(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-514188
(P2005-514188A)
(43)公表日　平成17年5月19日(2005.5.19)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
B01D 9/02	B01D	9/02	602E	4C076
A61K 9/50	B01D	9/02	603A	4C084
A61K 9/72	B01D	9/02	608B	
A61K 38/28	B01D	9/02	614	
A61P 3/10	A61K	9/50		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 24 頁）　最終頁に続く

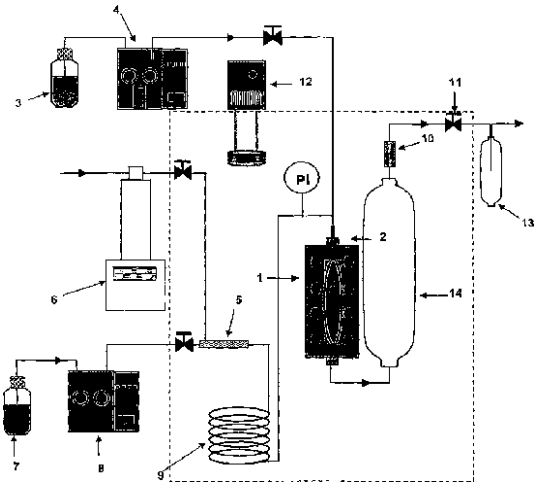
(21)出願番号　特願2003-548809 (P2003-548809)
(86)(22)出願日　平成14年12月6日 (2002.12.6)
(85)翻訳文提出日　平成16年6月4日 (2004.6.4)
(86)国際出願番号　PCT/AU2002/001657
(87)国際公開番号　WO2003/047553
(87)国際公開日　平成15年6月12日 (2003.6.12)
(31)優先権主張番号　PR 9382
(32)優先日　平成13年12月7日 (2001.12.7)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　504217465
エイフェル　テクノロジーズ　リミテッド
オーストラリア国　３０００　ビクトリア，　メルボルン，　マーケット　ストリート　５０，　レベル　１４
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　フォスター，　ネイル　ラッセル
オーストラリア国　２１２６　ニュー　サウス　ウェールズ，　チェリブルック，　ゴールデン　グローブ　９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】小粒子の合成

(57)【要約】
本発明は、沈殿チャンバ中で物質の微粒子を形成するための装置を提供し、そしてこの装置は、沈殿チャンバから、沈殿チャンバの下流の少なくとも一つの粒子収集チャンバに微粒子を運ぶための手段を有し、この粒子収集チャンバは、入口および入口とは別個の出口を有する。本発明はまた、物質の微粒子を形成するための方法を提供し、この方法は、物質を含む非ガス流体を高密度流体と接触して、沈殿チャンバ中で非ガス流体を拡散する工程、沈殿チャンバから収集チャンバに流体および微粒子の得られた混合物を運ぶ工程を包含し、ここで、この収集チャンバは、入口および入口とは別個の出口を有する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
沈殿チャンバ中で物質の微粒子を形成するための装置であって、ここで、該装置は、該沈殿チャンバの下流の少なくとも一つの粒子収集チャンバに該沈殿チャンバから該微粒子を運ぶための手段を有し、該粒子収集チャンバは、入口および入口とは別個の出口を有する、装置。
【請求項２】
請求項１に記載の装置であって、ここで、前記出口は、該装置の使用に際して前記入口の上に配置され、その結果重力は、該出口に隣接した粒子に対して、ほぼ該入口に向けて力を発揮する、装置。
【請求項３】
請求項１または請求項２に記載の装置であって、ここで、前記粒子は、前記沈殿チャンバ中で非ガス流体を拡散するため、高密度流体と該物質を含む非ガス流体とを接触させることによって形成される、装置。
【請求項４】
請求項１～請求項３のいずれか一項に記載の装置であって、さらに、互いに平行の少なくとも２つの粒子収集チャンバを備え、そしてそれぞれのチャンバは、前記沈殿チャンバと直列で接続され得る、装置。
【請求項５】
請求項４に記載の装置であって、ここで、第一収集チャンバは、前記沈殿チャンバからの粒子の、少なくとも第二収集チャンバへの流れを阻害することなく、該沈殿チャンバから断絶可能であり、その結果、次いで該第一収集チャンバ中に収集された前記微粒子は、該第一収集チャンバから回収可能である、装置。
【請求項６】
３つ以上の収集チャンバを有する、請求項５に記載の装置。
【請求項７】
請求項１～請求項６のいずれか一項に記載の装置であって、ここで、前記沈殿チャンバおよび前記各収集チャンバは、それらの温度を制御または維持するために水浴中に配置される、装置。
【請求項８】
請求項３～請求項７のいずれか一項に記載の装置であって、ここで、前記高密度流体は、逆溶剤および改変剤の混合物を含み、該改変剤は、逆溶剤の極性を改変する、装置。
【請求項９】
請求項３～請求項８のいずれか一項に記載の装置であって、ここで、前記高密度流体は、同軸のノズルを通って前記沈殿チャンバに入るより先に冷却され、そして前記物質を含む前記非ガス流体もまた、該同軸の吹き出し口を通って該沈殿チャンバに入る、装置。
【請求項１０】
物質の微粒子を形成する方法であって、該方法は、以下の方法：
沈殿チャンバ中で非ガス流体を拡散するため、高密度流体と該物質を含む非ガス流体とを接触させる方法、
収集チャンバに該沈殿チャンバから、流体および該微粒子の得られた混合物を運ぶ方法であって、該収集チャンバは、入口および入口とは別個の出口を有する、方法、
を包含する、
方法。
【請求項１１】
請求項１０に記載の方法であって、ここで、前記出口は、該装置の使用に際して入口の上に配置され、その結果、重力は、該出口に隣接した粒子に対して、ほぼ該入口に向けて力を発揮する、方法。
【請求項１２】
請求項１０または請求項１１に記載の方法であって、ここで、前記微粒子および前記高

密度流体は、前記収集チャンバの前記入口を通り、そして前記出口を通る流体の流れは、該収集チャンバから回収可能な微粒子の比率を最大化するために調節される、方法。

【請求項１３】

請求項１０～請求項１２のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記収集チャンバ内で、前記粒子は、一方向での流体の流れによって該粒子に対し発揮される力を受け、そして力は、第二力によって実質的にバランスを保たれる、方法。

【請求項１４】

請求項１３に記載の方法であって、ここで、前記第二力は、重力である、方法。

【請求項１５】

請求項１１～請求項１４のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記出口を通る流体の流れはまた、該流体と共に該出口を通って前記粒子が逃れることを最小化するため、そして／または該粒子の凝集および集塊を低減するために調節される、方法。

【請求項１６】

請求項１０～請求項１５のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度流体は、ｐＨが中性の溶媒である逆溶剤および／または比較的低極性の溶媒を含む、方法。

【請求項１７】

請求項１６に記載の方法であって、ここで、前記逆溶剤は、$C_{1\sim4}$アルカンガス、$C_{2\sim4}$アルケンガス、$C_{2\sim4}$アルキンガス、ヒドロフルオロカーボン、ＲＦ１３４ａのような冷媒またはヘキサンのような有機溶媒あるいはこれらの２つ以上である、方法。

【請求項１８】

請求項１６または請求項１７に記載の方法であって、ここで、前記逆溶剤は、非ガス流体の前記ｐＨを有意に変えない、方法。

【請求項１９】

ｐＨ感受性物質および生物学的活性物質の微粒子を形成するための、請求項１０～請求項１８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０】

請求項１０～請求項１９のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記非ガス流体は、水性溶液である、方法。

【請求項２１】

請求項１０～請求項２０のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度流体は、非ガス流体生物学的活性物質溶液の実質的に全ての非ガス流体を吸着するために十分な量で存在する改変剤を含む、方法。

【請求項２２】

請求項２１に記載の方法であって、ここで、前記改変剤は、前記逆溶剤の極性を改変し、そして／または前記非ガス流体について抽出溶媒（すなわち、溶媒）として働く、
方法。

【請求項２３】

請求項２１または請求項２２に記載の方法であって、ここで、前記改変剤は、$C_{1\sim6}$アルカノール、$C_{1\sim6}$チオールおよび$C_{1\sim6}$アミンからなる群から選択され得る、方法。

【請求項２４】

請求項１０～請求項２３のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度流体は、エタン／エタノールの、逆溶剤／改変剤の組み合せを有する、方法。

【請求項２５】

請求項１０～請求項２３のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記逆溶剤ガスおよび前記改変剤の両方は、前記ｐＨ感受性の生物学的活性物質に対し実質的に不活性である、方法。

【請求項２６】

請求項１０～請求項２５のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度流体は、－２０℃～約１００℃の範囲内、好ましくは約５℃～４５℃の範囲内である、方法

。
【請求項２７】
請求項１０～請求項２６のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度流体は、約１ｂａｒ～４００ｂａｒの範囲内、好ましくは約５ｂａｒ～２００ｂａｒの間の圧力を有する、方法。
【請求項２８】
請求項１０～請求項２６のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度ガスの前記圧力は、単一相として溶媒、逆溶剤および改変剤の混合物を維持するような圧力である、方法。
【請求項２９】
請求項１０～請求項２８のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、本発明の方法によって生成される微粒子の少なくとも半分、好ましくは実質的に全てが、１０，０００ｎｍ未満の粒子サイズを有する、方法。
【請求項３０】
請求項１０～請求項２８のいずれか一項に記載の方法によって生成される、生物学的活性物質の粒子を含む、薬学的組成物。
【請求項３１】
吸入送達、例えば、定用量吸入器または定用量噴霧器による送達に適切な形態の、請求項３０に記載の組成物。
【請求項３２】
被験体の処置の方法であって、該方法は、有効量の、請求項１０～請求項２８のいずれか一項に記載の方法によって生成される生物学的に活性物質の粒子を該被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項３３】
有効量の、請求項１０～請求項２８のいずれか一項に記載の方法によって生成されるインスリン粒子の投与によって、インスリン依存性糖尿病を処置するための方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（分野）
本発明は、薬学的または生物学的物質のような物質の微細粒子を、抗溶媒析出によって（特に、生物に対する投与に全く適さないが）形成および採取するための方法に関する。本発明は、また、この方法によって産生された生物学的物質の微細粒子および組成物（特に、活性物質を含む薬学的組成物）に関する。
【背景技術】
【０００２】
（背景）
書面、知識の行使または項目が、記載されるかまたは考察される本明細書を通じて他に記載のない限りは、この参照または考察は、書面、知識の行使または項目あるいはその任意の組み合わせが、優先日において慣例的な一般的知識の一部であったことを受け入れるものではない。
【０００３】
タンパク質のような脆い分子の均一なミクロンサイズの粒子（または、狭いサイズ範囲内の）の産生は、薬学工業において、課題である。微細粒子の１つの使用は、薬剤の肺からの吸収である。これは、いくつかの肺の疾患（例えば、気管支喘息）を含む多くの適応症のための導入の重要な経路である。この投与方法の１つの利点は、循環血に対するアクセスが、早いことである。なぜなら、表面領域が、大きいからである。血液への薬剤のほとんど瞬間的な吸収と同様に肺への送達は、肝臓の初期通過損失を避ける利点があり、また、肺疾患の場合において、所望の作用部位での局所的適用に利点がある。
【０００４】

肺への送達はまた、伝統的に薬剤の全身的な投与によって処置される状態の処置のための代替を提供し得る。タンパク質の投与は、この点における場合である。インスリンは、現在、注射によって投与される。なぜなら、インスリンは、胃腸器官系において不安定であるからである。糖尿病患者は、いくつかの注射を自己投与する必要がある。しかし、関連する不便さおよび痛みのために、注射の使用の許容を欠く。肺へのタンパク質の投与は、そのような患者により許容されるように見受けられ、そしてこのため、タンパク質が、微細粒子として形成され得る限りは、生物学的活性の有意な損失のない魅力的な代替物である。肺への治療的薬剤の投与のためのエアロゾル送達の使用についての一般的な基準は、薬物が生物学的活性を保つ間（明らかに）、約０．０５～１０μｍ（好ましくは、１～５μｍ）の範囲のサイズを有する粒子を有する粒子形態であり、物質構造が維持されることをしばしば要求する。そのような粒子の製造における一般的問題は、粒子サイズの許容不可能なバリエーションである。

【０００５】

微細粒子の形態の薬剤はまた、口内の領域における使用に適しており、制御された放出の送達であり、または徐放の送達である。そのような技術の１つの適用は、効果的薬剤と毒性の薬剤との間の投薬レベルにおける小さな差異のある薬剤の場合においてである。後者の技術において、粒子が、均一なサイズを有することはまた、重要である。

【０００６】

薬物の微細粒子の別の適用は、経皮薬剤の送達である。伝統的な皮下注射、静脈注射など以外の、新規の投与方法（薬物送達のための皮膚を介した、細かい溝を作るためのレーザー）が、使用される。従って、経皮的な高圧薬物送達を含む類似の機構がまた、使用されている。微細またはミクロンサイズの薬学的粒子のための適用が、増加している。

【０００７】

溶媒または抗溶媒として流体を使用する濃縮ガス技術は、それらの臨界点の近くかまたは上で、近年開発されている。２つの濃縮ガス法が、固体粒子の産生のために考えられている。第１の方法は、Ｒａｐｉｄ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ｏｆ　Ｓｕｐｅｒｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ（ＲＥＳＳ）として公知でありまた、それは、ノズルを介して目的の材料の超臨界溶液を拡張することを含む。いくつかの微細粒子を産生するための効果的な方法を提供する間、ＲＥＳＳ法の適用可能性は、濃縮二酸化炭素中のタンパク質の低い溶解性によって制限される。

【０００８】

第２に方法は、ガス抗溶媒プロセスとして公知であり、有機溶液から迅速に溶質を沈殿することを含み、代表的には、抗溶媒として濃縮二酸化炭素を使用する。抗溶媒は、溶液を拡散し、それによって溶媒の溶媒和力を減少し、そして結局は、溶質の沈殿を生じる。

【０００９】

ガス抗溶媒プロセスは、２つの方法においてミクロンサイズの粒子の生成のために使用されている。第１の方法は、簡単には、ガス抗溶媒プロセス（ＧＡＳ）として公知であり、沈殿が生じるまで、溶質を含む有機溶液に抗溶媒溶液を徐々に添加することを含む。第２の方法は、Ａｅｒｏｓｏｌ　Ｓｏｌｖｅｎｔ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＡＳＥＳ）として公知であり、流れる濃縮ガス蒸気にノズルを介して目的の溶質を含む溶液の連続的導入を含む。溶液が、濃縮ガスに噴霧される場合、高い程度の過飽和が、微細粒子の沈殿を生じる。一般に、このプロセスを使用した沈殿は、迅速であり、また、中間の操作温度および圧力を要求する。

【００１０】

このＧＡＳプロセスは、インスリン、リゾチームおよびペルオキシダーゼのミクロンサイズの粒子の生成のために試みられている。ｐＨ感受性タンパク質の微細化粒子の生成に対するこれらの技術を適用することの困難さは、それらが、有機溶媒に対するタンパク質の曝露を含み、後に潜在的変成剤になることである。これは、例えば不活性インスリンである。有機溶媒はまた、それらが処理するのがより困難であるので所望でない。従って、このプロセスは、非常に不適切である。

【００１１】
この制限を克服するための１つの試みにおいて、ＡＳＥＳプロセスの形態が、開発され、Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎ ｂｙ Ｓｕｐｅｒｃｒｉｔｉｃａｌ Ｆｌｕｉｄ（ＳＥＤＳ）と呼ばれる。ＳＥＤＳは、ＡＳＥＳプロセスを使用することを含むが、有機溶媒に対する曝露の問題を部分的に克服した特別な同軸ノズルを有する。
【００１２】
粒子産物を産生および採取するためのそれらのプロセスを利用する現代の装置（特に、ＡＳＥＳ）は、同じチャンバー内に、析出器および採取デバイスを含む。目的の産物を含む溶液および抗溶媒（これは、濃縮ガスおよび必要に応じて条件剤を含む）は、同時に沈殿チャンバーを通過する。粒子が形成した場合、それらは、重量下で採取デバイスの底に沈降し、そして、圧縮された形態、集塊された（ａｇｇｒｅｇａｔｅｄ）形態（物理的会合）または凝集された（ａｇｇｌｏｍｅｒａｔｅｄ）形態（化学的会合）になり得る。粒子はまた、プロセスの終わりの洗浄段階の間、例えば高圧および濃縮ガス抗溶媒の高い流量のために、さらに圧縮され得る。
【００１３】
集塊物は、２つ以上の粒子の採取が、弱い粘着力（例えば、ファンデルワールス力）によって一緒に保持された場合、起こる。集塊物は、せん断力および／または溶媒で分散され得る。一方、凝集は、２つ以上の粒子の採取が、強い粒子間力（例えば、結晶結合）によって一緒に保持された場合、起こる。凝集は、破壊および分散することがより困難である。
【００１４】
小粒子形成プロセスにおいて、粒子が、凝集物または圧縮物になることを避けることが所望される。なぜなら、この物質を破壊すること（特に活性成分に対する損傷を避けるながら）が困難であるからである。そのため、そのようなプロセスから生成した粒子は、サイズおよび形状が均一でなく、そのことは、薬学的適用においてそのような粒子の使用のために理想的でない。しかし、集塊のいくらかの度合いは、産生された粒子が採取されるには小さすぎるようないくつかの状況において、所望であり得る。集塊物を形成しなった微細粉末は、このシステム外へ洗い流され得、結果として低量が生成される。粒子の間の集塊は、採取するのにより大きくまた、より容易な粒子を生成し、そして集塊物の採取の後に機械的力によって破壊され得る。
【００１５】
薬物の肺送達のために使用される粒子は、理想的には直径５～１０μｍ未満である。このサイズの粒子は、より容易にエアロゾル化し、そして、吸引された場合、それらの粒子は容易に肺に到達し得る。しかし、粒子が採取チャンバー中で圧縮物となった場合、直径５μｍ未満（および、従って肺送達に適した）の粒子の量の比は、低い。
【００１６】
公知のシングルステージ装置を使用した採取プロセスは、ケーキング（すなわち、チャンバー排出口に詰まりを形成し得る微細粒子の集塊）が起こる前に沈殿粒子を取り除くための実行を調節的に停止する必要性のために本質的に短い実行時間を有するバッチプロセスである。従って、そのような装置を用いた粒子の産生は、必然的にバッチに関するプロセスである。このように、このプロセスは、効果的でなくまた、乏しい生成であり得また、産物の乏しい回収であり得る。
【００１７】
本発明は、粒子形成がより効率的な操作する（すなわち、開始材料と比較して、採取される微細粒子の生成の増加）そして装置を使用して形成される粒子を損傷しないかまたは、実質的に採取される平均粒子サイズを増加するための装置に関する。
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【００１８】

（発明の要旨）
第１の局面において、本発明は、沈殿チャンバー中に物質の微細粒子を形成するための装置（この装置は、微細粒子を沈殿チャンバーから析出チャンバーの下流の少なくとも１つの粒子採取チャンバーへと運搬するための手段を有し、粒子採取チャンバーは注入口および注入口とは別個の排出口を有する）を提供する。１つの実施形態において、排出口は、装置の使用において注入口の上に配置され、その配置は、重力が、注入口へほぼ向かう力を一般的に排出口の近傍にある粒子に働かせる。
【００１９】
粒子は、物質を含む非ガス性流体が濃縮ガスと接触することにより形成され、析出チャンバー中の非ガス性流体を拡張する。
【００２０】
本発明のさらなる形態において、装置はさらに、互いに平行な少なくとも２つの粒子採取チャンバーを備え、そして各々は、析出チャンバーと一連で結合され得る。
【００２１】
本発明はまた、物質の微細粒子の形成の方法を提供し、この方法は、物質を含む非ガス性流体と析出チャンバー中の非ガス性流体を拡張するための濃縮ガスとを接触させること、析出チャンバーから採取チャンバーに流体および微細粒子の生成した混合物を運搬することを含包し、この採取チャンバーは、注入口および注入口とは別個の排出口を有する。
【００２２】
１つの実施形態において、微細粒子が、濃縮ガスと共に粒子が形成される第１チャンバーから粒子の採取される第２チャンバーまで流れる方法が実施される。好ましくは、第２の採取チャンバーは、注入口および注入口と別個の排出口を有し、微細粒子および濃縮流体が注入口を通過し、排出口を介する濃縮流体の流れは、第２採取チャンバーから採取可能な微細粒子の割合を最大にするよう調整される。
【００２３】
本発明の局面において、装置が提供される（ここで、集塵機および採取器は、２つの別個のチャンバーであり、産生され得る微細粒子（狭い粒子サイズ分布）は、十分な量において採取可能である間、圧縮、集塊および凝集の問題によってほとんど影響されない。加えて、粒子が、先行技術の装置を使用して産生される粒子より細かい場合、および先行技術の装置における５μｍ未満の直径を有する粒子の質量比がより高い場合、十分な量が、入手可能である。また、本質的には、バッチプロセスは、不連続的に生成され得る。
【００２４】
別の局面において、本発明は、上述の方法のための装置を提供する。特に、以下を含む微細粒子の形成のための装置が提供される：
物質を含む濃縮流体および非ガス性流体は、微細粒子を析出するために接触させられる析出チャンバー；および
微細粒子の採取される析出チャンバーの下流の少なくとも１つの粒子採取チャンバー。
【００２５】
好ましくは、粒子採取チャンバーは、注入口および注入口とは別個の排出口を有し、微細粒子および濃縮流体は注入口を通過し、そして排出口を通過する濃縮流体の流れは、第２採取チャンバーから採取可能な微細粒子の割合を最大にするよう調整される。
【００２６】
交互に使用される平行な少なくとも２つの粒子採取チャンバーを備えることが、装置にとってまた、所望であり、満－空－満－空のサイクルにおける析出チャンバーの連続使用で各々直列である。
【００２７】
１つの実施形態において、採取デバイスまたは採取チャンバー内で、粒子は、１方向の濃縮ガスの流れによる粒子に働く力（この力は、一般に第２の力によって均衡を保たれている）によって大きく懸濁される。この第２の力は、重力（すなわち、粒子の重量）であり得、採取チャンバーは、採取チャンバーが粒子形成装置に結合（またはオンライン）さ

れる場合、排出口が注入口の上になるよう配置される。そのような力はまた、他の方法（例えば、採取チャンバーの適切な配列を有する遠心力、そしてそのような配置は、第２の均衡力のバリエーションを可能にする）によって生成され得る。粒子が荷電した場合、電磁気力が使用され得る。当業者に理解されるように、この目的は、運搬する流体の粒子に対する力の均衡を保つことであり、そうでなければ、粒子を採取チャンバーの一端に「ケーク」するか、および／または運搬する流体と共に排出口を介して排出するかのいずれかである傾向がある。

【００２８】

このため、新規に形成された粒子は、以前に形成された粒子の頂部上に「落ちる」ことなく、それらの形状を損ない得る圧力に供されずまた、凝集形成をほとんどさせない。

【００２９】

さらに、そのような装置の使用は、高い産量および実行あたりの粒子の再利用、より長い実行時間を有する実行あたりのより多い材料産生のための能力、より効率の良いプロセスおよびより多い産生能力を導くそれらの全て、可能にする。

【００３０】

そのような装置は、容易により多い材料の材料を産生するようスケールアップされ得る。

【００３１】

本発明の方法において使用される抗溶媒は、中性溶媒および／または比較的低極性の溶媒であるべきである。適切な溶媒としては、$C_{1\sim4}$アルカンガス、$C_{2\sim4}$アルケンガス、$C_{2\sim4}$アルキンガス、フルオロ炭化水素、冷却材、ＲＦ１３４ａ類似物、およびいくらかの有機溶媒（例えば、ヘキサン）、またはその２つ以上の挙げられる。１つの実施形態において、抗溶媒は、アルカンガスである。エタンは、特に好ましい抗溶媒である。好ましくは、抗溶媒は、非ガス性流体のｐＨを有意に変化させない。

【００３２】

本発明の方法は、物質の微細粒子を産生可能でありまた、ｐＨ感受性物質および生物学的に活性な物質の産生のために特に有用である。なぜなら、そのような物質の生物学的活性は、保持され得るからである。本発明の方法はまた、特に水溶性物質に適している。非ガス性流体は、１つの実施形態において水溶液である。

【００３３】

改変薬剤は、非ガス性流体－生物学的活性物質溶液の非ガス性流体の実質的に全てを吸収するのに十分な量において存在し得る。改変薬剤は、抗溶媒の極性を改変するあらゆる物質であり得、非ガス性流体についての抽出物（すなわち、溶媒）として作用する。改変薬剤は、$C_{1\sim6}$アルカノール、$C_{1\sim6}$チオールおよび$C_{1\sim6}$アミンからなる群から選択され得る。好ましくは、改変薬剤は、エタノールである。

【００３４】

本発明の１つの実施形態において、抗溶媒／改変薬剤の組み合わせは、エタン／エタノールである。

【００３５】

他の局面において、本発明は、「２重ステージ」プロセスにおける別個の採取チャンバーを使用することによる極性を変化させるための条件剤によって改変された中性溶媒の使用による先行技術から可能粒子よりも小さい粒子を提供し、特に、新規に形成される粒子のほとんどは、重力によって均衡を保たれる粒子に適応するチャンバーを介して流れる濃縮流体の力によってチャンバー内に懸濁され、粒子の集合および集塊を減少させる。

【００３６】

濃縮ガスは、種々の温度および圧力であり得る。好ましくは濃縮ガスの温度は－２０℃～約１００℃の範囲内であり、最も好ましくは、約５℃～約４５℃である。より低い温度は、粘性の増加を生じまた、質量移動性質を減少させ、そして、これは本方法の効率を減少させる。高い温度は、実行するためにより高価でありまた、物質を損傷し得る。好ましくは、濃縮ガスは、約１バール～約４００バールの範囲の圧力を有する。約５バールと約

２００バールとの間の圧力が、特に好ましい。最も好ましくは、濃縮ガスの圧力は、例えば、シングルフェーズが第２フェーズにおいて溶解したままであり得る沈殿物の損失を減少するので、溶媒、抗溶媒および条件剤の混合物を維持することであり、そしてシステムから洗浄される。

【００３７】

好ましくは、抗溶媒ガスおよび条件剤の両方は、実質的にｐＨ感受性生物学的活性物質に挿入される。

【００３８】

本発明の方法によって産生される粒子としてはまた、送達薬剤（例えば、リポソーム、脂質（リン脂質を含む）、水溶性ポリマー、制御された送達コーティング、界面活性剤、植物ステロールおよび当該分野において公知のあらゆる他の送達薬剤が挙げられる。

【００３９】

好ましくは、本発明の方法によって産生される微細粒子の少なくとも半分、およびさらに好ましくは実質的に全ては、１０，０００ｎｍ未満の粒子サイズを有する。さらに好ましくは、微細粒子は、６，５００ｎｍより大きくないサイズを有する。５，０００ｎｍまでの範囲のサイズを有する粒子は、肺の投与のために特に有用である。より小さい粒子が所望される場合、本発明の方法は、そのような粒子が採取困難でありかつ、自然に大きな粒子に凝集し得るけれども、ナノメーターサイズまで低くした粒子を産生し得ると考えられる。

【００４０】

活性物質の溶液は、任意の適した様式において濃縮ガスと接触され得る。好ましくは、溶液は小滴として濃縮ガスに導入される。例えば、溶液および濃縮ガスは、ノズルなどを介して同時に２つを噴霧することによって接触させられ得る。あるいは、溶液は、濃縮ガスを介して噴霧され得る。さらなる選択は、濃縮ガスの流れに対して同時にまたは反対方向に溶液を通過することである。溶液は、薄いフィルムの形態または多数の流れにおいて、濃縮ガスの連続体を通過させることであり得る。

【００４１】

好ましくは、本発明の方法は、ＡＳＥＳプロセスを使用して実施される。本明細書を通じて使用される用語「ｐＨ感受性生物学的活性物質」は、生物学的活性（例えば、酵素活性、チャネル機能（例えば、イオンチャネル）、レセプターまたは結合機能、ホルモン活性または神経伝達物質活性、あるいは他の薬学的活性を有する任意の天然物質または合成物質あるいは、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、ペプチドアナログまたはペプチドミメティックもしくは核酸またはタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドに関連する核酸のような）であって、通常の生理的ｐＨ範囲（例えば、６．８～７．５）の外のｐＨ（特に、低いｐＨ（例えば、５．０未満））によって有害に影響される物質をいう。ｐＨによって引き起こされる生物学的活性に対する有害な効果は、例えば、物質における分解、開裂または構造の変化、あるいは活性部位または結合ドメインの不活化を生じ得る。

【００４２】

ｐＨ感受性生物学的活性物質は、好ましくは、抗菌剤、ウイルス、抗ウイルス剤、抗真菌性薬剤、抗生物質、ヌクレオチド、ＤＮＡ、アンチセンスＤＮＡ、ＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、酵素、ホルモン、免疫抑制剤、プロテアーゼ阻害剤、血栓溶解性抗血液凝固剤、中枢神経系刺激剤、うっ血除去剤、利尿性血管拡張薬、抗精神病薬、神経伝達物質、鎮静薬、麻酔剤、界面活性剤、鎮痛薬、抗癌剤、抗炎症剤、抗酸化剤、抗ヒスタミン剤、ビタミン、ミネラル、ステロール、植物性ステロール、脂質および脂肪酸のエステルからなる群より選択される。

【００４３】

さらに好ましくは、ｐＨ感受性生物学的活性物質は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ペプチドアナログ、またはペプチド模擬物から選択される。最も好ましくは、ｐＨ感受性生物学的活性物質は、タンパク質インスリン、エリスロポエチン、カルシトニン、ＬＨＲＨ、ソマトスタチン、上皮増殖因子、ＤＮＡｓｅ血小板由来増殖因子、インターロ

イキン、インターフェロン、サイトカイン、免疫グロブリンのペプチド、ＴＮＦおよび他の生物学的活性ペプチド、ＴＮＦ阻害剤に基づくモノクローナル抗体ならびにサイトカインおよびインターロイキンの阻害剤に基づく抗体から選択される。

【００４４】

第２の局面において、本発明は、本発明の方法によって産生される生物学的活性物質の粒子を含む薬学的組成物を提供する。

【００４５】

薬学的組成物は、好ましくは吸入送達に適した形態（例えば、計量された用量の呼吸器または噴霧器）である。さらに、経皮性送達システムが、使用され得（例えば、レーザー生成または高圧皮膚チャネルを含む最近のデバイス）また、さらに伝統的な非経口投与が使用され得る。

【００４６】

第３の局面において、本発明は、被験体の処置の方法を提供し、この方法は、被験体に対する投与することを含み、生物学的活性物質の粒子の有効量は、本発明の方法によって産生される。

【００４７】

第３の局面の方法は、本発明の方法によって産生されるインスリン粒子の投与によるインスリン依存性糖尿病の処置であり得る。

【００４８】

本明細書において、用語「濃縮ガス」は、実質的にその臨界圧（Ｐｃ）および臨界温度（Ｔｃ）に近いかまたは越える流体を意味する。実施において、流体の圧力は、（０．５～１．５）Ｐｃの範囲でありまた、流体に温度は（０．５～１．２）Ｔｃの範囲であるようである。

【００４９】

本明細書において使用されるような用語「構成する（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」（またはその文法上の異形）は、用語「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」に等しくまた、他の要素または特徴の存在を排除するとして使用されるべきではない。

【００５０】

本発明の方法が、好ましい形態において、以下の利点の１つ以上を提供し得る：

１．狭い粒子サイズの分布を持つ、タンパク質および他の薬剤の細かい粉のかなりの収量を作製し、集める能力。

【００５１】

２．水溶液を用いる能力であって、これにより物質の濃縮溶液を生物学的活性の不活性化の最小の危険で加工し得る、能力。水溶液もまた、扱うのにより簡単でより安価である。

【００５２】

３．好ましい抗溶媒の１つである、エタンの使用が、タンパク質についての酸性のｐＨ環境、ｐＨ感受性または酸に不安定な分子に関する問題を克服する（エタンは中性である）。

【００５３】

４．エタン相における変性剤としてのエタノールのような有機化合物の使用は、作製される粉末（インシュリンを含む）の形態的な特質を高めるように見られる。いずれの特定の説により結びつけられることも望まないが、作製された粉末の形態的な特質はまた、接触の時の溶液の相対濃度、溶液が互いに接している期間、および粒子が沈殿の後互いに接している期間に依存しているようである。これらの変数は、結果を最適化する方法の使用の間、調節され得る。

【００５４】

５．上の３に記載したような抗溶媒のための変性剤としてエタノールのような物質を使用する能力が、９８％～１００％の生物学的活性が保たれている生物学的活性物質の微粒子をまだ作製する。

【００５５】
６．タンパク質または薬剤と一緒に共沈する場合、溶媒の流れまたは変性された抗溶媒の流れのいずれかにおいてさらなる成分を導入する能力は、溶解速度および／または生物学的利用能を高める。
【００５６】
７．超臨界に所望される温度より低い温度で、物質を加工する能力であって、これにより熱分解の危険を減少させる。
【００５７】
８．先行技術において特許請求された圧力よりも低い圧力で作用する能力であって、これにより加工の潜在的な費用を減少させる。
【００５８】
本発明がより容易に理解され得るために、例として以下の非限定的な実施形態を提供する。
【００５９】
上で述べられたタンパク質のいずれかについても適切である一方、本発明を例示する実施例は、所望される活性な成分としてインシュリンを用いて記載される。同様に、例示の目的のために、この実施例は、抗溶媒としてのエタンおよび変性剤としてエタノールの使用を記載する。低いエンドトキシンウシインシュリン（２８．５ＵＳＰ単位／ｍｇ、ロット番号４７Ｈ０５７３の凍結乾燥した粉末）および水酸化ナトリウムは、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓより購入し、そのままで、そして脱イオン化水中に溶解させて使用した。液体二酸化炭素およびエタン（工業的品質９９．９５％）は、ＢＯＣ　Ｇａｓｅｓより購入した。
【００６０】
ＡＳＥＳ装置（図１、図７および図８）のための機構は、それ自体集められ得る薬剤から作製された微粒子の割合を改善し、そして生成物の収量および回収を増加させるよう設計された。圧縮を最小化し、沈殿の微粒子質量（ＦＰＭ）分率を増加させるために、沈殿チャンバーと収集チャンバーとの間にフィルターを持たない二相の沈殿および収集チャンバー配置が使用された。沈殿物および抗溶媒は、沈殿チャンバーから（第２のまたは下流の）収集チャンバーへ、並行して通る。図８の実施形態は、２つの「並行な」収集チャンバーを有し、２つの収集チャンバーの間で交互にすることによって、連続的な（まとめてではなく）操作を可能にする。
【００６１】
用いられるＡＳＥＳ装置は、図１において概略的に示される。この装置は、ノズル２沈殿チャンバー１を備える。このノズルを通して、目的の物質の溶液および濃密ガスおよび変性剤を吹きかける。目的の物質の溶液が、ポンプ４によって容器３から沈殿チャンバーにポンプで押し出される。濃密ガスは、ポンプ６によって静止ミキサー５にポンプで押し出される。変性剤は、同時に、ポンプ８によって、容器７から静止ミキサー５にポンプで押し出される。所望されるエタンとエタノールの混合物は、静止ミキサー５において調製される。チャンバーは、シリンジポンプ（ＩＳＣＯ　Ｍｏｄｅｌ　５００）６を介して二酸化炭素で最初に加圧され、２０～１８０バールの圧力を達成し、エタン／エタノール混合物を一相として保つ。次いで、修飾されたエタンは、所望された加工条件で沈殿チャンバー１に送達され、CO_2は、系から取り除かれる。操作温度は、加熱器１２によって加熱される温度制御水浴を用いて±０．１℃以内で制御される。
【００６２】
静止ミキサーを離れて、濃縮ガス／変性剤混合物は、冷却コイル９を通り、続いて沈殿チャンバー１中へ進む。流体の流れは、沈殿チャンバーを通って、第２の高圧チャンバーである、粒子集合チャンバー１４へ続く。流速は、計量バルブ１１によって制御される。この装置は、水浴中に位置し、この水浴は、加熱器１２によって加熱されて、沈殿チャンバーおよび集合チャンバーの温度を制御し、保つ。この２つのチャンバーの間にフィルターはなく、フィルターは粒子集合チャンバーの下流にある。

【００６３】
沈殿チャンバーを通る流体の流れは、集合チャンバー１４の入口（図１に示されるように、集合チャンバー１４の底にある）を介して集合チャンバー１４に続く。次いで、この濃い流体は、集合チャンバーの出口を介してフィルター１０へ通る。この流速は、計量バルブ１１によって制御される。一旦バルブを通過すると、流体の流れは、低い温度で冷たいトラップまたはセパレーター１３を通過し、濃縮ガスから溶媒および変性剤を分離する。次いで、この濃縮ガスは、システムを介して再循環させられ得る。
【００６４】
一旦所望された温度および圧力（すなわち２５℃および１５０バール）が、チャンバー１において達成され、そしてこのチャンバーが、エタン中３０ｍｏｌ％エタノールの混合物で満たされると、タンパク質（低いエンドトキシンウシインシュリン（２８．５ＵＳＰ単位／ｍｇ、ロット番号４７Ｈ０５７３の、Ｓｉｇｍａから購入した凍結乾燥した粉末））を含む水溶液が、一定の流速で溶媒送達ユニット（Ｗａｔｅｒｓ　ｐｕｍｐ，Ｍｏｄｅｌ　５１０）４を用いて容器３からポンプでくみ上げられ、キャピラリーノズル２（５０ｕｍ内径）を介してチャンバーへ吹きかけられる。ノズルを介するこの圧力の低下は、計量バルブ２１によって約５０バールに調節された。この圧力低下は、加工の効率を最適化するよう調節され得る。修飾されたエタンは、計量バルブ１１で調節された一定の流速で、チャンバーに絶えず供給された。操作条件、水性供給物および抗溶媒の流速比、ならびに変性剤モル分率が最適化され（公開されたエタン、エタノールおよびCO_2についての公開された三相平衡データを用いて）、その結果、沈殿チャンバーにおいて、均一な（すなわち一相の）濃縮流体－エタノール－水の混合物を有する。
【００６５】
抗溶媒におけるエタノールのモル分率は、０．３に保たれ、０．４／１２の抗溶媒に対する供給物の体積測定の流速率は、加工中に用いられた。これは、システム、特に沈殿チャンバー中で、一つの均一相を保つために主に適合される。抗溶媒の高い流速は、分散およびチャンバーにわたる水を含んだ噴霧の分散および混合を容易にし、液滴からの水の抽出のより高い率を得る。
【００６６】
次いで、エアロゾル薬物送達システムに適切な均一な粒子サイズを有するタンパク質の微小化粒子が、効果的に１つの工程にて、室温で水溶液から作製された。有毒な化学薬品は使用されなかった。最終生成物における残渣のエタノール含有量は、１０ｐｐｍ未満だった。本発明の小さな微粒子物質は、特に経口の、制御された放出もしくは除放を供給するように、または吸入もしくは経皮投与および従来の方法のために、処方された薬学的調製物の調製に有用である。
【００６７】
図８は、２つの粒子集合チャンバー１４を組み込む修飾された設計図を示す。この装置は、図１および図７で記載されたように作動し、しかし一旦粒子集合チャンバーが、粒子の集合のために最適な容量まで満たされると、形成された粒子を含む濃縮ガスの流れは、第２の粒子集合チャンバーにそらされる。第１の粒子集合チャンバーからの粒子の除去は、装置、特に沈殿チャンバーが、まだ作動中の間に、引き起こされ得る。一旦第２の粒子集合チャンバーが容量まで満たされると、沈殿した粒子を含む濃縮ガスの流れは、第３の粒子集合チャンバーにそらされ得、またはこの時までに空になった第１の粒子集合チャンバーに戻り得る。この様に、この装置は、粒子の作製のために絶えることのない様式で作動し得る。
【００６８】
実験室スケールで、この見とおしの効く小室（例えば、Ｊｅｒｇｕｓｏｎ　ｓｉｇｈｔ　ｇａｕｇｅ，ｍｏｄｅｌ　１３－Ｒ－３２）が、図１に示されるような沈殿段階の視覚による観察のための沈殿チャンバーとして、用いられ得る。共通軸ノズル２は、溶液および抗溶媒を吹きかけるためにチャンバーに連結している。このノズルは、ステンレス鋼チューブ（Ａｌｌｔｅｃｈ，２．１６ｍｍ内径、３．１８ｍｍ外径）に挿入されたキャピラ

リーチューブ（ＳＥＧ，ＰＥＥＫチューブ２００ｍｍ長、５０μｍ内径、および１．５９ｍｍ外径）から成り立つ。このシステムにおける３つのポンプは、タンパク質溶液（Ｗａｔｅｒｓ　Ｍｏｄｅｌ　５１０）、エタノール（Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ，ｓｅｒｉｅｓ１０５０）ならびにエタンおよびCO_2のような抗溶媒（ＩＳＣＯ　Ｓｙｒｉｎｇｅ　ｐｕｍｐ　５００Ｄ）の送達のためである。抗溶媒は、静止混合機（ＫＯＦＬＯ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を用いてライン中でエタノールと混合された。混合物の組成は、各々のポンプの流速によって適合された。抗溶媒流速は、出口にて計測バルブによって制御された。エタノール／水／抗溶媒の混合物は、プロセスの作動圧力および作動温度にて均一の相に保った。二酸化炭素／エタノールの混合物を、予熱コイルに通して、システムの温度を得た。高圧チャンバーを、温度を調節する恒温加熱器（Ｔｈｅｒｍｏｌｉｎｅ　Ｕｎｉｓｔａｔ　ｈｅａｔｅｒ／ｃｉｒｃｕｌａｔｏｒ）から成り立つ水浴中に配置した。システムの圧力は、Ｄｒｕｃｋ圧力指示器に連結されたＤｒｕｃｋ圧力変換器（Ｍｏｄｅｌ　ＰＤＣＲ　９１１）でモニタリングした。抗溶媒および溶媒は、計量バルブの後で分離され、そしてこの溶媒は、チャンバー中に集められた。フィルターは、高圧チャンバーの後に配置され、ライン中に残る微粉末の全てを集めた。

【００６９】

（粒子の調製）

粒子の調製を、図１（上で考察された）に表された装置を用いて実行した。エタノールのエタンとの所望された混合物を、静止混合機５において調製する。チャンバーは、シリンジポンプ（ＩＳＣＯ　Ｍｏｄｅｌ　５００）６を介して二酸化炭素（装置の滅菌を促進する）で最初に加圧され、エタン／エタノール混合物を単一相として保つために２０バール～１８０バールの圧力を得る。次いで、修飾されたエタンを、１４０バールの圧力、３５℃の温度、および１５ｍＬ／分の流速で沈殿チャンバー１に送達し、そしてCO_2を、システムから除去する。操作温度（３５℃）を、加熱器１２によって加熱された温度制御水浴を用いて、±０．１℃内に制御した。

【００７０】

ＡＳＥＳプロセスによる微粒子への粉砕を、最初に水浴中に高圧チャンバーを配置し、システムの温度を調節することによって行なった。システムがこのプロセスの温度に近づいた後、システムの圧力を、頂部からチャンバーに抗溶媒を加えることによって調節した。次いで、抗溶媒流速を、出口での計量バルブによって調節した。次いで、所望されるエタノールの量を、各々のラインの流速を制御することによってシステムに加えた。抗溶媒としてCO_2を用いる場合、CO_2－２０ｍｏｌ％エタノール混合物を達成するために（すなわち、CO_2：エタノールモル比は１：４であった）、エタノールおよびCO_2それぞれ３．４ｍＬ／分および１５ｍＬ／分の流速が静止混合器を通った。抗溶媒としてエタンを用いる場合、エタン－３０ｍｏｌ％エタノール混合物を、エタンおよびエタノールについてそれぞれ、１５ｍＬ／分および２．４ｍＬ／分の流速を用いて調製した。

【００７１】

システムが定常状態に接近した後、０．１ｍＬ／分インシュリン溶液（１００ｍｇ／ｍＬ）を、内部ノズルを介して吹きかけた。この溶液は、抗溶媒の高流速に起因して分散した。水の抽出は、エタノールおよび微インシュリン粒子が形成されたことによって、小滴からは容易になった。一旦沈殿が始まると、出口（すなわち、集合チャンバー排出口のすぐ下流）にて計量バルブ１１を、調節し、その結果、集合チャンバーを介して上の方へ流れる濃縮ガスによって粒子集合チャンバー中で粒子に及ぼされた力が、粒子の重量（重力による）によってつり合いを保ち、その結果、この粒子は、集合チャンバー内で事実上懸濁し、そして圧縮されない。この効果は、１５～２０ｍＬ／分の流速で達成される。他の類似の計画が、企図され得る（例えば、軸の周りに回転し、集合チャンバーを通って流れる濃縮ガスの力に対する力を作り出す集合チャンバーのような）。沈殿チャンバーからの断絶の際に、集合チャンバーを、減圧し、そして生成物を、両方のチャンバーから集め、気密性容器に密封し、冷凍庫（－１８℃）中に蓄える。

【００７２】

全体の装置をシャットダウンする場合、吹きかける後、溶液エタノールおよび水の残渣を、集合チャンバーを介して操作圧力および操作温度でチャンバー容積の５等積のエタンを通すことにより、沈殿物から除去することが望ましいことが分かった。残る溶液の全てを取り除くために、少量のエタン（約１０～５０ｍＬ）もまたノズルを介してパージした。このプロセスは、ノズル中に残った水溶液の全ての小滴が、沈殿チャンバー中に落ち、沈殿した粒子と接触しそして粒子の密集を引き起こすことを防ぐために、システムの減圧前に必要である。

【００７３】

エタン／３０ｍｏｌ％エタノールを使用して水溶液から沈殿されたインシュリン粒子の特質における装置設計の効果が、２５℃および１５５バールにて試験された。これは、以下でさらに考察される。

【００７４】

エタン－エタノールを用いるインシュリンの加工が、モノマー含有量についてのインビトロ試験によって指示されるような生物学的活性の保存を提供することが、示されている。CO_2－エタノールで加工されたインシュリンは、この点で重大な不活性化を経た。単一段階（先行技術）装置において、CO_2－エタノールの粒子の特質およびエタン－エタノールで加工された物質は、表１に示されるのと同様である。二段階プロセス（上ならびに図１、図７および図８で例示された）においてCO_2－エタノールシステムについての微粒子質量は、一段階プロセスについて得られるものと同様である。このパラメーターにおける劇的な増加が、エタン－エタノールで加工された物質について得られた。

【００７５】

【表１】

表　１　一段階および二段階の作製単位ユニットからのデータ

	一段階		二段階	
反溶媒	$D_{(0.5,V)}$	FPM(%)	$D_{(0.5,V)}$	FPM(%)
エタン－エタノール	12.8 +/-1.0	20.0	4.8 +/-0.4	43.5
CO_2－エタノール	11.8+/-1.6	20.3	8.2 +/-0.6	23.1

$D_{(0.5,V)}$　体積に基づく中間の粒子サイズ（すなわち、この値未満に粒子の５０％が存在する）

ＦＭＰ（％）　微粒子質量（カスケードインパクター試験に従う５μｍ未満の粒子の質量分率）

$D_{(0.5,V)}$におけるいくらかの減少は、２段階CO_2－エタノール加工方法で生じるが、この物質のわずか２１．９％が、分散されて５μｍ空気力学的直径未満の物質を作製し得る。２段階エタン－エタノール加工を用いて得られた物質は、劇的に減少した$D_{(0.5,V)}$を有し、これは表１に示されるように５μｍ未満の空気力学的直径物質の量の１００％増加に一致する。

【００７６】

別の比較として、インシュリンが、ナノサイズ化粒子として第１の段階の装置中で沈殿し、そのほとんどは、図１に表された装置を用いて５０ｎｍ～５００ｎｍのサイズに及んでいた。粒子サイズの分布の研究は、粒子が、集まってミクロンサイズの粒子を形成することを示した。沈殿したミクロン化（ｍｉｃｒｏｎｉｓｅ）粉末の微粒子質量は、わずか２０％であった。粒子を、チャンバーの底でフィルターアセンブリ上に集めた。抗溶媒の高圧および高流速に一部起因して、粉末は、密集され、分散するのが困難であった。集まらなかった微粒子を、フィルターを通すことによってシステムから洗い流し、従って収量

は、低かった（４０％）。

【００７７】

インシュリンもまた、図１に示された装置を用いて５０ｎｍ～５００ｎｍのサイズに及んでいたナノサイズの粒子として沈殿した。改変されたＡＳＥＳ装置によって加工されたインシュリンの微粒子質量は、４５％まで増加した。第１のチャンバーの底でフィルターを、除去し、より密集していない沈殿を作製する。沈殿が、沈殿チャンバーから下方に動き、抗溶媒（濃縮流体）の流れの方向と反対に重力が作用する集合チャンバーを通る途中で上を向いて運ばれ、チャンバー中で粒子を懸濁させ、このことが密集を最小化する。第２の（すなわち、粒子収集）チャンバーを加えることで微粒子質量の改善された回収および９０％まで増加した収量を可能にした。図２は、一チャンバーおよび二チャンバー装置におけるインシュリン粉末の空気力学的粒子サイズ分布を示す。

【００７８】

インシュリンの生物学的活性が粒子形成プロセス後保たれかどうかを決定するために、インシュリン粉末の生化学的一体性が、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて評価された。ｐｒｏｔｅｉｎ－Ｐａｋ１２５カラム（Ｗａｔｅｒｓ，ＵＳＡ）が、インシュリンのために使用された。移動相は、３００ｍＭの塩化ナトリウムを含むｐＨ３の５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液から成り立った。

【００７９】

粉末のサンプルを、溶解して、完全に溶解するために１０分間穏やかに振ることによって、脱イオン化水中１ｍｇ／ｍＬ溶液を調製した。上澄み液を、０．４５ｍｍ膜フィルターで濾過して、続いてＨＰＬＣカラムに注入した。モノマーおよび可溶集合体のパーセンテージは、標準濃度１ｍｇ／ｍＬのピーク面積を持つサンプル中のモノマーおよび高分子量の可溶種両方のピーク面積を比較することによって決定した。ソフトウェアＭｉｌｌｅｎｎｉｕｍ３．５は、モノマー含有量の定量において用いられた。インシュリンのＨＰＬＣスペクトルは、図３に示される。サンプルのモノマー含有量は、９９．５％であり、従って、生物学的活性の維持がほとんど完全であったことを例示するインビトロ測定を提供した。

【００８０】

プロセスにより脱アミド化されたインシュリンのパーセンテージを決定するために、インシュリンの試験を、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を用いて実施した。逆相カラム（Ｓｙｍｍｅｔｒｙ（登録商標）C_{18}，５μｍパッキング，４．６ｍｍ×１５０ｍｍ）を、非脱アミド化インシュリンから脱アミド化インシュリンを分離するために用いた。傾斜法を、０．１％トリフルオロ酢酸／アセトニトリル２６％～３３％の溶離液および１ｍＬ／分の流速で用いた。吸光度を、２８０ｎｍでモニタリングした。脱アミドインシュリンのパーセンテージを、分解生成物のピーク面積を、同じ濃度のインシュリン（２ｍｇ／ｍＬ）を含む標準インシュリンの面積と比較することによって、決定した。インシュリンおよびデアミドインシュリンの分離についてＨＰＬＣクロマトグラムは、図４に描かれる。ＨＰＬＣクロマトグラムから決定された脱アミドインシュリンのパーセンテージは、３．０であり、従って、沈殿による微粒子化の後の生物学的活性および分子の化学的一体性の維持についてのさらなるインビトロでの証拠を提供する。

【００８１】

ＳＥＭ画像（図５）は、インシュリンが、２００ｎｍ～５００ｎｍのサイズにわたるナノサイズ粒子として沈殿したことを示した。これらの微インシュリン粒子は、分子間の分子間相互作用に起因して、集合してより大きな粒子を形成し得る。レーザー回折研究による粒子の分析は、インシュリン粉末が、集合し、５μｍ（５０００ｎｍ）の中間の粒子サイズを有したことを示した。

【００８２】

収集された微タンパク質粒子のエアロゾルの挙動を決定するために、粒子のインビトロの試験が、１０．０μｍ、５．０μｍ、２．５μｍ、１．２５μｍ、および０．６２５μｍのカットオフ直径を有する５段階Ｍａｒｐｌｅ－Ｍｉｌｌｅｒ　Ｉｍｐａｃｔｏｒ（Ｍ

ｏｄｅｌ １６０，ＭＳＰ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，ＵＳＡ）を用いて評価された。このＭａｒｐｌｅ－Ｍｉｌｌｅｒ ｉｍｐａｃｔｏｒは、ステンレス鋼入口開口部、５つの衝撃ステージおよび一体型フィルターステージから成り立った。これらのステージを、粒子の反射を防ぐためにプロピレングリコール／メタノール（５０：５０）で前もってコーティングし、これによって、粗大な粒子をより低いステージに持ち越す可能性を最小化した。

【００８３】

１０ｍｇ～２０ｍｇの質量のインシュリンを、ゼラチンカプセル（ｓｉｚｅ３，Ｐａｒｋ Ｄａｖｉｓ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）中に量り分け、そしてすぐに粉末吸入デバイス、Ｄｉｎｋｉｈａｌｅｒ（Ａｖｅｎｔｉｓ，Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）によって、６０Ｌ／分で真空源（ＥＲＷＥＫＡ ＧＭＢＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いてＭａｒｐｌｅ Ｍｉｌｌｅｒ Ｉｍｐａｃｔｏｒ中に分散した。各々の段階で回収されたタンパク質の割合を、標準１％インシュリン溶液の吸光度に対してタンパク質溶液の吸光度を測定することによって計算した。このアッセイ法（１％溶液の相対的ＵＶ吸収の測定）およびインシュリンについての標準曲線の結果を、表２に示す。

【００８４】

【表２】

表 2タンパク質アッセイ方法および標準曲線から決定される吸光率の値

ﾀﾝﾊﾟｸ質	アッセイ方法	標準曲線
ｲﾝｼｭﾘﾝ	275 nmでのUV吸光度	$A_{1\%}$ = 9.0
		濃度範囲 = 0.01-0.1 %

ナノサイズの粒子として沈殿したインシュリンもまた、ミクロンサイズの粒子に集まった。図６に示されるように、（レーザー回折によって決定された）中間の粒子サイズは、約５μｍであり、そしてＭａｒｐｌｅ Ｍｉｌｌｅｒ Ｉｍｐａｃｔｏｒによって決定された微粒子分率（％＜５μｍ）は、少なくとも４２％であった。達成された微粒子質量（ＦＰＭ）は、文献中に報告された値と比べて著しく大きい。他の方法から得られたインシュリンについての最大ＦＰＭは、１０％であった。

【００８５】

本明細書中で開示され、定義された本発明は、個々の述べられたかまたは本文もしくは図からの明らかな特徴の２つまたはそれ以上の全ての代替の組み合わせに及ぶことが理解される。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の種々の代替の局面を構成する。

【図面の簡単な説明】

【００８６】

【図１】図１は、本発明の実験室スケールの実施形態を例示し、この実施形態は、「二段階」装置と呼ばれる、分離した粒子収集チャンバーを有する。

【図２】図２は、二酸化炭素中２０ｍｏｌ％のエタノールおよびエタン中の３０ｍｏｌ％のエタノールを用いて２５℃および１５０バールで沈殿したインシュリン粒子の空気力学的粒子サイズ分布を比較するグラフを示す。

【図３】図３は、インシュリンモノマーのＨＰＬＣクロマトグラムを示す。

【図４】図４は、インシュリンおよび脱アミドインシュリンの分離についてのＨＰＬＣクロマトグラムを示す。

【図５】図５は、インシュリン粒子のＳＥＭを示す。

【図６】図６は、インシュリン粉末の空気力学的粒子サイズ分布を表すグラフを示す。

【図７】図７は、図１に類似の本発明の工業的スケールの実施形態を例示する。この実施

形態は、「二段階」装置とも呼ばれる分離した粒子収集チャンバーを有する。
【図８】図８は、本発明の別の実施形態を記載する。この実施形態は、１つより多い粒子収集チャンバーを有する装置である。

【図１】

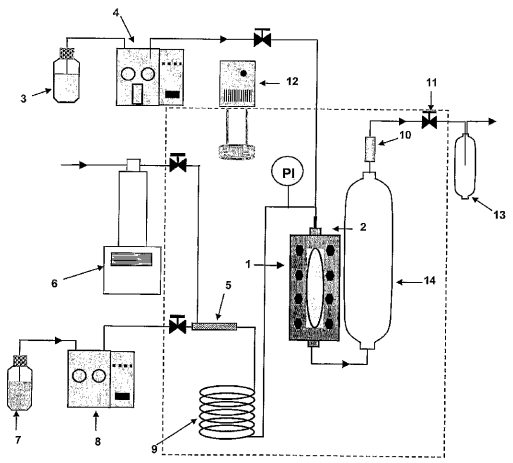


Figure 1

【図２】

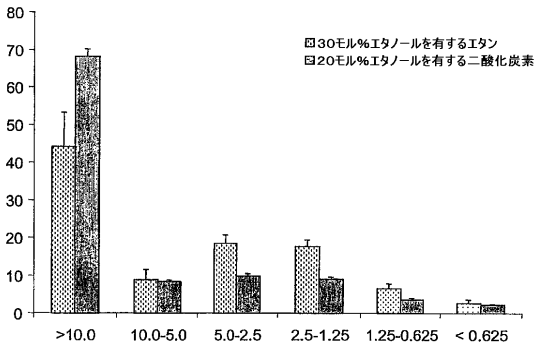


Figure 2

【図３】

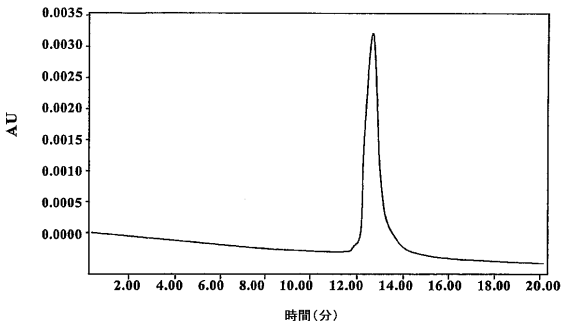


Figure 3

【図４】

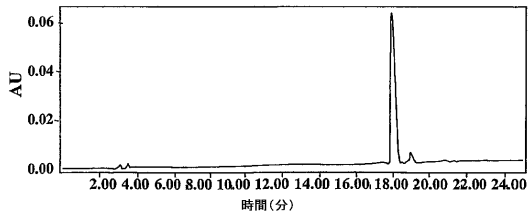


Figure 4

【図５】

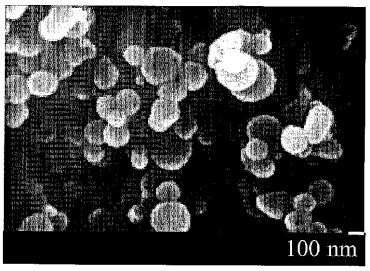


Figure 5

【図６】

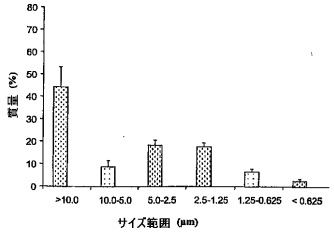


Figure 6

【図７】

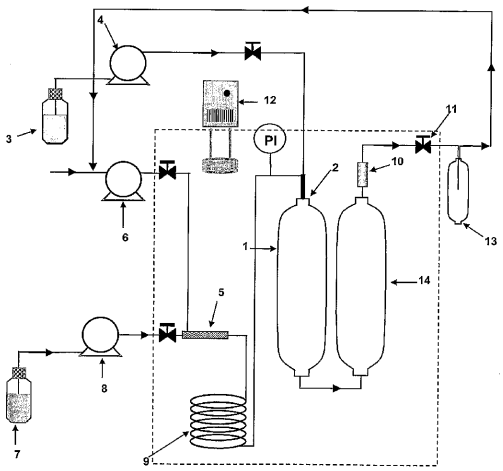


Figure 7

【図８】

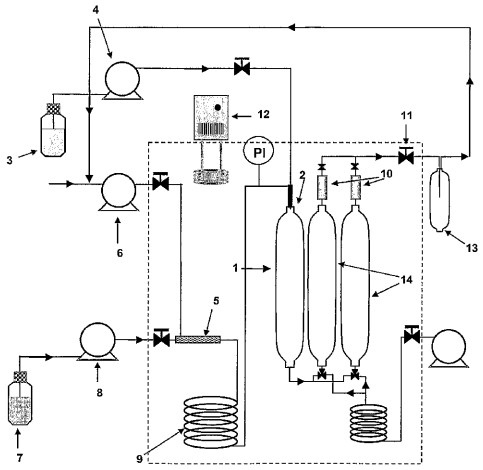


Figure 8

【手続補正書】
【提出日】平成16年6月29日(2004.6.29)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
沈殿チャンバ中で物質の微粒子を形成するための装置であって、ここで、該装置は、該沈殿チャンバの下流の少なくとも一つの粒子収集チャンバに該沈殿チャンバから該微粒子を運ぶための手段を有し、該粒子収集チャンバは、入口および入口とは別個の出口を有し、該装置は、使用に際し、該粒子収集チャンバの中に該粒子を運ぶ、該微粒子に対して第一力を発揮する運搬流体を有し、該収集チャンバは、第二平衡力が、該出口に隣接した微粒子に対して、ほぼ入口に向かって発揮されるように適応されるという点で特徴付けられる、装置。
【請求項２】
請求項１に記載の装置であって、ここで、前記出口は、前記入口の上に配置され、そして前記第二力は、重力である、装置。
【請求項３】
請求項１または請求項２に記載の装置であって、ここで、前記粒子は、前記沈殿チャンバ中で非ガス流体を拡散するため、高密度流体と前記物質を含む非ガス流体とを接触させることによって形成される、装置。
【請求項４】
請求項１～請求項３のいずれか一項に記載の装置であって、さらに、互いに平行の少なくとも第一および第二粒子収集チャンバを備え、そしてそれぞれのチャンバは、前記沈殿チャンバと直列で接続され得、ここで、該第一収集チャンバは、該沈殿チャンバからの粒子の、少なくとも第二収集チャンバへの流れを阻害することなく、該沈殿チャンバから断絶可能であり、その結果、次いで該第一収集チャンバ中に収集された前記微粒子は、該第一収集チャンバから回収可能である、装置。
【請求項５】
請求項３～４のいずれか一項に記載の装置であって、ここで、前記高密度流体は、逆溶剤および改変剤の混合物を含み、該改変剤は、逆溶剤の極性を改変する、装置。
【請求項６】
物質の微粒子を形成する方法であって、該方法は、以下の方法：
沈殿チャンバ中で非ガス流体を拡散して、該微粒子を形成するため、高密度流体と該物質を含む非ガス流体とを接触させる工程、
運搬流体によって粒子収集チャンバに該沈殿チャンバから、流体および該微粒子の得られた混合物を運ぶ工程であって、該粒子収集チャンバは、入口および入口とは別個の出口を有し、ここで、該運搬流体は、該高密度流体および該非ガス流体を含み、該粒子収集チャンバ中に該粒子を運ぶために、該微粒子に対して第一力を発揮し、該収集チャンバは、第二平衡力が、該出口に隣接した該微粒子に対してほぼ入口に向かって発揮されるように適応される、工程、
を包含する、
方法。
【請求項７】
請求項６に記載の方法であって、前記収集チャンバの前記出口は、前記入口の上に配置され、そして前記第二力は、重力である、方法。
【請求項８】
請求項６または請求項７に記載の方法であって、ここで、前記微粒子および前記高密度

流体は、前記収集チャンバの前記入口を通り、そして前記出口を通る流体の流れは、該収集チャンバから回収可能な微粒子の比率を最大化するため、そして該流体と共に該出口を通って前記粒子が逃れることを最小化するため、そして／または該粒子の凝集および集塊を低減するために調節される、方法。

【請求項９】

請求項６～請求項８のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度流体は、非ガス流体生物学的活性物質溶液の実質的に全ての非ガス流体を吸着するために十分な量で存在する改変剤を含む、方法。

【請求項１０】

請求項９に記載の方法であって、ここで、前記改変剤は、前記逆溶剤の極性を改変し、そして／または前記非ガス流体について抽出溶媒として働く、
方法。

【請求項１１】

請求項９～請求項１０のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記非ガス流体および前記改変剤の両方は、前記物質に対し実質的に不活性である、方法。

【請求項１２】

請求項６～請求項１１のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記高密度流体の前記圧力は、前記物質および単一相として高密度流体を含有する非ガス流体の混合物を維持するような圧力である、方法。

【請求項１３】

請求項６～請求項１２のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、本発明の方法によって生成される微粒子の少なくとも半分、好ましくは実質的に全てが、１０，０００ｎｍ未満の粒子サイズを有する、方法。

【請求項１４】

請求項６～請求項１３のいずれか一項に記載の方法によって生成される、生物学的活性物質の粒子を含む、薬学的組成物。

【請求項１５】

吸入送達、例えば、定用量吸入器または定用量噴霧器に適切な形態の、請求項１４に記載の薬学的組成物。

【請求項１６】

請求項１４または請求項１５に記載の薬学的組成物であって、ここで、前記生物学的活性物質は、インスリンである、薬学的組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU02/01657

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. [7]: A61K 9/50, 9/14, 51/02, B01D 11/02, B01J 2/02

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)
A61K 9/50, 9/14, 51/02, B01D 11/02, B01- --/--

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
DWPI IPC+KEYWORDS (supercritical, antisolvent, particle, chamber, collect)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	WO 01/43845 A (SEPAREX) 21 June 2001	
X Y	See entire document	1, 3-6, 10 2, 4-5, 7
	WO 00/37169 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 29 June 2000	
X Y	See entire document	1-3, 8-33 2, 4-5, 7
	GB 2322326 A (BRADFORD PARTICLE DESIGN LIMITED) 26 August 1998	
X	See entire document	1, 3, 8-10, 13-14, 16-33

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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 application or patent 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
9 January 2003

Date of mailing of the international search report
13 JAN 2003

Name and mailing address of the ISA/AU

AUSTRALIAN PATENT OFFICE
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au
Facsimile No. (02) 6285 3929

Authorized officer

R.P. ALLEN
Telephone No : (02) 6283 2134

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU02/01657

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/49407 A (SEPAREX) 12 July 2001 See entire document	1, 4-5
Y	WO 97/31691 A (THE UNIVERSITY OF KANSAS) 4 September 1997 See figure 1	7
A	US 6063910 A (DEBENEDETTI et al.) 16 May 2000	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/AU02/01657

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
WO	200143845	EP	1242153	FR	2802445		
WO	200037169	AU	200018761	EP	1169117		
GB	2322326	AU	62998/98	EP	961651	US	6440337
		WO	9836825	ZA	9801432		
WO	200149407	EP	1244514	FR	2803539		
WO	9731691	AU	21936/97	CA	2247900	EP	885038
		US	5874029	US	5833891		
US	6063910	AU	28310/92	CA	2083027	EP	542314
		JP	5293361				

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
	Ａ６１Ｋ　9/72	
	Ａ６１Ｐ　3/10	
	Ａ６１Ｋ　37/26	

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

(72)発明者　レグトップ,　ヒューバート　レオナーダス
オーストラリア国　２５７５　ニュー　サウス　ウェールズ,　ミッタゴング,　マーチソン　ストリート　１８
(72)発明者　ダーハニ,　ファリバ
オーストラリア国　２０１８　ニュー　サウス　ウェールズ,　ローズベリー,　ダルメニー　アベニュー　８／８３

Ｆターム(参考)　4C076 AA61 BB27 CC30 GG30 GG32
4C084 AA03 BA44 DB34 MA01 MA05 MA38 MA59 NA11 ZC032 ZC352