を示す。図示した具体例では、標準的な短管デザインを使用してエマルションを第一の混合チャンバ(図示せず)から第二の混合チャンバ(502)へ導入する。

図示した混合チャンバ(502)の直径は約0.95cmである。口(504)は円筒壁に対して正接して架橋剤を導入するように位置しており、そのためこの中に螺旋状の乱流が生成する。口(504)は、エマルションがこのチャンバに入るときに通る口(506)からずれていない。

図6に、架橋剤とエマルションが導入される第二の混合チャンバ(602)を含む第二の混合ブロック(600)の別の具体例を示す。この例では、環状の混合ティー(604)を使用してエマルションを第一の混合チャンバ(図示せず)から第二の混合チャンバ(602)に導入する。

この環状ティー(604)の外径は約0.64cmであり、混合チャンバ(602)の内

10

20

30

40

50

径は約0.95cmである。架橋剤を導入する際に通過する口(606)の直径は約0.95cmである。

好みの態様では、重合体として低分子量重合体(LVCR)を、薬剤としてMCA M-1を使用する。LVCRは約1%(w/w)の濃度で水に溶解し、ICAM-1は最終0.11%(w/w)のICAM-1濃度で添加する。この結果、最終生成物の理論的ICAM-1充填率は約5~15%、最も好みは約10%になる。流量、個々の重合体および充填される個々の薬剤に応じて重合体と薬剤の他の割合も使用できる。薬剤/重合体溶液はまた、特定の薬剤に対して適したタイプの緩衝塩を含有していてもよい。たとえば、ICAM-1を調製・保存するのにTRISまたはヒスチジン緩衝液を使用でき、したがってLVCR溶液中にはこれらの緩衝液に由来する塩が存在する。また、これらの緩衝液を薬剤/重合体溶液に添加してpHおよびICAM-1の可能な分解を抑制することもできる。

微粒子を形成するのに使用する好みの重合体はMerck & Co., Inc. (Kelco Division, U.S.A., Rahway, N.J.) から市販されているアルギン酸ナトリウムであり、低分子量のアルギン酸ナトリウムが最も好み。本発明を実施するのに使用できるアルギン酸ナトリウムとしては、Keltone HV(商標)、Keltone LV(商標)、Kelgin HV(商標)、Kelgin MV(商標)、Kelgin LV(商標)、Manucol DMF(登録商標)、Manucol DH(登録商標)、Manucol LD(登録商標)およびManugel DMB(登録商標) [いずれも、Merck & Co., Inc. (Kelco Division, U.S.A.) から市販されている] がある。他のアルギネートはKibun Chemical ColまたはPronova Biopolymersから入手できる。本発明を実施するには、微粒子から放出される標的薬剤に対して好みの放出特性をもつか、または特定の薬剤もしくはデリバリーシステムに適した好みの生物特性をもつ他の重合体を使用できる。

薬剤溶液中に使用できる他の重合体としては、特に、アルギン酸カルシウムナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸プロピレングリコール、キサンタンガムおよびゲランガム、親水性セルロース重合体、および天然タンパク質、ならびに合成重合体がある。重合体の選択は充填される対象の薬剤に依存する。

本発明の好みの態様のシステムで使用する薬剤はt-ICAM-453であり、これはTRIS-HClで緩衝された1~2%のt-ICAM-453溶液としてBayer Corporation, Pittsburgh, PAから供給されているものである。この薬剤は最初、個々の薬剤に適した濃度の凍結、凍結乾燥または緩衝溶液形態でよい。凍結薬剤サンプルはその後LVCRまたはその他の適当な重合体溶液に添加される。

本発明を実施するには(図1参照)、薬剤/重合体溶液を、第一の口(104)を介して、好みはTeflon(登録商標)またはその他の非金属材料から製造した管(図示せず)によって、第一の混合チャンバ(102)にポンプで注入する。この管は、一端が口(104)の中に固定され、他端が流量調節ポンプ(図示せず)に接続されている。薬剤/重合体溶液は、粒子のサイズを大きく低下させることなく重合体液滴を形成するのに充分な乱流を第一のチャンバ内に生成する所定の流量で第一の混合チャンバ(102)に導入する。

ほぼ同時に、一端が第二の口(106)内に固定されており他端が流量調節ポンプ(図示せず)によって制御されている管(図示せず)を介して、第一の混合チャンバ(102)に乳化剤を導入する。ICAM-1を充填した微粒子を製造する好みの態様の場合、乳化剤は酢酸エチルであり、湿った酢酸エチル(約2.8~3%)が最も好み。乳化剤は、この乳化剤が薬剤の水性溶液を脱水し乳化剤と薬剤/重合体溶液との間の相間相互作用によるビルトアップを生起させるのを防ぐように(水で)飽和されているのが好み。特に、ICAM-1システムに酢酸エチルを使用した場合、薬剤/重合体溶液からの水は3%未満の濃度で酢酸エチルに可溶である。この場合、酢酸エチルはアルギネートエマルションを脱水し非常に粘稠なゲルを生成する。この問題は、使用前に酢酸エチルをあらかじめ約2.8%以上のレベルまで湿潤させることによって解決することができる。薬剤が水性溶媒に溶かしてない他の態様では、非飽和で相互作用しない他の乳化剤を使用することが可能であり得る。

本発明の I C A M - 1 の具体例の場合エマルションを形成する溶媒としては酢酸エチルが好ましい。というのは、この溶媒が水と部分的にしか混和しないし、架橋用溶媒とは完全に混和し（後述）、そして G R A S（すなわち米国食品医薬品局合格証）級の食品グレードであり、高純度で安価であるからである。

架橋用溶媒として 70 / 30 のアセトン / エタノールを使用し L V C R / I C A M - 1 緩衝サンプル中で 0.5 mM の T R I S 溶液濃度を使用するシステムの場合、I C A M - 1 充填率は理論上 66 % になる。10 mM の T R I S 緩衝サンプルを使用すると I C A M - 1 充填率が理論上 100 % となる。純粋なエタノール系における I C A M - 1 充填率に対する緩衝液濃度の影響はそれ程劇的なものではない。同一の操作条件下で 0.5 mM の T R I S 緩衝液では I C A M - 1 の充填率が 67 %、10 mM の T R I S 緩衝液では I C A M - 1 の充填率が 65 % である。 10

本発明を実施する際、薬剤 / 重合体溶液または乳化剤を導入する前に、最初口（104）を介して緩衝溶液を第一の混合チャンバ（102）に通して、その混合チャンバを予備的に充填しそのシステムに連結したポンプを始動させることができる。溶液と乳化剤を 2 つの口（104、106）を介して第一の混合チャンバ（102）に同時に導入するとエマルションが形成される。第一の混合ブロック（102）に入る補充溶液流によって第一混合ブロック（102）内に創製された乱流は、個々の液滴内へ少量の液体（すなわち L V C R）を分配する。液滴のサイズはチャンバ内の乱流の量および両者の液体の性質に依存し、チャンバにおけるシステムのレイノルズ数に関連している。レイノルズ数が大きくなればなるほど微粒子のサイズはそれだけ小さくなる。また、2 種の溶液が粘稠になればなるほど乱流を生じさせるのがそれだけ困難になる。 20

微粒子は第一の混合チャンバ（102）内で形成されると第二の混合チャンバ（108）中に流入する。微粒子を含むエマルションの流れを容易にするために、この第二の混合チャンバ（108）は第一の混合ブロック（102）に隣接しているのが好ましい。図 1 に示してあるように、好ましい態様の場合第二の混合チャンバ（108）は第一の混合チャンバ（102）と連結している。

第二の混合チャンバ（108）が第一の混合チャンバ（102）と連結していない場合には、エマルションを、第一の混合チャンバ（102）から、ある量の架橋剤を含有する拡大した第二の混合チャンバに移せばよい。そのような態様の場合、架橋はほぼ同時、すなわち約 2 秒以内に起こる。しかし、微粒子組成および架橋剤に応じて、微粒子をさらに脱水するために滞留時間を数時間から数日まで延長してもよい。 30

図 1 に示されているように、第二の混合チャンバ（108）が第一の混合チャンバ（102）と連結している場合、エマルションは第一の混合チャンバ（102）から第二の混合チャンバ（108）に直接移される。エマルションが第三の口（113）を介してチャンバ（108）に入ると、架橋剤溶液の流れが第四の口（110）を介して所定の流量で第二の混合チャンバ（108）に導入される。好ましい態様の場合、第四の口（110）は混合チャンバ（108）の長軸に垂直で、エマルション流の線から離れていて、エマルションの流れにほぼ正接して架橋用流を導入する。

所望の平均直径と薬剤充填特性を有する微粒子をうまく製造する際の重要なパラメーターは混合チャンバに導入される溶液の流量である。実施例 1 に記載する I C A M - 1 で充填されたアルギネット微粒子を製造するためのシステムでは、第一の混合チャンバに入る薬剤 / 重合体溶液の流量は約 5 ~ 10 mL / 分であり、乳化剤は約 50 ~ 80 mL / 分の流量で第一の混合チャンバに導入する。1 % (w / w) の L V C R 溶液、あらかじめ湿らせた酢酸エチルおよび塩化カルシウム架橋剤を使用した一連の実験を図 1 のシステムを用いて実施した。収集し乾燥した後、各サンプルを 250 μ m のスクリーンを通してふるい分けして、起こった凝集量の指標として大きめの粒子をバルクから分離した。次の表 1 に、回収された 250 ミクロン未満の粉碎生成物の割合を示す。 40

表 1

サンプル 番号	L V C R 流量 (mL/分)	E t O A c 流量 (mL/分)	架橋剤流量 (mL/分)	250 μ m未満に ふるい分けされた 粉碎生成物 %	
1	10	50	70	95	
2	10	30	70	0	10
3	10	80	70	84	
4	15.3	50	70	92	
5	15.3	30	70	41	
6	15.3	80	70	90	
7	24	60	70	71	
8	24	80	70	74	
9	37	50	70	31	20
10	37	80	70	66	
11	25	60	40		

さらに250ミクロン未満のサイズを有する粒子を、MalvernとHoribaの両方のサイズ分析を用いてさらに分析した。Malvernサイジングは、Malvern Instruments Co., Inc. (Southborough, MA) から入手できるMalvern 2600c液滴・粒子サイザーを用いるレーザー回折原理に基づいた公知のサイジング技術である。Horiba分析は粒子沈殿技術に基づいた公知のサイジング技術であり、Horiba Instruments, Inc. (Irvine, CA) から入手できるHoriba CAPA-700粒子サイズ分布アナライザーを用いて実施する。Horibaアナライザーにおける粒子サイジングは粒子の空気力学特性に基づいており、結果は空気力学的質量メジアン直径 (A M M D) および代表的なサイズ範囲の粒子の割合 (%) で表わされる。次の表2に、表1から選択したサンプルに関するこの分析の結果を示す。

表 2

粒子サイジング

サンプル 番号	Horiba			Malvern		
	メジアン (μ m)	% < 100 μ m	% < 10 μ m	メジアン (μ m)	% < 100 μ m	% < 10 μ m
1	46.3	86.4	1.9	48.2	94.7	0.9
3	58.6	73.7	1.3	65.4	86.2	0.5
7	61.1	76.7	1.0	54.0	94.1	0.6

粒子のサイズを低下させるほど過大な乱流を生成することなく架橋剤と微粒子を混合するのに充分な乱流を第二の混合チャンバ (108) 内で作り出すように、架橋剤の流量はできるだけ低いのが好ましい。好ましい態様では、I C A M - 1を含む1% (w/w) のL V C Rを約5mL/分の流量で第一の混合チャンバ内に導入する。あらかじめ湿らせた(水2.8%)酢酸エチルは、約83mL/分の流量で第一の混合チャンバ内に導入する。

架橋剤は乳化剤と反応して微粒子を固化させるものならばなんでもよい。好ましい態様では、エマルションを形成するのに水性アルギン酸ナトリウムを用いるときに架橋剤として塩化カルシウムを使用する。他のカルシウム塩も、溶媒または溶媒混合物に可溶である限り使用することができる。架橋プロセスでは、アルギン酸ナトリウム中のナトリウムがカルシウムで置き換えられて、ICAM-1が充填された非水溶性アルギン酸カルシウム微粒子が生成する。この態様の場合、一定量の、微粒子を脱水するアセトンやエチルアルコールのような脱水用溶媒にカルシウム塩を溶解する。架橋剤溶液はアセトン60%とエタノール40%の中にCaCl₂を0.8%含むのが好ましい。

ICAM-1/LVCRの態様の場合、塩化カルシウムは、最終生成物中に塩化カルシウムの沈殿を生じることなくLVCR溶液中のアルギン酸ナトリウムを完全に架橋するのに充分な化学量論的過剰に存在する。塩化カルシウム濃度が高過ぎると、架橋が過大に起こり、個別の微粒子の形成が妨げられる。その場合最終生成物は、架橋した材料の連続マトリックスかまたは大きい(すなわち1~2mmの)非球状粒子となる。

架橋剤と共に使用できる溶媒としてはアセトンがあり、これはイソプロピルアルコールのような他の溶媒ほど容易にICAM-1を分解することができない。他の薬剤と組合せていろいろな溶媒を使用することができ、そのような溶媒は少なくとも部分的には対象となる薬剤の溶解性に依存し得る。各溶媒にはそれぞれの利点と欠点がある。アセトンは架橋した微粒子を脱水するのは容易であるが、塩化カルシウムを溶解しない。エタノールは本発明のシステムで他の溶媒と容易に混和し塩化カルシウムを容易に溶解するが、薬剤がエタノールに可溶であったりすると、たとえば、ICAM-1充填システムに使用した場合、薬剤充填率が低くなることがある。イソプロピルアルコールを使用すると取扱いが良好な速やかに乾燥する生成物が得られ得るが薬剤充填率が低くなることがある。アセトン/エタノールの組合せ(たとえば、85/15、70/30、または65/35)を使用すると、充填率が高くなるが2種類の溶媒を使用するため生産コストが増大し得る。

溶媒は、そのコスト、プロセスに対する適性、および製薬産業における現在の共用性によって選択する。アセトンは水よりはエタノールと混合し得る。なぜならば、水はほとんどの場合他のプロセス溶媒と不混和性であり最終流出物から分離するからである。

そのような相分離は、ICAM-1が水相に損失する恐れがあり、生成物の凝集が起こり、しかも脱水が不完全になるので、ICAM-1を充填した微粒子にとって望ましくない。塩化カルシウムを溶解すると同時に流出物中の2相混合物を防止するのに充分な量のエタノールが好ましい。

本発明のシステムと方法の成功を決定するのに重要な要因は微粒子中の薬剤の充填率と収率である。ICAM-1の場合、所望の収率は80%を越える。全体収率の損失としては、プロセスの炉液および灌ぎ炉液中へのICAM-1の損失、ICAM-1の失活に基づく損失、ならびに所望の微粒子サイズ範囲を外れた微粒子画分が含まれる。

ICAM-1の充填率を測定するには、ICAM-1を微粒子から浸出させるかまたは微粒子を完全に溶解させ、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)もしくは比濁法によって、または関連業界で現在認識されているかもしくは将来認識されるようになり得る他の方法によって濃度を分析すればよい。

架橋剤溶液として、エタノール、アセトン/エタノール(85/15)、アセトン/エタノール(70/30)、アセトン/エタノール(65/35)およびイソプロパノールを本明細書に記載するICAM-1/アルギン酸ナトリウムのシステムに使用することができる。以下の表3に、架橋剤溶液としてイソプロパノール、アセトン/エタノール(70/30)およびエタノールを用いた実験で得られた結果を示す。表3には、100μm未満の粒子の割合と、ICAM-1の充填率に100μm未満の粒子の割合を掛けて計算したICAM-1全体収率とを示す。

表3に示してあるように、アセトン/エタノール(70/30)のシステムでは、10%ICAM-1の充填率がほぼ100%であり、82%の微粒子が直径100μm未満であった。乾燥重量収率にふるい分け収率を掛けて決定した全体収率は理論値の82%であった。

10

20

30

40

50

表3

架橋剤溶液がイソプロパノール、アセトン／エタノール（70／30）およびエタノールの場合のICAM-1充填率

サンプル番号	架橋剤溶液	ICAM-1 100 μm 充填率%	未満の% 未満の%	ICAM-1の 全体収率%	
1	イソプロパノール	58	—	—	
2	アセトン／エタノール 70/30	100	82	82	10
3	エタノール	65	98	84	

本発明のシステムを工業的に実施する際、図2に示したように、薬剤／重合体溶液、乳化剤および架橋剤溶液は最初別々の容器（それぞれ、202、204、206）で調製できる。次いで各溶液は、流量調節ポンプデバイス（116）を用いて容器（202、204、206）から適当な細孔サイズ、たとえば0.2ミクロンの滅菌フィルター（208）を介して移し、別々の滅菌保持タンク（それぞれ、212、214、216）に貯蔵することができる。これらの溶液を混合ブロック（100）中に導入する前に第二の滅菌ろ過ステップを設けてもよい。

流量調節ポンプデバイス（116）、または各溶液に別々の流量が与えられるようにいくつかのインプットとアウトプットを有する单一の流量調節ポンプ装置を用いて、滅菌保持タンク（212、214、216）から適当な口を介して溶液を混合ブロック（100）中に送出する。これらの溶液を各々の容器から混合ブロック（100）に移すには可撓性のチューブを使用することができる。

混合ブロック（100）に導入される各溶液に対する緩衝溶液でインフローポンプデバイス（116）を始動させると好ましいであろう。第一の混合チャンバ（102）に入る薬剤／重合体溶液の流入は、乳化剤の流入が始まる前に開始してもその後に開始してもよい。場合によっては、薬剤／重合体溶液を導入する前にまず乳化剤を第一の混合チャンバ（102）に導入することによって、プロセスの費用効果を高めて混合ブロック（100）に導入された薬剤の廃棄量を減らすことができる。

図3のフローチャートに、本発明を実施する好ましい方法の概略を示す。好ましくは乳化剤を第一の混合チャンバ（102）に導入する（304）のと同時に、薬剤／重合体溶液を第一の混合チャンバ（102）に導入し（302）、こうして微粒子と溶液を含有するエマルションを形成する（306）。次にこのエマルションを第二の混合チャンバ（108）に移し（308）、この時点で架橋剤をチャンバ（108）中に導入する（310）。

エマルションが第一のチャンバにとどまる時間および架橋された溶液が第二のチャンバにとどまる時間は、それぞれのチャンバに流入する個々の流れの流量の関数である。微粒子の形成と架橋はいずれもほとんど瞬時に、すなわち約2秒以内に生起するので、いずれのチャンバでもインキュベーション時間は必要とされない。

微粒子と架橋剤溶媒の混合物は混合ブロック（100）を出たら、所定の最小範囲から外れる微粒子を捕獲するフィルターまたはシーブ（218）を通してろ過する（312）。好ましい態様の場合、ICAM-1を含有する微粒子は標準的な市販のフィルター材料を用いてろ過される。このフィルターは約20 μmを越える直径の粒子を回収でき、約20 μm未満の微粒子は洗浄され、おそらくは廃棄物回収容器（118）中に入る。あるいは、このフィルター（218）で最初たとえば200 μmより大きい粒子をろ過分離し、次のろ過で小さい粒子を除いてもよい。

フィルター（218）内の粒子は次に第一の洗浄に処せられる（314）。図2に示されているように、ひとつの態様においては、この第一の洗浄ステップ（314）では、流量調節ポンプ（116）を使用して第一の洗浄溶液を容器（224）から滅菌フィルター（208）を通して貯蔵容器（226）に移す。

10

20

30

40

50

第一の洗浄溶液はアセトン類、アルコール類または両者の組合せのような任意の脱水用溶液でよい。約10%のエタノールおよび約90%のアセトンまたは90%のイソプロパノールまたは90%の酢酸エチルの第一洗浄が好ましい。溶液によっては特定の微粒子を速やかに、かつ充分に脱水できるものがあるが、溶液の中には目的とする微粒子内に充填される薬剤の効力に影響するものがある。第一の洗浄ステップ(314)は沈殿させることなく過剰の架橋剤、たとえば塩化カルシウムを除去するためのものである。第一の洗浄ステップ(314)は過剰の乳化剤、すなわち酢酸エチルを除去するためのものである。

第一の洗浄ステップ(314)の後、第一の洗浄ステップ(314)と同様にして第二の洗浄ステップ(316)を実施するのが好ましい。すなわち、図2に示されているように、第二の洗浄溶液は流量調節ポンプデバイス(116)を介して容器(228)から滅菌フィルター(208)を通して貯蔵容器(230)に移される。第二の洗浄ステップ(316)は、第一の洗浄ステップ(314)と同じ溶液その他を用いて実施できる。第二の洗浄ステップ(316)で使用する溶液はまた微粒子を脱水もし、したがってこのような溶液としては特に純粋なアセトン、イソプロパノールまたは酢酸エチルなどが含まれ得る。この第二の洗浄ステップ(316)は第一の洗浄溶液の残渣を除くためのものである。したがって好ましい第二の洗浄溶液は100%アセトンであろう。

微粒子は業界で公知のいくつかの方法を用いて回収できる(232)。直接収集法ではサンプルを、ブナー漏斗フィルターまたは工業生産に使用することができるその他のフィルターに直接収集する。ろ液はフィルターを通して吸引によって引き出され、生成物がフィルターに収集されるにつれて微粒子のケーキが生じる。

もうひとつ別の収集法では、流出流(すなわち微粒子と溶媒)を容器中に収集し、一定の時間(たとえば0~48時間)生成物を放置し、次にサンプルをろ過する。微粒子と溶媒の接触時間内に薬剤またはタンパク質が微粒子から浸出する可能性があるが、使用する溶媒系が水に対して高い親和性を有するときには微粒子の付加的な脱水も起こり得る。

第二の洗浄ステップ(316)の後、フィルターに残ったフィルターケーキを収集し、乾燥ステップ(318)の貯蔵容器に入れる。ろ過された物質は真空乾燥オーブンに長時間、すなわち約50度で8時間以上乾燥するのが好ましい。この時間、温度および真密度は微粒子の個々の組成および生産容量に依存する。しかし、微粒子は湿潤大気にさらすと再度水和して5~10%もその重量が増すことがある。

最終ステップとして、乾燥した粒子を、たとえば乳鉢系または工業用に適合した類似の系によって脱凝集し(320)て微細な粉末状の最終製品とすることができます、必要であればふるい分けして所望のサイズ分布を得ることができる。このプロセスの所望の最終製品は、所望の直径範囲をもち所望の範囲内の薬剤充填率を有する凝集していないある量の微粒子である。

次いで、微粒子製品を、当業者に利用できる公知の標準的な処方を用いて経鼻薬剤送達デバイスに処方することができる。本発明に従って製造した薬剤充填微粒子は鼻内経路に接着する特性をもっており、その中に含まれている薬剤を受容患者の循環系に除放する。微粒子内のアルギネットは鼻内経路に含まれる粘膜と相互作用してゲル様の物質となり、これが、薬剤が放出されるにつれて鼻内の経路の表面に接着する。

本発明を利用した工業的規模の製造プロセスの好ましい態様の場合、250グラムの生産プロセスで以下の量の成分を使用できる。すなわち、ICAM-1を約35グラム、アセトンを約70リットル、エタノールを約50リットル、酢酸エチルを約120リットル、このプロセスに使用できる。関連した洗浄ステップではアセトンを約12リットル、エタノールを約1リットル必要とするであろう。図4に示したタイプのいくつかの混合プロックは平行して使用することができ所望の生産プロセスを達成することができる。あるいは、平行して実施するシステムをさまざまに組み合わせてもICAM-1を充填したアルギン酸カルシウム微粒子を工業生産することができる。

以下の非限定実施例は、以上に記載した本発明のシステムとプロセスの代表的具体例である。

実施例 1

この実施例では、流出物は 1 % (w/w) の L V C R および 0.11 % の I C A M - 1、乳化剤はあらかじめ湿らせた (水分 2.8 %) 酢酸エチル、架橋剤溶液はエタノール中 0.8 % の塩化カルシウムである。I C A M - 1 を充填した L V C R の場合、望ましい粒子直径範囲は約 20 ~ 80 μm であり、メジアンが約 40 ~ 50 μm であるのが最も好ましい。所望の I C A M - 1 充填率は約 10 % であり、標的の回収率は約 80 ~ 約 100 % である。

図 4 に示した混合ブロックを用いて、L V C R 流の流量を 15 ~ 45 ミリリットル/分 (mL/分) で変化させ、酢酸エチル流の流量を 61 ~ 106 mL/分で変化させる。これらのパラメーターを用いて得られた代表的なサンプルのデータを表 4 に示す。

10

表 4

流れ (mL/分)				Malvern粒子サイジング		
サンプル番号	L V C R	EtOAc	架橋	メジアン (μm)	100 μm 未満の %	8.8 μm 未満の %
1	15	61	70	88.4	63.8	0.3
2	22	68	70	95.0	58.8	0.3
3	28	73	70	100.6	53.4	0.2

サンプル番号	L V C R	EtOAc	架橋	メジアン (μm)	100 μm 未満の %	8.8 μm 未満の %
1	15	61	70	88.4	63.8	0.3
2	22	68	70	95.0	58.8	0.3
3	28	73	70	100.6	53.4	0.2

20

実施例 2

流出物流を第一の混合チャンバ中に導入するために使用する口の直径が生産される微粒子のサイズと分布にいかなる影響を与えるのか決定するために一連の試験を実施した。これらの試験は、図 4 に示したシステムと 1 % (w/w) の L V C R 溶液を使用して行なった。L V C R 口の内径を 0.034 cm から 0.069 cm まで増大させ、L V C R 溶液と酢酸エチル溶液の流量を変化させた。架橋剤の流量は一定に保った。このような試験の結果を次の表 5 に示す。

30

表 5

操作条件およびふるい分け結果						
サンプル番号	L V C R 穴の直径 (インチ)	流量 (mL/分)			25.0	
		L V C R	EtOAc	架橋	100 μm 未満の %	8.8 μm 未満の %
1	0.0135	28	89	70	27.9	40.2
2	0.0135	28	72	70	49.5	74.6
3	0.0135	31	72	70	17.9	64.0
4	0.0135	29	72	70	31.3	74.4
5	0.027	28	72	70	16.9	40.2
6	0.027	31	72	70	34.8	50.4
7	0.027	31	56	70	17.8	46.5
8	0.0135	14	62	70	49.5	95.7
9	0.0135	28	72	70	46.7	85.3

サンプル番号	L V C R 穴の直径 (インチ)	流量 (mL/分)			25.0	
		L V C R	EtOAc	架橋	100 μm 未満の %	8.8 μm 未満の %
1	0.0135	28	89	70	27.9	40.2
2	0.0135	28	72	70	49.5	74.6
3	0.0135	31	72	70	17.9	64.0
4	0.0135	29	72	70	31.3	74.4
5	0.027	28	72	70	16.9	40.2
6	0.027	31	72	70	34.8	50.4
7	0.027	31	56	70	17.8	46.5
8	0.0135	14	62	70	49.5	95.7
9	0.0135	28	72	70	46.7	85.3

40

表 5 の結果は、すべての場合に 15 % を越える粒子が 100 μm より大きく、場合によつ

50

て50%近くの粒子が直径100μmを越えていることを示している。この結果は、粒子サイズがLVC Rの口の直径にのみ依存するのではないことを示している。混合チャンバの内径、流量および内部乱流のような他のパラメーターが粒子サイズに影響する追加の要因であろう。

実施例3

ICAM-1/LVC R溶液用の架橋剤溶液としてイソプロピルアルコールを使用した。データは、架橋用溶液としてイソプロピルアルコールを用いて製造した微粒子がアセトンまたは他のアルコール類を使用して製造した微粒子より速やかに乾燥し、取扱いが良好であることを示している。

この実施例では、図4のロックで14mL/分のLVC R流量と65mL/分の酢酸エチル流量を使用した。充填されてない重合体溶液を用いると、充填されてない微粒子を5時間で45グラム（すなわち、0.16g/分の割合）製造することが可能であった。収集した45グラムのうち37.2グラム、すなわち83%が100μmより小さかった。100μmのスクリーンを通してふるい分けした粒子のHoriba装置による粒子のサイジングによるとメジアンサイズが47μmとなり、89%が100μm未満で、4.4%が10μm未満であった。すなわち、充填されてないLVC Rで、40~50μmの所望のメジアン直径サイズ範囲を有する粒子が得られた。

実施例4

ひとつの実験における本発明のシステムの寿命を試験するために、ICAM-1を含むLVC Rと含まないLVC Rを用いて一組の50グラムバルク実験を行なった。この実施例では、湿らせた（水分2.8%）酢酸エチルを乳化剤として使用し、1%（w/w）のLVC Rを用いた。LVC R流に対して設定した流量は15.5mL/分であり、酢酸エチルと架橋用溶液に対して設定した流量は70mL/分であった。LVC R溶液は10mMヒスチジンまたは10mMのTRISで緩衝し、ICAM-1を用いたときにはLVC R溶液には10重量%のICAM-1も2.3%（w/w）含ませた。

これらの実験の結果を以下の表6にまとめて示す。

表6

サンプル番号	緩衝液	架橋用溶液	理論ICAM-1充填率%	<100μmの製品の重量%
1	TRIS, 10mM	70/30 アセトン/EtOH	91	92
2	ヒスチジン, 10mM	70/30 アセトン/EtOH	81	94
3	ヒスチジン, 10mM	65/35 アセトン/EtOH	78	98
4	ヒスチジン, 10mM	65/35 アセトン/EtOH	67	86
5	ヒスチジン, 10mM	60/40 アセトン/EtOH	86	77
6	ヒスチジン, 10mM	60/40 アセトン/EtOH	93	50
7	ヒスチジン, 10mM	60/40 アセトン/EtOH	ICAMなし	92
8	ヒスチジン, 10mM	60/40 アセトン/EtOH	ICAMなし	76

この表6に示したように、ヒスチジンサンプルのICAM-1充填率はTRISサンプルと同じ範囲である。他のデータは、アセトンとエタノールの比が変化したときでも充填率が理論値の約80%にとどまっていることを示している。これらのサンプルのICAM-1充填率は理論充填率の75%以上で再現性がよかつた。

10

20

30

40

50

実施例 5

この実施例では、最初に真空オープン中で 12 時間または 3 日間乾燥したサンプルをそれぞれさらに 4 時間または 10 時間再度乾燥した。再乾燥後秤量し、室内環境で平衡に達するまで放置し、再度秤量した。これらの乾燥研究の結果を次の表 7 に示す。

表 7

第二の乾燥による損失

サンプル番号	初期乾燥時間	初期秤量中の r H %	第二乾燥時間	第二秤量中の r H %	第二乾燥における質量損失 %	平衡化後の質量損失 %	10
1	12 h	48	4 h	N/A	13.2	--	
2	12 h	48	4 h	N/A	12.9	--	
3	12 h	48	4 h	N/A	8.8	--	
4	3 日	30	10 h	33	3.1	-2.5	
5	3 日	30	10 h	33	-0.1	-7.4	
6	3 日	30	10 h	33	28.7	20.5	

最初に 12 時間乾燥したサンプルは再乾燥に際して水分を約 10 % 失った。しかし、これらのサンプルは最初湿潤条件（すなわち 48 % r H）下で処理したものであり、その処理中に受け取った水のみを失ったものとすることができよう。最初に 3 日間乾燥したサンプルはさまざまな結果を示した。場合によっては、第二の乾燥後ほとんど水損失がない場合が観察された。しかし、他の場合には第二の乾燥後かなりの重量損失が検出された。すべてのサンプルで室内条件で平衡に達した後微粒子の重量が増大した。

特定の方法と組成物に関して本発明を説明して来たが、本発明を考慮する際に変更および修正が当業者には自明であるものと理解されたい。

たとえば、ICAM-1 から誘導される小さめのタンパク質断片やペプチドであって、それでもウイルス結合部位を含有しているものは本明細書に記載したカプセル封入および送達に有効であろうということが分かる。

アルギネット微粒子に入れた t - ICAM - 453 に関して本発明の好ましい形態を説明したが、他のタンパク質やポリペプチドをアルギネット微粒子に充填するのに適していること、および、ICAM-1 をアルギネット以外の物質と共に使用することができる事が分かる。ICAM-1 を充填した微粒子を製造するための本発明の一般的な方法とシステムを用いて数多くの他の薬剤を充填した他の微粒子を製造することができるという事が分かる。

上記に例示した実施例で記載した本発明において数多くの修正と変形が当業者には自明であると期待され、したがって請求の範囲に明記した限定のみが以上の実施例に課せられるべきである。

したがって、請求の範囲には、請求している本発明の範囲内に入る均等な変形はすべて含まれるものとする。

10

20

30

40

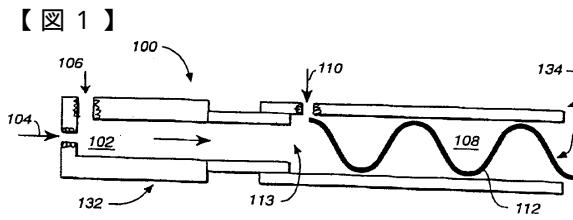


FIG. 1

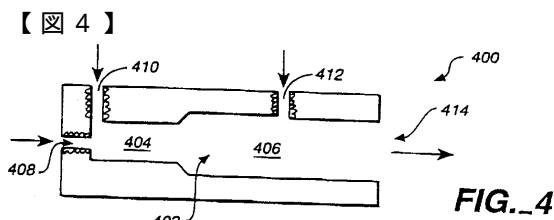


FIG.-4

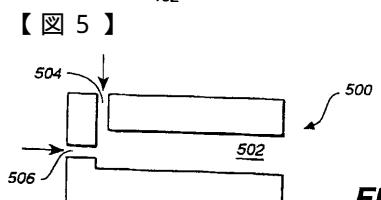


FIG. 5

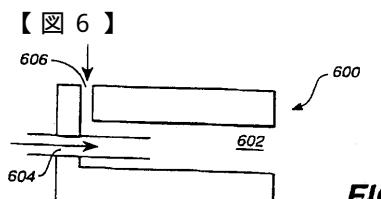


FIG.-6

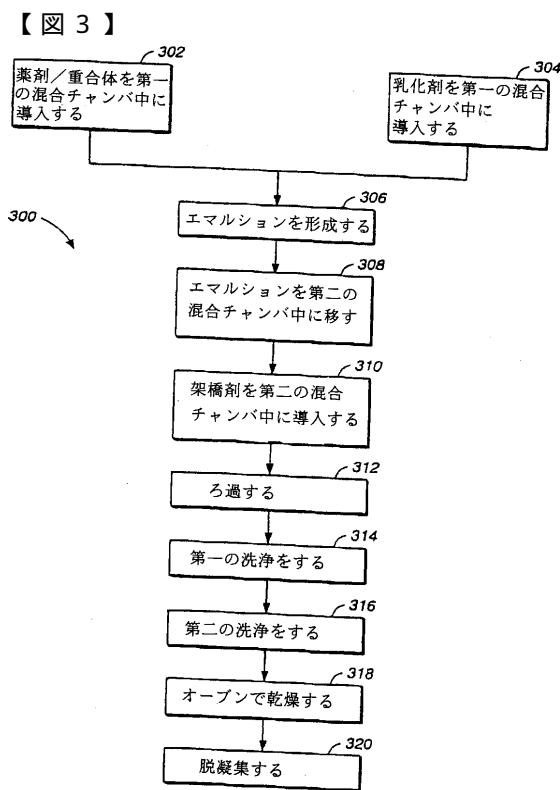


FIG._3

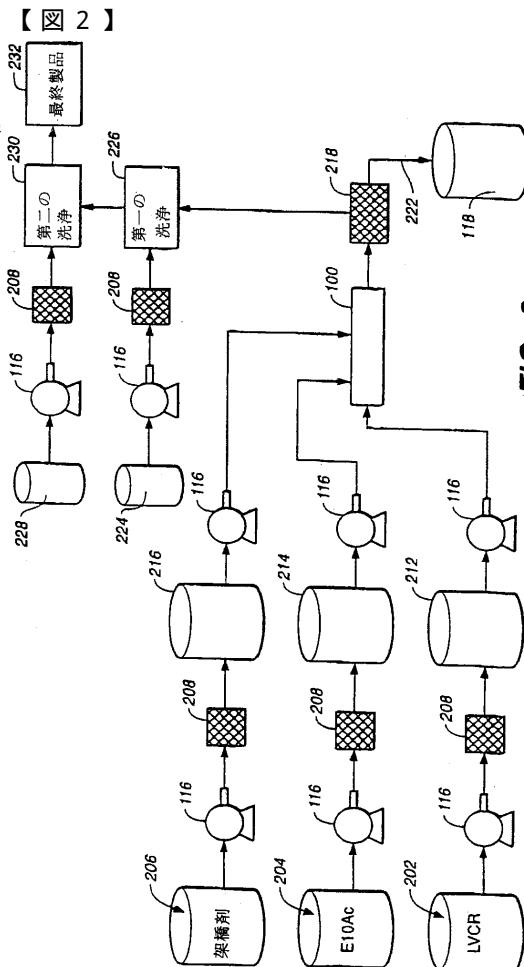


FIG. 2

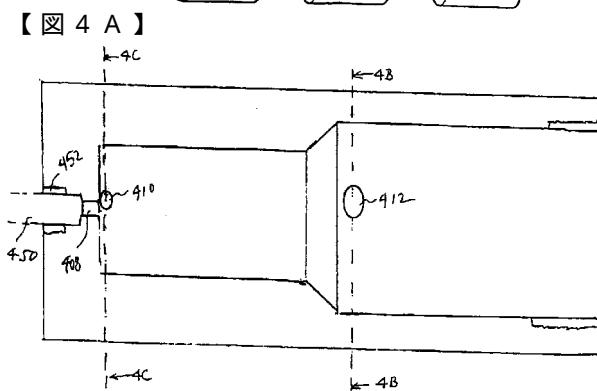


FIGURE 4A

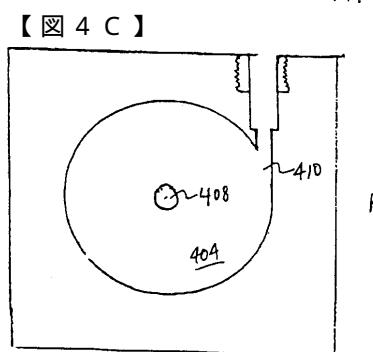


FIGURE 4C

【図 4 B】

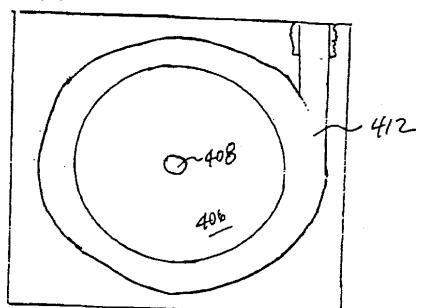


FIGURE 4B

フロントページの続き

(72)発明者 キャツ, ポール, ジー.

アメリカ合衆国 94306 カリフォルニア州, パロアルト, エマーソン ストリート 333
2

(72)発明者 スメドレー, マーク, アイ.

アメリカ合衆国 94404 カリフォルニア州, フォスター・シティ, カタマラン ナンバー2
655

(72)発明者 ステアーンズ, ポール, シー.

アメリカ合衆国 94061 カリフォルニア州, レッドウッドシティ, オーク アベニュー
506

審査官 斎藤 恵

(56)参考文献 国際公開第95/013799 (WO, A1)

特表平07-503001 (JP, A)

国際公開第95/002416 (WO, A1)

特開昭61-138529 (JP, A)

特開平07-047253 (JP, A)

特開平02-238892 (JP, A)

国際公開第93/006842 (WO, A1)

特開平01-135724 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 9/14

A61K 38/00

A61K 39/00

A61K 47/36