

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-226648

(P2017-226648A)

(43) 公開日 平成29年12月28日(2017.12.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/04	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-114707 (P2017-114707)
 (22) 出願日 平成29年6月9日(2017.6.9)
 (31) 優先権主張番号 特願2016-120890 (P2016-120890)
 (32) 優先日 平成28年6月17日(2016.6.17)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

申請有り

(71) 出願人 515093504
 SonoCore株式会社
 東京都千代田区丸の内2-5-2 三菱ビル7F
 (71) 出願人 598015084
 学校法人福岡大学
 福岡県福岡市城南区七隈8丁目19番1号
 (74) 代理人 100137095
 弁理士 江部 武史
 (74) 代理人 100091627
 弁理士 朝比 一夫
 (72) 発明者 立花 克郎
 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号
 学校法人福岡大学内

最終頁に続く

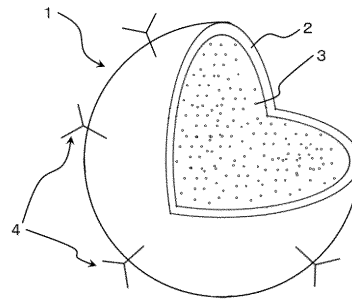
(54) 【発明の名称】 分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】本発明の目的は、血液中で安定的に分子標的薬を保持しつつ、目的の患部に確実に運搬することができる分子標的薬バブルを提供することである。また、別の目的は、かかる分子標的薬バブルを安定かつ容易に製造することができる分子標的薬バブルの製造方法を提供することである。

【解決手段】本発明の分子標的薬バブルは、アルブミンを主成分とする外殻材料で構成された外殻と、該外殻に付着し、標的の分子を特異的に認識する分子標的薬とを含む。外殻材料中のアルブミンの含有量は、50～100wt%であるのが好ましい。また、分子標的薬としては、分子量が300～500程度の低分子量の化合物で構成される低分子薬や、分子量が数万～数十万程度のタンパク質で構成される抗体薬(モノクローナル抗体薬)を用いることができる。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルブミンを主成分とする外殻材料で構成された外殻と、
該外殻に付着し、標的の分子を特異的に認識する分子標的薬とを含むことを特徴とする
分子標的薬パブル。

【請求項 2】

前記外殻材料中の前記アルブミンの含有量は、50～100wt%である請求項 1 に記
載の分子標的薬パブル。

【請求項 3】

前記アルブミンと前記分子標的薬との重量比率は、1000：1～1：1である請求項
1 または 2 に記載の分子標的薬パブル。

10

【請求項 4】

前記分子標的薬は、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、オ
ゾガマイシン、アレムツズマブ、イブリツモマブ、チウキセタン、トシツモマブ、ペバシ
ズマブ、パニツムマブ、オフアツムマブ、デノスマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブ
、ベドチン、モガムリズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、エムタンシン、ラムシル
マブ、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、プリナツモマブ、ジヌツキシマブ、ダラツムマブ
、ネシツムマブ、エロツズマブからなる群から選択される少なくとも 1 種を含む請求項 1
ないし 3 のいずれかに記載の分子標的薬パブル。

【請求項 5】

前記パブルは、前記外殻内に封入されたガスをさらに有する請求項 1 ないし 4 のいずれ
かに記載の分子標的薬パブル。

20

【請求項 6】

前記ガスは、亜酸化窒素、酸素、水素、ヘリウム、メタン、エタン、プロパン、ブタン
、ペンタン、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、エチレン、プロピレン、
プロパジエン、ブテン、アセチレン、プロピン、パーフルオロプロパン、パーフルオロブ
タン、パーフルオロペンタンからなる群から選択される少なくとも 1 種を含む請求項 5 に
記載の分子標的薬パブル。

【請求項 7】

アルブミンを主成分とする外殻材料を含む第 1 の溶液と、標的の分子を特異的に認識す
る分子標的薬を含む第 2 の溶液とを準備する工程と、

30

前記第 1 の溶液を、容器の所定の高さまで注入する工程と、

前記第 1 の溶液が前記容器の内面に繰り返し衝突するように、所定の回転数で前記容器
を振動させる工程と、

振動後の前記第 1 の溶液と前記第 2 の溶液とを混合して、混合液を得る工程とを有する
ことを特徴とする分子標的薬パブルの製造方法。

【請求項 8】

前記容器を振動させる工程は、5000rpm以上の回転数で行われる請求項 7 に記載
の分子標的薬パブルの製造方法。

【請求項 9】

前記容器を振動させる工程は、前記容器内を 1.0atm より大きい圧力にした状態で
行われる請求項 7 または 8 に記載の分子標的薬パブルの製造方法。

40

【請求項 10】

前記混合液中における、前記アルブミンの含有量を X [wt%] とし、前記分子標的薬
の含有量を Y [wt%] としたとき、 $1 < Y / X < 10$ の関係を満足する請求項 7 ないし
9 のいずれかに記載の分子標的薬パブルの製造方法。

【請求項 11】

前記混合液中における前記外殻材料の含有量は、0.001～50wt%である請求項
7 ないし 10 のいずれかに記載の分子標的薬パブルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子標的薬が付着したマイクロサイズまたはナノサイズのバブル（分子標的薬バブル）、およびそのバブルの製造方法に関する。特に、超音波治療に用いる分子標的薬バブル、およびその分子標的薬バブルの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗癌剤は、癌細胞の分裂を抑制する作用等の効果的な抗癌作用を有するが、正常な細胞の増殖抑制作用も有するため、副作用を起こすことが多い。この副作用を抑制するために、近年、正常な細胞に作用することなく、癌細胞に選択的に薬剤を届けるドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発が進められている。

10

【0003】

DDSとしては、癌細胞に由来する分子を特異的に認識し、癌細胞に選択的に作用する分子標的薬を用いる方法や、マイクロサイズまたはナノサイズの微小な気泡（バブル）を用いる方法が検討されている。バブルを用いる方法では、遺伝子や薬剤（薬物）を封入したバブルを静脈等から体内へ注入し、これを血管を通して患部に運搬する。そして、バブルが患部付近に到達した際に、超音波をバブルに照射して、バブルを破裂させる。そうすることにより、バブルに封入された薬物を患部に集中的に投与することができる。このバブルとしては、リポソームが用いられている（例えば、特許文献1）。また、リポソームにトラスツズマブを結合させた製剤の開発も進められている（例えば、特許文献2）。

20

【0004】

リポソームは、生体の構成成分であるリン脂質を主成分としているため、生体への毒性が低く、DDSのキャリアとして使用し易い。しかしながら、リポソームは、生体内での安定性が十分ではないため、患部に運搬される前に血管内で消失してしまうことがある。この場合には、バブル内の薬物を患部に集中的に投与することができない。また、リポソームに、トラスツズマブのような分子標的薬を安定かつ容易に結合させることが困難であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

30

【特許文献1】特開2008-100956号公報

【特許文献2】国際公開第WO2013/141346号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記従来の問題点を鑑みたものであり、その目的は、血液中で安定的に分子標的薬を保持しつつ、目的の患部に確実に運搬することができる分子標的薬バブルを提供することである。また、別の目的は、かかる分子標的薬バブルを安定かつ容易に製造することができる分子標的薬バブルの製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

このような目的は以下の(1)～(11)の本発明により達成される。

(1) アルブミンを主成分とする外殻材料で構成された外殻と、

該外殻に付着し、標的の分子を特異的に認識する分子標的薬とを含むことを特徴とする分子標的薬バブル。

【0008】

(2) 前記外殻材料中の前記アルブミンの含有量は、50～100wt%である上記(1)に記載の分子標的薬バブル。

【0009】

(3) 前記アルブミンと前記分子標的薬との重量比率は、1000:1～1:1であ

50

る上記(1)または(2)に記載の分子標的薬バブル。

【0010】

(4) 前記分子標的薬は、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、アレムツズマブ、イブリツモマブ、チウキセタン、トシツモマブ、ベバシズマブ、パニツムマブ、オフアツムマブ、デノスマブ、イビリムマブ、ブレンツキシマブ、ベドチン、モガムリズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、エムタンシン、ラムシルマブ、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、プリナツモマブ、ジヌツキシマブ、ダラツムマブ、ネシツムマブ、エロツズマブからなる群から選択される少なくとも1種を含む上記(1)ないし(3)のいずれかに記載の分子標的薬バブル。

【0011】

(5) 前記バブルは、前記外殻内に封入されたガスをさらに有する上記(1)ないし(4)のいずれかに記載の分子標的薬バブル。

【0012】

(6) 前記ガスは、亜酸化窒素、酸素、水素、ヘリウム、メタン、エタン、プロパン、ブタン、ペンタン、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、エチレン、プロピレン、プロパジエン、ブテン、アセチレン、プロピン、パーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロペンタンからなる群から選択される少なくとも1種を含む上記(5)に記載の分子標的薬バブル。

【0013】

(7) アルブミンを主成分とする外殻材料を含む第1の溶液と、標的の分子を特異的に認識する分子標的薬を含む第2の溶液とを準備する工程と、

前記第1の溶液を、容器の所定の高さまで注入する工程と、

前記第1の溶液が前記容器の内面に繰り返し衝突するように、所定の回転数で前記容器を振動させる工程と、

振動後の前記第1の溶液と前記第2の溶液とを混合して、混合液を得る工程とを有することを特徴とする分子標的薬バブルの製造方法。

【0014】

(8) 前記容器を振動させる工程は、5000rpm以上の回転数で行われる上記(7)に記載の分子標的薬バブルの製造方法。

【0015】

(9) 前記容器を振動させる工程は、前記容器内を1.0atmより大きい圧力にした状態で行われる上記(7)または(8)に記載の分子標的薬バブルの製造方法。

【0016】

(10) 前記混合液中における、前記アルブミンの含有量をX[w t %]とし、前記分子標的薬の含有量をY[w t %]としたとき、 $1 < Y / X < 10$ の関係を満足する上記(7)ないし(9)のいずれかに記載の分子標的薬バブルの製造方法。

【0017】

(11) 前記混合液中における前記外殻材料の含有量は、0.001~50wt%である上記(7)ないし(10)のいずれかに記載の分子標的薬バブルの製造方法。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、血液中での安定性が高く、分子標的薬に対して高い保持力を有するアルブミンを外殻材料として用いることにより、患部に確実に運搬可能な分子標的薬バブルを提供することができる。この分子標的薬バブルは、分子標的薬が付着した状態で、患部に効率良く到達(集積)する。そして、分子標的薬バブルが患部に到達した時に、超音波を照射して分子標的薬バブル(外殻)を破裂させることにより、患部に対して、分子標的薬が供給されるとともに、患部の細胞の一部を破壊することができる。これにより、患部を効率良く治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

10

20

30

40

50

【図 1】図 1 は、本発明の分子標的薬バブルの第 1 実施形態について、その一部を切断した状態を示す斜視図である。

【図 2】図 2 は、本発明の分子標的薬バブルの製造方法の第 1 実施形態を説明するためのフローチャートである。

【図 3】図 3 (a) ~ (d) は、本発明の分子標的薬バブルの製造方法の第 1 実施形態を説明するための断面図である。

【図 4】図 4 は、図 3 (c) に示す容器を振動させる工程において、水性液体と容器の内面 (上面) とが激しく衝突した状態を説明するための部分拡大図である。

【図 5】図 5 (a) および (b) は、本発明の分子標的薬バブルの第 2 実施形態について、その一部を切断した状態を示す斜視図である。

【図 6】図 6 は、実施例等で得られた分子標的薬バブルのバブル径分布を示すグラフである。

【図 7】図 7 は、実施例および比較例について、口腔扁平上皮癌細胞 H S C - 2 の細胞殺傷率を示すグラフである。

【図 8】図 8 (a) は、実施例 3 における、遠心分離直後の第 1 の液体のバブル径分布を示すグラフである。図 8 (b) は、実施例 3 の分子標的薬バブルのバブル径分布を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 0 】

以下、本発明の分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法を添付図面に示す好適な実施形態に基づいて説明する。

【 0 0 2 1 】

< 第 1 実施形態 >

まず、本発明の分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法の第 1 実施形態について説明する。本実施形態の分子標的薬バブルは、後述する本実施形態の分子標的薬バブルの製造方法によって製造することができる。

【 0 0 2 2 】

1 . 分子標的薬バブル

図 1 は、本発明の分子標的薬バブルの第 1 実施形態について、その一部を切断した状態を示す斜視図である。

【 0 0 2 3 】

図 1 に示す分子標的薬バブル 1 は、その殻を構成する外殻 2 (球状の膜) と、外殻 2 内に封入されたガス 3 と、外殻 2 に付着し、標的の分子を特異的に認識する分子標的薬 4 とを有している。このような分子標的薬バブル 1 は、医療分野において、超音波治療を行う際に用いられる。より具体的には、分子標的薬バブル 1 は、静脈注射等により血管内に注入され、血流により患部にまで運搬される。その後、分子標的薬バブル 1 が患部付近に到達した際に、分子標的薬バブル 1 に超音波を照射して、分子標的薬バブル 1 (外殻 2) を破裂させる。これにより、患部の細胞に対して、分子標的薬が供給されるとともに、患部の細胞の一部を破壊することができる。以下、分子標的薬バブル 1 を構成する各成分を説明する。

【 0 0 2 4 】

外殻 2 は、その内側に封入されるガス 3 を分子標的薬バブル 1 内に保持する機能を有している。

【 0 0 2 5 】

本発明では、外殻 2 は、アルブミンを主成分とする外殻材料で構成されている。この外殻材料は、主として 1 つの分子中に疎水性と親水性との両方の性質 (置換基) を有する両親媒性材料である。アルブミンとともに、外殻材料として用いることができる両親媒性材料としては、特に限定されないが、パルミチン酸、ステアリン酸のような高級脂肪酸、ガラクトースのような糖類、コレステロール、シトステロールのようなステロール類、界面活性剤、天然または合成高分子、蛍光色素、抗体、標識金属等が挙げられ、これらのうち

10

20

30

40

50

の1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。

【0026】

アルブミンとしては、具体的には、人血清アルブミンを用いることができる。人血清アルブミンは、血液の血漿を構成する全タンパク質の60%程度を占めるタンパク質であり、高い安定性を有する。そのため、外殻材料の主成分としてアルブミンを用いることにより、血液中での分子標的薬バブル1の安定性を高くすることができる。また、アルブミンは、その分子中に、プラスおよびマイナスに帯電した箇所を多く有する。そのため、分子標的薬4が有する極性基や分極した原子がアルブミンの帯電した箇所に吸着または結合することにより、分子標的薬4が外殻2に確実に付着（吸着、結合）する。したがって、分子標的薬4と結合することによっても、血液中での安定性が高くなる。そのため、分子標的薬バブル1を確実に患部まで運搬することができる。

10

【0027】

外殻材料中のアルブミンの含有量は、50~100wt%であるのが好ましく、70~100wt%であるのがより好ましく、90~100wt%であるのがさらに好ましい。外殻材料中のアルブミンの含有量が上記範囲内であれば、血液中での分子標的薬バブル1の安定性がより向上するとともに、分子標的薬4を付着した状態の分子標的薬バブル1をより多量に患部に運搬することができる。

【0028】

なお、図1には示されていないが、外殻2を構成する両親媒性材料は、水性媒体中において、疎水基が内側に、親水基が外側になるようにして球状に配置される。この性質により、外殻2は、両親媒性材料の分子の単層で構成されるミセルとなる。

20

【0029】

ガス3は、分子標的薬バブル1を製造する際の温度（20程度）において、気体状の物質である。また、ガス3は、分子標的薬バブル1を体内に注入した状態において、すなわち、体内の温度（37程度）においても、気体状の物質である。

【0030】

ガス3としては、特に限定されないが、例えば、空気、窒素、亜酸化窒素、酸素、二酸化炭素、水素、ヘリウム、アルゴン、キセノン、クリプトンのような不活性ガス、六フッ化硫黄、十フッ化二硫黄、トリフルオロメチル硫黄ペンタフルオリドのようなフッ化硫黄、メタン、エタン、プロパン、ブタン、ペンタン、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、エチレン、プロピレン、プロパジエン、ブテン、アセチレン、プロピン、パーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロペンタンのような低分子量炭化水素類またはこれらのハロゲン化物、ジメチルエーテルのようなエーテル類、ケトン類、エステル類等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。これらの物質の中でも、特に、パーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロペンタン、六フッ化硫黄が好ましい。これらのガスが封入された分子標的薬バブル1は、体内においてより安定性が高く、血管を通して患部（治療対象部位）までより確実に運搬される。なお、ガス3は、外殻2内に含まれていなくてもよい。例えば、分子標的薬バブル1が生成された時点では、外殻2内にガス3が封入された状態であっても、その後、外殻2内に液体成分（バブルの保存液、例えば、後述する水性媒体）が流入して、ガス3が外殻2から抜け出すことがある。このような状態のバブル（カプセル）も、本実施形態の分子標的薬バブル1に含まれる。

30

40

【0031】

分子標的薬（分子標的治療薬）4は、図1に示すように、外殻2の表面に付着している。分子標的薬4は、標的の分子を特異的に認識する薬物である。例えば、癌治療に用いられる分子標的薬4は、正常細胞にはない、癌細胞に由来する分子（タンパク質）を特異的に認識し、癌の増殖や移転に必要な分子の作用を抑制する機能を有する。また、癌治療以外の分野では、例えば、関節リウマチ等の炎症性疾患に対して、炎症に関わる分子を特異的に認識し、その分子の作用を抑制する分子標的薬4を用いることもできる。

【0032】

50

分子標的薬4としては、分子量が300～500程度の低分子量の化合物で構成される低分子薬や、分子量が数万～数十万程度のタンパク質で構成される抗体薬（モノクローナル抗体薬）等を用いることができる。

【0033】

低分子薬としては、特に限定されないが、イマニチブ、ゲフィチニブ、ボルテゾミブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ダサチニブ、ラパチニブ、ニンテダニブ、パゾパニブ、バンデタニブ、ベムラフェニブ、クリゾチニブ、ルキシロチニブ、アキシチニブ、ピスマデギブ、カルフィルゾミブ、ボスチニブ、レゴラフェニブ、カボザンチニブ、ポナチニブ、ダブラフェニブ、トラメチニブ、アフアチニブ、イブルチニブ、セルチニブ、アレクチニブ、イデラリシブ、ニンテダニブ、オラパリブ、バルボシクリブ、レンパチニブ、ソニデジブ、コビメチニブ、オシメルチニブ、イキサゾミブ等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。

10

【0034】

また、抗体薬としては、特に限定されないが、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、アレムツズマブ、イブリツモマブ、チウキセタン、トシツモマブ、ベパシズマブ、パニツムマブ、オフアツムマブ、デノスマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブ、ベドチン、モガムリズマブ、ベルツズマブ、トラスツズマブ、エムタンシン、ラムシルマブ、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、プリナツモマブ、ジヌツキシマブ、ダラツムマブ、ネシツムマブ、エロツズマブ等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。

20

【0035】

このような分子標的薬4が外殻2に付着することにより、分子標的薬バブル1を目的の患部に効率良く到達（集積）させることができる。そのため、患部に対して、より正確に分子標的薬4を供給して、効率良く治療することができる。

【0036】

分子標的薬バブル1中のアルブミンと分子標的薬4との重量比率は、特に限定されないが、1000：1～1：1程度であるのが好ましく、500：1～11：9程度であるのがより好ましく、100：1～6：4程度であるのがさらに好ましい。アルブミンと分子標的薬4との重量比率が上記範囲内であれば、患部付近で外殻2を破裂させた際に、患部に対して、十分な量の分子標的薬4を供給することができる。そのため、患部をより効率良く治療することができる。

30

【0037】

このような成分で構成された外殻2（バブル）の径は、本発明の分子標的薬バブルの製造方法の各工程の条件を変更することにより変化する。すなわち、製造される分子標的薬バブル1は、マイクロサイズ（数百マイクロメートル程度）、または、ナノサイズ（数百ナノメートル程度）を有することとなる。

【0038】

具体的に、外殻2の平均径は、特に限定されないが、10nm～1000μm程度であるのが好ましく、10nm～100μm程度であるのがより好ましく、50～2000nm程度であるのがさらに好ましい。外殻2の平均径が上記範囲内であれば、分子標的薬バブル1を静脈注射により体内に注入した際に、分子標的薬バブル1の径が十分に小さいため、血流により分子標的薬バブル1が血管内を滑らかに移動することができる。また、このような径のバブルは、血管内での安定性が高く、血管内を移動している間に消滅することなく、目的の部位まで確実に運ばれる。特に、ナノバブルは、血管内での安定性が高いため、ほぼ消滅することなく、目的の部位まで確実に搬送される。

40

【0039】

ここで、癌細胞が存在する患部では、その周囲の血管から癌細胞へと、正常血管よりも細径の新生血管が伸びている。平均径が200～300nm程度の外殻2を有する分子標的薬バブル1であれば、分子標的薬バブル1が、新生血管内にも円滑に搬送され、マイクロサイズの分子標的薬バブル1では到達できないような癌細胞にまで到達することができ

50

る。すなわち、かかる分子標的薬バブル1は、癌治療に好適に用いられることができる。また、一部の分子標的薬バブル1を、血管壁を通過させて、癌細胞に取り込ませることもできる。

【0040】

なお、図1および後述する図5(a)および(b)に示す外殻2の平均径は、例えば、レーザー回折・散乱法、ナノ粒子トラッキング解析法、電気抵抗法、AFM(Atomic Force Microscope)、レーザー顕微鏡による観測等により測定することができる。また、AFMを測定する装置としては、例えば、Malvern社製の共振式粒子計測システム(商品名:アルキメデス)を用いることができる。

【0041】

また、一般的に、気体を内包するバブルは、液体と気体との界面において効率良く超音波を反射する性質を有している。そのため、上記範囲の平均径の外殻2を有する分子標的薬バブル1は、血管内において、血液とガス3との界面の面積が十分に大きく、超音波造影剤としても有効に用いられる。

【0042】

上述したような分子標的薬バブル1は、以下に記載する本実施形態のバブルの製造方法により製造することができる。

【0043】

2. 分子標的薬バブルの製造方法

図2は、本発明の分子標的薬バブルの製造方法の第1実施形態を説明するためのフローチャートであり、図3(a)~(d)は、本発明の分子標的薬バブルの製造方法の第1実施形態を説明するための断面図であり、図4は、図3(c)に示す容器を振動させる工程において、水性液体と容器の内面(上面)とが激しく衝突した状態を説明するための部分拡大図である。

【0044】

なお、以下の説明では、図3(a)~(d)および図4中の上側を「上」と言い、図3(a)~(d)および図4中の下側を「下」と言う。

【0045】

本実施形態の分子標的薬バブルの製造方法は、図2に示すように、工程(S1)~(S5)の5つの工程を有する。工程(S1)は、外殻材料を含む第1の溶液と、分子標的薬を含む第2の溶液と、第1および第2の溶液が注入されるバブル製造用容器(以下、単に「製造容器」という)を準備する工程である。工程(S2)は、第1の溶液を製造容器の所定の高さまで注入する工程である。工程(S3)は、製造容器内にガスを充填して、製造容器内を加圧した状態で製造容器を密閉する工程である。工程(S4)は、第1の溶液が容器の内面に繰り返し衝突するように、所定の回転数で製造容器を振動させる工程である。工程(S5)は、振動後の製造容器内に第2の溶液を注入し、第1の溶液と第2の溶液とを混合して、分子標的薬バブルを含む混合液を得る工程である。

【0046】

本実施形態のバブルの製造方法では、工程(S4)において、バブル100が生成される。その後、工程(S5)を経て、バブル100(外殻2)の表面に分子標的薬4が付着した分子標的薬バブル1が生成される。以下、これらの工程について順次説明する。

【0047】

[S1] 準備工程

まず、分子標的薬バブル1の外殻2を構成する外殻材料および水性媒体を調製容器に入れて、外殻材料を水性媒体に溶解させて、第1の溶液10を調製する。すなわち、調製容器内に外殻材料および水性媒体を所定量加えた後、攪拌して、外殻材料を水性媒体に溶解させる。外殻材料、水性媒体を調製容器に入れる順番は、特に限定されない。外殻材料を水性媒体に溶解させる方法としては、例えば、攪拌子による攪拌、超音波処理等を用いることができる。

【0048】

10

20

30

40

50

水性媒体としては、特に限定されないが、例えば、蒸留水、純水、超純水、イオン交換水、RO水等の水、Saline、PBS (phosphate buffered saline) 等の生理食塩水 (0.9% 程度の食塩水)、グルコース、スクロース等の各種糖類と蒸留水とを混合した糖水溶液等が挙げられる。これらは、1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。

【0049】

第1の溶液10中における外殻材料の含有量は、特に限定されないが、外殻材料の臨界ミセル濃度 (CMC) 以上の濃度で第1の溶液10に含まれているのが好ましい。具体的には、第1の溶液10に含まれる外殻材料の含有量は、0.001~50wt%程度であることが好ましく、0.01~20wt%程度であることがより好ましい。

10

【0050】

これにより、第1の溶液10中の外殻材料の濃度が、より確実に臨界ミセル濃度以上となるので、第1の溶液10中に外殻2 (ミセル) を確実に形成することができる。そのため、後述する工程 (S4) において、ミセル内にガス3が簡単に取り込まれ、所望の径のバブル100を第1の溶液10中に容易に生成させることができる。

【0051】

調製される第1の溶液10に含まれる水性媒体の含有量は、50~99.999wt%であるのが好ましく、80~99.99wt%であるのがより好ましい。これにより、外殻材料を水性媒体に十分に溶解させることができ、より均一な第1の溶液10を得ることができる。

20

【0052】

また、第1の溶液10とは別に、分子標的薬4を含む第2の溶液を準備する。

分子標的薬4および水性媒体を、第1の溶液10の調整容器とは別の調整容器に入れて、分子標的薬4を水性媒体に溶解させて、第2の溶液を調整する。すなわち、第2の溶液は、前述した第1の溶液と同様の方法を用いて調整することができる。

【0053】

分子標的薬4および水性媒体としては、前述した、分子標的薬4および水性媒体を用いることができる。

【0054】

調製される第2の溶液に含まれる水性媒体の含有量は、特に限定されないが、例えば、50~99.99wt%とすることができる。また、第2の溶液としては、市販されている分子標的薬剤を用いることもできる。例えば、セツキシマブを有効成分とするメルクセロノ社製のアービタックス (登録商標) 等を用いることができる。

30

【0055】

次に、製造容器20を準備する。

製造容器20は、開口部を備え、第1の溶液10を収容する容器本体21と、容器本体21を密閉するための蓋22とを有している。

【0056】

容器本体21は、特に限定されないが、図3 (a) に示すような外形が有底円筒状をなしていることが好ましい。本実施形態では、容器本体21として、容量が0.5~20ml程度のバイアル瓶を用いる。本発明の分子標的薬バブルの製造方法では、容器本体21として、このような容量の小さなバイアル瓶を用いた場合であっても、容器本体21を蓋22で密閉した際に、容器本体21内の密閉空間で適切な圧力が第1の溶液10に付与されるので、均一なサイズのパブル100を安定的に得ることができる。特に、容量が0.5~2.5ml程度のバイアル瓶であれば、1つの製造容器20内に、1回の超音波診断に必要となる0.3~0.6ml程度のバブル含有液を製造することができる。この場合、超音波診断の際に、1つの製造容器20内の分子標的薬バブル含有液を使い切ることができるため、製造される分子標的薬バブル含有液の無駄をなくすことができる。

40

【0057】

このように容量の小さいバイアル瓶 (容量: 0.5~20ml程度) の寸法は、長手方

50

向の長さXが、35～60mm程度であり、外径Rが、10～40mm程度である。

【0058】

蓋22は、図3(b)～(d)に示すように、容器本体21の瓶口に密着する円盤状のゴム栓(セプタム)221と、ゴム栓221を容器本体21の瓶口に固定する締付部222とを備えている。

【0059】

締付部222は、ゴム栓221の縁部を覆うように構成されており、その平面視略中央に開口を有している。また、締付部222の瓶口側の内周面および容器本体21の瓶口側の外周面には、互いに螺合可能に形成されるネジ溝が、それぞれ形成されており(図示せず)、これらを螺合させることにより、ゴム栓221が容器本体21の瓶口と密着した状態

10

【0060】

[S2] 第1の溶液を製造容器に注入する工程

調製された第1の溶液10を容器本体21(製造容器20)の所定の高さまで注入する。本実施形態では、図3(a)に示すように、Y[mm]まで注入する。したがって、図3(a)に示すように、第1の溶液10が注入された状態の容器本体21は、その上部に空隙部11を有する。

【0061】

本実施形態では、第1の溶液10が注入された容器本体21(製造容器20)を水平に静置した状態において、容器本体21の高さ(長手方向の長さ)をX[mm]とし、容器本体21における第1の溶液10の液面の高さをY[mm]としたとき、 $0.2 < Y/X < 0.7$ の関係を満足するのが好ましい。上記関係を満足することにより、十分な大きさの空隙部11が存在するので、工程(S4)において、第1の溶液10を製造容器20の上下面および側面(特に、上下面)により勢いよく衝突させることができる。この衝突により、第1の溶液10中に衝撃波が生じ、第1の溶液10中にバブル100を容易に形成することができる。

20

【0062】

なお、前記関係は、 $0.3 < Y/X < 0.5$ の関係を満足するのがより好ましく、 $0.35 < Y/X < 0.4$ の関係を満足するのがさらに好ましい。これにより、工程(S4)において、第1の溶液10中にバブル100をより容易に形成することができる。

30

【0063】

[S3] 製造容器を密閉する工程

次に、容器本体21にガス3を充填させて、製造容器20内を加圧した状態で密閉する(図3(b)参照)。具体的には、第1の溶液10が注入された容器本体21の空隙部11を、ガス3でパージした後、蓋22を容器本体21の開口部(瓶口)に締付ける。これにより、製造容器20内に第1の溶液10とガス3とが密閉される。

【0064】

容器本体21の空隙部11をガス3でパージする方法としては、例えば、第1の溶液10が注入された容器本体21をチャンバー内に移動させる。次に、チャンバー内の空気をガス3で置換する。その後、蓋22を容器本体21の開口部に締付けることにより、製造容器20内に第1の溶液10とガス3とを密閉することができる。

40

【0065】

次に、ガス3が充填された注射器を準備する。そして、注射器の注射針をゴム栓221に刺通する。その後、注射器から製造容器20内にさらにガス3を加えることにより、製造容器20内を加圧される。その後、ゴム栓221から注射針を抜去する。これにより、製造容器20内がガス3により加圧された状態で密閉された製造容器20を得ることができる。

【0066】

50

本実施形態のバブルの製造方法では、製造容器 20 内の圧力（空隙部 11 に充填されたガス 3 の圧力）を 1.0 atm より大きくする。特に、製造容器 20 内の圧力は、1.5 ~ 10 atm であるのが好ましく、2 ~ 5 atm であるのがより好ましい。これにより、ガス 3 の一部が第 1 の溶液 10 に微分散または溶解する。

【0067】

第 1 の溶液 10 にガス 3 が微分散または溶解することにより、工程（S4）において、第 1 の溶液 10 と製造容器 20 とが衝突して衝撃波が発生する際に、バブル 100 が発生し易くなる。これにより、工程（S4）において、第 1 の溶液 10 中により多くのバブル 100 を生成させることができる。

【0068】

また、製造容器 20 内の圧力を 1.0 atm よりも大きい任意の値に設定することにより、第 1 の溶液 10 中に生成するバブル 100 の径および含有量をより容易に調整することができる。

【0069】

なお、本実施形態では、製造容器 20 内を加圧した状態（製造容器 20 内の圧力を 1.0 atm よりも大きくした状態）としているが、製造容器 20 内を加圧することなく、次工程（S4）を行ってもよい。

【0070】

[S4] 製造容器を振動させる工程

次に、第 1 の溶液 10 が、製造容器 20 の上下面および側面（特に、上下面）に繰り返し衝突するように、製造容器 20 を振動させる。本実施形態では、図 3（c）に示すように、製造容器 20 が、略その長手方向（図 3（c）では、鉛直方向）に往復運動するように、製造容器 20 を振動させる。

【0071】

本工程では、工程（S3）で密閉した製造容器 20（図 3（c）の下図）を上方向に振動させる（図 3（c）の真中の図）。これにより、第 1 の溶液 10 は、製造容器 20 の中間付近に移動する。更に製造容器 20 を上方向に振動させると、第 1 の溶液 10 が製造容器 20 の上部に移動して、蓋 22 の下面（ゴム栓 221）に衝突する（図 3（c）の上図）。この際に、図 4 に示すように、衝撃波が発生する。この衝撃波の圧力により、ガス 3 が第 1 の溶液 10 中に微分散し、バブル 100 が形成する。このバブル 100 内には、振動により第 1 の溶液 10 に微分散または溶解したガス 3 が含まれる。

【0072】

一方、製造容器 20（図 3（c）の上図）を下方向に振動させる（図 3（c）の真中の図）。これにより、第 1 の溶液 10 は、製造容器 20 の中間付近に移動する。更に製造容器 20 を下方向に振動させると、第 1 の溶液 10 が製造容器 20 の下部に移動して、製造容器 20 の下面に衝突する（図 3（c）の下図）。この時も、図 4 に示すように、衝撃波が発生する。

【0073】

また、製造容器 20 を鉛直方向に振動させる際に、第 1 の溶液 10 は、製造容器 20 の内側の側面とも衝突する。この時も、図 4 に示すように、衝撃波が発生する。

【0074】

以上の操作を繰り返し行うことによって、第 1 の溶液 10 中に均一なサイズのパブル 100 を多量に安定的に生成させることができる。

【0075】

本実施形態の分子標的薬バブルの製造方法では、十分に微細で、均一なサイズのパブル 100 を得るために、製造容器 20 を 5000 rpm 以上で振動させるのが好ましい。これにより、第 1 の溶液 10 と製造容器 20 とが衝突する際に発生する衝撃波の大きさ（圧力）が十分に大きくなり、第 1 の溶液 10 中に生じるバブル 100 が微細化され、そのサイズを均一にすることができる。また、製造容器 20 の回転数を上記範囲内で低めに設定した場合には、発生する衝撃波の大きさが小さくなるので、比較的径の大きなバブル 10

10

20

30

40

50

0を生成することができる。また、回転数を高めに設定した場合には、発生する衝撃波の大きさが大きくなるので、比較的径の小さいバブル100を生成することができる。なお、本明細書において、製造容器20の「回転数」とは、単位時間当たりに、製造容器20がその全振動経路を移動する回数を意味する。例えば、製造容器20が5000rpmで振動するとは、製造容器20が、1分間に全振動経路を5000回移動(振動)することを意味する。

【0076】

また、製造容器20の回転数は、5500rpm以上であることがより好ましく、6000~20000rpmであることがさらに好ましい。製造容器20の回転数を上記範囲内とすることにより、振動により生成したバブル100同士が、衝突により崩壊したり、合体して粗大化するのをより確実に防止することができる。これにより、バブル100の径を微細化しつつ、より均一なサイズのバブル100を多量に第1の溶液10中に生成させることができる。

10

【0077】

上記のような回転数で製造容器20を振動させることができる装置としては、例えば、ビーズ方式の高速細胞破碎システム(ホモジナイザー)を用いることができる。具体例としては、パーティンテクノロジーズ(Bertin Technologies)社製のプレセリーズ(Precellys)等を用いることができる。

【0078】

また、第1の溶液10と製造容器20とが衝突する際に発生する衝撃波の圧力は、40kPa~1GPaとなることが好ましい。第1の溶液10と製造容器20との衝突時に発生する衝撃波の圧力が上記範囲内となることにより、第1の溶液10中に生じるバブル100をより微細化し、そのサイズをより均一にすることができる。特に、第1の溶液10と製造容器20との衝突時に発生する衝撃波の圧力が大きくなるほど、より微細なバブル100を生成することができる。

20

【0079】

製造容器20を振動させる際に、製造容器20の長手方向の振動幅は、0.7X~1.5X[mm]程度であるのが好ましく、0.8X~1X[mm]程度であるのがより好ましい。これにより、製造容器20の振動時に、第1の溶液10と製造容器20の下面および蓋22とを確実に衝突させることができ、第1の溶液10と製造容器20の下面および蓋22との衝突回数を十分に多くすることができる。また、このように十分な振動幅で製造容器20を振動させることにより、第1の溶液10が製造容器20内を移動する速度が大きくなる。そのため、第1の溶液10と製造容器20の下面および蓋22との衝突時に発生する衝撃波の大きさが十分に大きくなる。結果として、第1の溶液10中に微細なバブル100を多量に生成させることができる。

30

【0080】

また、製造容器20を鉛直方向に往復運動させる際に、製造容器20は、その短手方向(水平方向)にも振動させるのが好ましい。これにより、製造容器20の内側の側面にも第1の溶液10が衝突するので、第1の溶液10に衝撃波をより多く発生させることができる。製造容器20の短手方向への振動幅は、0.3X~0.8X[mm]程度であるのが好ましく、0.5X~0.7X[mm]程度であるのがより好ましい。これにより、上述した効果はより顕著となる。

40

【0081】

なお、製造容器20を振動させる方向は、その短手方向のみであってもよい。この場合、製造容器20の短手方向(水平方向)への振動幅は、上述した短手方向への振動幅と同じであることが好ましい。かかる振動幅であれば、製造容器20の内側の側面に第1の溶液10が確実に衝突するので、第1の溶液10に衝撃波をより多く発生させることができる。その結果、第1の溶液10中に微細なバブル100を多量に生成させることができる。

【0082】

50

また、本工程では、第1の溶液10を製造容器20の上下面および側面に衝突させる際における製造容器20と製造容器20内の第1の溶液10との瞬間相対速度が40 km/h以上となるように製造容器20を振動させることが好ましい。また、かかる瞬間相対速度が50 km/h以上となるように製造容器20を振動させることがより好ましい。上記条件を満足することにより、第1の溶液10と製造容器20とが衝突する際に生じる衝撃波の圧力を十分に大きくすることができる。その結果、第1の溶液10中に生じるバブル100をより微細化し、そのサイズをより均一にすることができる。

【0083】

なお、製造容器20を上記条件で振動させる時間は、10～120秒程度であるのが好ましく、30～60秒程度であるのがより好ましい。製造容器20の振動時間を上記範囲内とすることにより、第1の溶液10が製造容器20と衝突する回数が十分に多くなるため、第1の溶液10中に、多量のバブル100を生成させることができる。なお、製造容器20の振動時間を上記範囲内で長く設定することにより、第1の溶液10中に生成されるバブル100の量をより多くすることができる。

10

【0084】

また、第1の溶液10中に生成されるバブル100の平均径は、製造容器20の回転数を前述した範囲内で変更することにより調整することができる。本実施形態では、おおよそ数十～数百ナノメートルサイズのナノバブルを安定的に生成することができる。

【0085】

なお、本実施形態では、製造容器20が、ほぼその長手方向に往復運動するように、製造容器20を振動させているが、製造容器20を振動させる方法は、これに限定されない。例えば、製造容器20が、主として、その短手方向および/または長手方向に回転運動するように、製造容器20を振動させてもよい。この場合であっても、製造容器20内の第1の溶液10は、製造容器20の上下面および側面に繰り返し衝突することにより、衝撃波が発生する。このような振動方法を用いても、第1の溶液10中に、均一なサイズのバブル100を多量に安定的に生成することができる。

20

【0086】

[S5] 第1の溶液と第2の溶液とを混合する工程

上記条件で振動させた後の製造容器20の蓋を外し、第2の溶液を容器本体21に注入する。これにより、第1の溶液10と第2の溶液とが混合して、混合液12を得る(図3(d)参照)。これにより、混合液12中において、バブル100(外殻2)の表面に分子標的薬4が付着した分子標的薬バブル1(図1参照)を得ることができる。

30

【0087】

なお、第2の溶液を容器本体21に注入した後、第1の溶液10と第2の溶液とを、例えば、攪拌子による攪拌、超音波処理等を用いて混合してもよい。

【0088】

なお、混合液12中におけるアルブミンの含有量をX[w t %]とし、分子標的薬4の含有量をY[w t %]としたとき、 $1 \leq Y/X \leq 10$ の関係を満たすことが好ましく、 $1.5 \leq Y/X \leq 8$ の関係を満たすことがより好ましく、 $2 \leq Y/X \leq 5$ の関係を満たすことがさらに好ましい。混合液12が上記条件を満たすことにより、外殻2の表面に十分な量の分子標的薬4が付着した分子標的薬バブル1を生成することができる。かかる分子標的薬バブル1を用いることにより、患部付近で外殻2を破裂させた際に、患部に対して、十分な量の分子標的薬4を供給することができる。そのため、患部をより効率良く治療することができる。

40

【0089】

また、混合液12中における外殻材料の含有量は、0.001～50 w t %程度であることが好ましく、0.01～20 w t %程度であることがより好ましい。混合液12中における外殻材料の含有量が上記範囲内であれば、分子標的薬バブル1の安定性が向上し、長期間保存した場合でも、混合液12中に含まれる分子標的薬バブル1の数およびサイズの変動をより確実に抑えることができ、分子標的薬バブル1の経時安定性をより向上させ

50

ることができる。特に、外殻材料中のアルミニムの含有比率が90wt%以上である場合には、混合液12中の外殻材料の含有量がごく少量（例えば、0.05wt%程度）であっても、分子標的薬バブル1の経時安定性は極めて優れる。

【0090】

また、製造容器20内は加圧されている。そのため、製造容器20の蓋22を外す際に、製造容器20内を急激に減圧すると、第1の溶液10中のバブル100の粒径が変化したり、含有量が減少したりする等の悪影響が生じる可能性がある。そのため、本工程において、製造容器20の蓋22を外す際に、あらかじめ、製造容器20内の圧力を大気圧まで減圧しておくことが好ましい。

【0091】

例えば、製造容器20内を減圧するための減圧用注射器を用意し、その注射針をゴム栓221に刺通する。その際に、減圧用注射器の注射針が第1の溶液10に接触しないようにする。次に、減圧用注射器のプランジャーを操作して、製造容器20内のガス3を吸引することにより、製造容器20内の圧力を大気圧まで減圧する。その後、製造容器20から蓋22を外す。かかる方法を用いれば、生成されたバブル100に上述したような悪影響が生じない。

【0092】

なお、上述した工程(S2)～(S5)は、一定の温度下で行われるのが好ましい。製造過程における温度条件が一定であれば、各工程(S2)～(S5)において、各溶液(第1の溶液10、第2の溶液、混合液12)の特性(粘性等)が安定するため、分子標的薬バブル1を安定的に製造することができる。各溶液の温度を一定に維持するための方法としては、例えば、上述した各工程(S2)～(S5)をグローブボックスや恒温槽内で行う方法が挙げられる。特に、工程(S4)において、製造容器20を高速で振動させるため、第1の溶液10と製造容器20の内面との衝突により製造容器20が発熱し易い。しかし、恒温槽内で製造容器20を振動させることにより、第1の溶液10の温度が上昇するのを確実に防止することができる。その結果、第1の溶液10中に均一な径のバブル100を安定的に生成することができ、最終的に、均一な径を有する分子標的薬バブル1を安定的に生成することができる。

【0093】

以上の工程(S1)～(S5)を経て、平均径が10nm～1000μm程度の分子標的薬バブル1が製造される。

【0094】

なお、従来のバブルの製造方法では、大掛かりな還流装置や、バブルの製造装置を構成する様々なシステム(チューブ、ノズル、コンプレッサ等)が必要であった。そのため、食品分野や医療分野等に用いられるバブルを製造する際に、清潔で、かつ無菌環境を維持するのが困難であった。これに対して、本発明では、分子標的薬バブル1の製造に気密性の高い製造容器20を用いるため、第1の溶液10、第2の溶液およびガス3を製造容器20内に含有した状態で、例えば、線滅菌等による滅菌処理を製造容器20に施せばよい。これにより、製造容器20内が滅菌されるため、分子標的薬バブル1を滅菌環境下で製造することができる。

【0095】

なお、上記のようにして得られた分子標的薬バブル1は、混合液12中に安定的に存在することができる。そのため、得られた分子標的薬バブル含有液(以下、単に「バブル含有液」という)を含む製造容器20(以下、単に「バブル含有容器」という)は、室温にて長期保存することができる。具体的には、6～24か月間もの期間にわたって保存することができる。また、これだけ長期間保存した後でも、混合液12中での分子標的薬バブル1の安定性が高いため、再度バブル含有容器を振動させたりする必要なく、使用することが可能である。また、製造容器として、容量が小さい製造容器20を用いることができるので、バブル含有容器の単価を抑えることができる。そのため、上記のようにして得られたバブル含有容器は、医療機関等にとっては、取扱い易いというメリットがある。

10

20

30

40

50

【0096】

[S6] 遠心分離処理工程

本実施形態の分子標的薬バブルの製造方法は、工程(S4)後であって、工程(S5)前に、製造容器20に対して、遠心分離処理を行ってもよい。この処理により、製造容器20内に生成されたバブル100を、所望の径別に分離することができる。その後、分離した所望の径のバブル100を含む第1の溶液10を用いて、工程(S5)を行うことにより、より単分散なバブル径分布を有する分子標的薬バブル1を得ることができる。

【0097】

具体的には、工程(S4)後の製造容器20に対して遠心分離処理を行うことにより、径の大きいバブル100が製造容器20の上層へ移動する傾向があり、径の小さいバブル100が製造容器20の下層へ移動する傾向がある。したがって、製造容器20の上層の液体(上澄み液)を吸引手段(注射器、ピペット等)により除去すれば、製造容器20内に残存する第1の溶液10中のバブル100の平均径は、工程(S4)後に得られたバブル100の平均径よりも小さくなる。また、吸引手段により吸引した上澄み液中のバブル100の平均径は、工程(S4)後に得られたバブル100の平均径よりも大きくなる。したがって、遠心分離処理を用いることにより、最終的に、より単分散なバブル径分布を有する分子標的薬バブル1を得ることができる。

10

【0098】

また、第1の溶液10で使用する水性媒体と比重の異なる物質をバブル含有液に加えて、遠心分離処理することにより、径の大きいバブル100がより上層へと移動し易くなり、径の小さいバブル100がより下層へと移動し易くなる、その結果、より単分散なバブル径分布を有する分子標的薬バブル1を得ることができる。

20

【0099】

工程(S1)~(S4)を経て、例えば、平均径が600nmのバブル100を含有する第1の溶液10を経た場合、遠心分離の条件を適宜設定することにより、平均径が200~300nmのバブル100を含有する第1の溶液10を得ることができる。この第1の溶液10を用いて工程(S5)を行うことにより、平均径が200~300nmの分子標的薬バブル1を得ることができる。この分子標的薬バブル1は、比較的大きいサイズのバブルが存在しないため、患部に到達した際に、解像度の高い超音波造影剤としても機能し、高精細な画像を得ることができる。

30

【0100】

遠心分離処理の条件は、分離するバブル100の平均径によって適宜設定され、例えば、バブル含有液に $1 \times g \sim 22000 \times g$ 程度の遠心加速度が30秒~24時間程度かかるようにする。遠心加速度を小さく設定($1 \times g \sim 100 \times g$ 程度)する場合には、長時間(12時間~24時間程度)にわたって処理することにより、より単分散なバブル径分布を有するバブル100を得ることができる。また、遠心加速度を大きく設定($100 \times g \sim 22000 \times g$)する場合には、比較的短時間(30秒~12時間程度)の処理により、より単分散なバブル径分布を有するバブル100を得ることができる。遠心分離処理を上記条件で行うことにより、所望の平均径を有するバブル100を効率良く分離することができる。

40

【0101】

上記のような遠心加速度でバブル含有容器に遠心分離処理を行うことができる遠心分離機としては、特に限定されないが、例えば、商品名「TOMY MX-301」(トミー精工社製)等の微量高速冷却遠心機を用いることができる。なお、上記微量高速冷却遠心機を用いる場合には、その回転数が50~2000rpm程度に設定することにより、上記範囲の遠心加速度(遠心力)がバブル含有液に負荷される。

また、遠心分離処理は、1回でもよいし、複数回にわたって行ってもよい。

【0102】

上記の説明では、工程(S1)~(S5)を行うことにより、製造容器20内に均一なサイズの分子標的薬バブル1(図1参照)を多量に安定的に製造することができる。ただ

50

し、本実施形態のバブルの製造方法は、これに限定されない。例えば、前述した工程（S6）を、工程（S1）～（S5）を行った後に行ってもよい。また、工程（S5）の後に、工程（S4）を少なくとも1回以上繰り返し行うようにしてもよい。

【0103】

3. 使用方法

上記のようにして得られたバブル含有容器は、患者の超音波治療に用いられる。

【0104】

具体的には、まず、注射器の注射針を蓋22のゴム栓221に刺通する。次に、バブル含有容器内からバブル含有液を吸引する。そして、ゴム栓221から注射針を抜去し、バブル含有液を吸引した注射器の注射針を患者の血管（例えば静脈）に穿刺して、バブル含有液を血管内に注入する。これにより、分子標的薬バブル1は、血流により患部に運ばれる。なお、バブル含有容器（製造容器20）から蓋22を外し、注射器を用いて、バブル含有容器内からバブル含有液を吸引してもよい。

10

【0105】

血管内に注入された分子標的薬バブル1は、分子標的薬4が付着した状態で、患部に効率良く到達（集積）する。そして、分子標的薬バブル1が患部に到達した時に、外殻2が破裂する程度の周波数および強度を有する治療用超音波を照射して、外殻2を破裂させる。これにより、患部に対して、分子標的薬4が供給されるとともに、患部の細胞の一部を破壊することができるため、患部を効率良く治療することができる。

【0106】

また、上記バブル含有容器内のバブル含有液は、注射針を用いて血管内に注射する方法以外に、経口投与を用いる方法によっても使用することができる。

20

【0107】

また、この場合、超音波治療と超音波診断とを組み合わせるのも有効である。具体的には、血管内の分子標的薬バブル1に対して、診断用超音波を照射して、その反射波をモニタリングする。これにより、分子標的薬バブル1の血管内（体内）での位置や挙動を正確に把握することができる。

【0108】

なお、治療用超音波の強度（出力）は、 $0.1 \sim 30 \text{ W/cm}^2$ 程度であるのが好ましく、 $0.5 \sim 10 \text{ W/cm}^2$ 程度であるのがより好ましい。治療用超音波の強度を上記範囲内とすることにより、より確実に分子標的薬バブル1を破裂させることができるとともに、患部周辺の正常細胞へ与えるダメージを無くすか低減することができる。また、治療用超音波の強度が上記範囲内である場合、その照射時間は、 $10 \sim 120$ 秒程度であるのが好ましく、 $30 \sim 60$ 秒程度であるのがより好ましい。

30

【0109】

また、超音波治療の際に照射する超音波の周波数は、 $100 \text{ kHz} \sim 10 \text{ MHz}$ 程度であるのが好ましく、 $700 \text{ kHz} \sim 1 \text{ MHz}$ 程度であるのがより好ましい。照射する超音波の周波数を上記範囲内とすることにより、より低い超音波出力でバブルを破裂させることができる。

【0110】

なお、バブル含有容器内の圧力を大気圧まで減圧した状態で、蓋22を外し、バブル含有容器内からバブル含有液を吸引してもよい。この場合、バブル含有容器内の圧力を大気圧まで減圧しているため、蓋22を外した瞬間に、バブル含有液が製造容器20の外部に吹き出すのを確実に防止することができる。

40

【0111】

< 第2実施形態 >

次に、本発明の分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法の第2実施形態について説明する。

【0112】

図5(a)および(b)は、本発明の分子標的薬バブルの第2実施形態について、その

50

一部を切断した状態を示す斜視図である。

【0113】

以下、第2実施形態の分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法について、前記第1実施形態との相違点を中心に説明し、同様の事項については、その説明を省略する。

【0114】

1. 分子標的薬バブル

本実施形態の分子標的薬バブル1は、図5(a)および(b)に示すように、外殻2内に、分子標的薬4以外の薬物5をさらに含んでいる以外は、前述した第1実施形態の分子標的薬バブル1と同様である。かかる分子標的薬バブル1は、後述する本実施形態の分子標的薬バブルの製造方法により製造することができる。

10

【0115】

なお、図5(a)では、薬物5が気体状態あるいは固体状態で外殻2内に封入されている分子標的薬バブル1を示しており、図5(b)では、薬物5が液体状態で外殻2内に封入されている分子標的薬バブル1を示している。

【0116】

薬物5としては、使用する分子標的薬4の対象となる患部の治療に有効であれば特に限定されないが、遺伝子、薬剤等を含む。具体的には、ペプチド、抗体、オリゴ糖、多糖、遺伝子、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、リボザイム、トリプルヘリックス分子、ウイルスベクター、プラスミド、低分子有機化合物、抗癌剤、金属等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。

20

【0117】

薬物5とガス3との体積比率は、1:99~90:10程度であるのが好ましく、10:90~70:30程度であるのがより好ましく、40:60~60:40程度であるのがさらに好ましい。薬物5とガス3との体積比率が上記範囲内であれば、分子標的薬バブル1の安定性が向上し、患部付近までより確実に分子標的薬バブル1を運搬することができる。また、患部付近で外殻2を破裂させた際に、患部に対して、十分な量の薬物5を投与することができる。そのため、患部をより効率良く治療することができる。

【0118】

このような成分で構成された分子標的薬バブル1の外殻2(バブル)の径は、図1に示す分子標的薬バブル1と同様に、本発明の分子標的薬バブルの製造方法の各工程の条件を変更することにより変化する。

30

【0119】

次に、本実施形態の分子標的薬バブルの製造方法について説明する。

2. 分子標的薬バブルの製造方法

本実施形態では、第1の溶液10が、水性媒体、外殻材料および薬物5を含んでいる。すなわち、本実施形態の分子標的薬バブルの製造方法は、前述した第1実施形態の工程(S1)において調整する第1の溶液10が、外殻材料、水性媒体に加え、薬物5を含んでいる以外は、前述した第1実施形態のバブルの製造方法と同様である。

40

【0120】

[S1] 準備工程

本実施形態では、外殻材料、薬物5および水性媒体を調製容器に入れて、外殻材料と薬物5とを水性媒体に溶解させて、第1の溶液10を調製する。すなわち、調製容器内に外殻材料、薬物5および水性媒体を所定量加えた後、攪拌して、外殻材料および薬物5を水性媒体に溶解させる。外殻材料、薬物5、水性媒体を調製容器に入れる順番は、特に限定されない。外殻材料および薬物5を水性媒体に溶解させる方法としては、例えば、攪拌子による攪拌、超音波処理等を用いることができる。

【0121】

薬物5としては、前述した遺伝子、薬剤等が使用される。調製される第1の溶液10に

50

含まれる薬物 5 の含有量は、0.1 ~ 50 wt % であるのが好ましく、20 ~ 50 wt % であるのがより好ましい。これにより、製造される分子標的薬バブル 1 に十分な量の薬物 5 を含ませることができる。その結果、患部に対する治療効果がより優れた分子標的薬バブル 1 を製造することができる。

【0122】

このようにして調整された第 1 の溶液 10 を用いて、前述した第 1 実施形態と同様に、工程 (S2) ~ (S5)、または工程 (S2) ~ (S4) を行った後に、工程 (S6) を行い、その後、工程 (S5) を行うことにより、製造容器 20 内に均一なサイズの分子標的薬バブル 1 (図 5 (a) および図 5 (b) 参照) を多量に安定的に製造することができる。また、同時に、均一なサイズの分子標的薬バブル 1 を多量に含有する製造容器 20 が得られる。

10

【0123】

本実施形態では、分子標的薬バブル 1 (外殻 2) 内には、工程 (S3) において第 1 の溶液 10 中に微分散または溶解したガス 3、および工程 (S4) の振動により第 1 の溶液 10 に微分散または溶解したガス 3、薬物 5 が含まれる。その結果、生成される分子標的薬バブル 1 (バブル 100) は、薬物 5 がガス 3 とともに外殻 2 内に封入され、または、外殻 2 自体に含有または吸着している。

【0124】

かかる第 2 実施形態の分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法によっても、前記第 1 実施形態の分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法と同様の作用・効果を生じる。

20

【0125】

以上、本発明の分子標的薬バブルおよび分子標的薬バブルの製造方法を図示の実施形態に基づいて説明したが、本発明は、これに限定されるものではなく、各工程は、同様の機能を発揮し得る任意の工程と置換することができる。

【実施例】

【0126】

次に、本発明の具体的実施例について説明する。

1. 分子標的薬バブルの製造

(実施例 1)

30

[準備工程]

まず、調整容器としての 15 ml のバイアル瓶に、アルブミンが 250 mg/ml 含まれるアルブミン溶液 (CSL Behring 社製 アルブミン 25%) 120 μ l と、25% リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 12 ml とを入れた。その後、アルブミン溶液と 25% PBS とを攪拌することにより、第 1 の溶液を得た。なお、第 1 の溶液中のアルブミン濃度は、0.25% であった。また、第 2 の溶液として、セツキシマブを有効成分とするアービタックス注射液 100 mg (メルクセローノ社製、抗悪性腫瘍剤 抗ヒト EGFR モノクローナル抗体) を準備した。また、製造容器としての 2 ml のバイアル瓶 (高さ X: 45 mm、外径 R: 13 mm) を準備した。なお、このバイアル瓶は、図 3 に示す製造容器 20 と同様の形状をなしている。

40

【0127】

[第 1 の溶液を容器に注入する工程]

2 ml バイアル瓶内に、第 1 の溶液 700 μ l を注入した。なお、第 1 の溶液の液面の高さ Y は、25 mm であった。

【0128】

[容器を密閉する工程]

次に、第 1 の溶液が注入されたバイアル瓶内の空隙をパーフルオロプロパンでパージした後、バイアル瓶の瓶口に図 3 に示す蓋 22 と同様の形状の蓋を挿着した。次に、パーフルオロプロパンが充填された注射器を準備した。注射器の注射針で蓋のゴム栓を刺通して、注射器からバイアル瓶内にさらに 1 ml のパーフルオロプロパンを加えた。これにより

50

、内部の圧力が1.3 atmの密閉バイアル瓶を得た。

【0129】

[容器を振動させる工程]

次に、bertin Technologies社製のPrecellys（高速細胞破碎システム）を用いて、密閉バイアル瓶を、6500 rpmで10秒間振動後に20秒間静置させるプロセスを1サイクルとした。このプロセスを6回行うことにより、バイアル瓶を振動させた。その際、密閉バイアル瓶は、上下方向に往復運動し、第1の溶液がバイアル瓶の上下面に繰り返し衝突することを確認した。なお、密閉バイアル瓶を振動させる際に、密閉バイアル瓶の長手方向（鉛直方向）の振動幅は、40 mmであり、密閉バイアル瓶の短手方向（水平方向）の振動幅は、20 mmであった。上記条件に設定することにより、いずれのバイアル瓶についても、バイアル瓶と水性液体との瞬間相対速度が40 km/h以上となるようにした。

10

【0130】

[第1の溶液と第2の溶液とを混合する工程]

振動後、密閉バイアル瓶の蓋を外し、第2の溶液としてのアービタックス注射液100 mgの700 µlをバイアル瓶内に注入した。これにより、第1の溶液と第2の溶液とが混合し、バブルの表面にセツキシマブが付着した分子標的薬バブルを含む混合液（バブル含有液）を得た。

【0131】

上記のようにして得られた混合液をバイアル瓶から注射器で取出した。次に、バブル測定装置（大塚電子製 粒径・ゼータ電位・分子量測定システム ELSZ-2000）を用いて、混合液に含まれる分子標的薬バブル（外殻）のバブル径分布測定を行ったところ、その平均径は、1 µm程度であった。また、得られた分子標的薬バブル中のアルブミンとセツキシマブとの重量比率は、100 : 1 ~ 6 : 4 の関係を満たしていた。

20

【0132】

（実施例2）

第2の溶液を容器に注入する工程において、バイアル瓶に注入するアービタックス注射液100 mgの注入量を1050 µlに変更した以外は、前記実施例1と同様にして、分子標的薬バブルを含む混合液を得た。また、得られた分子標的薬バブル中のアルブミンとセツキシマブとの重量比率は、100 : 1 ~ 6 : 4 の関係を満たしていた。

30

【0133】

（実施例3）

第1の溶液を準備する工程において、25%リン酸緩衝生理食塩水（PBS）の使用量を12 mlから120 mlに変更して第1の溶液を調製した以外は、前記実施例1と同様にして、第1の溶液が密閉されたバイアル瓶を振動させて、密閉バイアル瓶内にバブルを生成した。

[遠心分離工程]

次に、振動後の密閉バイアル瓶に対して、微量高速冷却遠心機（トミー精工社製、「TOMY MX-301」）を用いて、1200 rpmで5分間遠心分離処理を行った。この遠心分離処理により、バブルを含有する第1の液体は、バイアル瓶の上側に濃い白濁部分と、バイアル瓶の中間に薄い白濁部分と、バイアル瓶の下側にほぼ透明な部分との3つの部分に分離された。次に、マイクロピペットにより、バイアル瓶の上側の濃い白濁部分を吸引して除去した。その後、他のマイクロピペットを、その先端がバイアル瓶の底付近に到達するように、バイアル瓶に挿入し、バイアル瓶の下側のほぼ透明な部分を吸引して、遠心分離後の第1の液体を得た。

40

上記工程を繰り返し、バブルを含有する遠心分離後の第1の液体を1200 µl準備した。

[第1の溶液と第2の溶液とを混合する工程]

次に、他のバイアル瓶を準備し、遠心分離後の第1の液体1200 µlと、第2の溶液としてのアービタックス注射液100 mgの1800 µlを他のバイアル瓶内に注入した

50

。これにより、第1の溶液と第2の溶液とが混合し、バブルの表面にセツキシマブが付着した分子標的薬バブルを含む混合液（バブル含有液）を得た。

なお、本実施例では、第1の溶液中のアルブミン濃度が0.025%であった。また、得られた分子標的薬バブル中のアルブミンとセツキシマブとの重量比率は、100:1~6:4の関係を満たしていた。

【0134】

（比較例1）

アービタックス注射液100mgを用いることなく、容器を振動させる工程後のバイアル瓶内の第1の溶液を得た。この第1の溶液内には、バブル（アルブミンバブル）が生成しており、その平均径は1 μ m程度であった。

【0135】

2-1. バブル径分布評価（1）

上記のようにして得られた実施例1、実施例2および比較例1の分子標的薬バブルまたはバブルについて、上記バブル測定装置を用いて測定されたバブル径分布を図6に示す。なお、図6には、参考のため、アービタックス注射液100mgの使用量を350 μ lに変更した以外は、前記実施例1と同様にして作成した参考例の分子標的薬バブルのバブル径分布を併せて示す。

【0136】

図6に示すように、分子標的薬（アービタックス注射液100mg）の投入量が多い実施例2では、その他の、分子標的薬バブルまたはバブルに比べて、大きなバブル径を有する分子標的薬バブルが多量に存在していることが分かった（図6中、矢印部分参照）。分子標的薬の投入量を増やすことにより、バブルの外殻に付着する分子標的薬の量が増加するため、サイズの大きい分子標的薬バブルが生成したと推測される。

【0137】

2-2. バブル径分布評価（2）

実施例3について、遠心分離直後の第1の液体、および、最終的に得られる分子標的薬バブルのバブル径分布を、ナノ粒子解析システム（商品名：nanosight）を用いて測定した。その結果を、図8に示す。なお、図8（a）は、実施例3における、遠心分離直後の第1の液体のバブル径分布を示すグラフである。図8（b）は、実施例3の分子標的薬バブルのバブル径分布を示すグラフである。

実施例3では、第1の溶液中のアルブミン濃度が極めて低い（0.025%）にもかかわらず、平均バブル径が285.3nm程度の分子標的薬バブルを安定的に得ることができた。また、バブルを含有する遠心分離後の第1の液体の平均バブル径が269.9nm程度であり、分子標的薬を含む第2の液体を第1の液体に注入する工程の前後で、平均バブル径に大きな差は生じないことが分かった。

【0138】

3. 細胞殺傷効果の評価

上記のようにして得られた実施例および比較例について、ヒト由来の口腔扁平上皮癌細胞株であるHSC-2に対する癌細胞殺傷効果を、以下のようにして評価した。

【0139】

まず、4つの超音波プローブの音響放射面上にエコーゲルを塗布した後、24ウェル細胞培養用プレートを配置した。次に、4つの超音波プローブに対応する位置にある4つのウェル上にHSC-2を播種した。次に、HSC-2が播種された4つのウェル上に、第1実施形態の試料100 μ lを添加した。その後、超音波プローブを起動して、周波数：1.011MHz、音響強度：725mW/cm²、パルス繰り返し周波数：10Hz、デューティー比：50%、照射時間：15秒の条件で、4つのウェルに対して超音波処理を行った。その後、4つのウェル上に死滅したHSC-2細胞を染色するトリパンブルー15 μ lを添加した。その後、HSC-2の生存率を、セルカウンター（TC20 Bio Rad社製）を用いて測定した。また、比較例1について、実施例1と同様にして、HSC-2の生存率を測定した。

10

20

30

40

50

【0140】

また、実施例2および比較例1について、4つのウェル上に添加する試料の量を150μlに変更した以外は、前記実施例1と同様にして、HSC-2の生存率を測定した。

以上のようにして評価した結果を図7に示す。

【0141】

図7は、実施例および比較例について、口腔扁平上皮癌細胞HSC-2の細胞殺傷率を示すグラフである。

【0142】

図7に示すように、実施例1および2の分子標的薬パブルは、比較例1で得られたアルブミンパブルに比べて、その細胞殺傷効果が優れていた。より具体的には、各ウェルに100μlを添加した、実施例1と比較例1との比較から、実施例1では、比較例1よりも約12%の細胞生存率の減少が認められた。また、各ウェルに150μlを添加した、実施例2と比較例1との比較から、実施例2では、比較例1よりも約19%の細胞生存率の減少が認められた。この結果から、分子標的薬(アービタックス注射液100mg)の濃度が高いほど、細胞殺傷効果が高くなることが分かった。なお、アービタックス注射液100mgを、各ウェルに100μlおよび150μl添加して、前記実施例1と同様の評価を行ったところ、十分な細胞殺傷効果は認められなかった。このことから、本発明の分子標的薬パブルは、治療用超音波を照射して、外殻(パブル)を破裂させることにより、分子標的薬が患部の癌細胞に供給されるとともに、癌細胞の一部を破壊して、患部の治療効果を高めることができることが分かった。

10

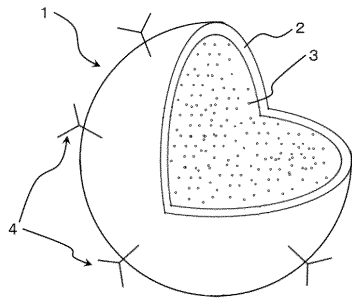
20

【符号の説明】

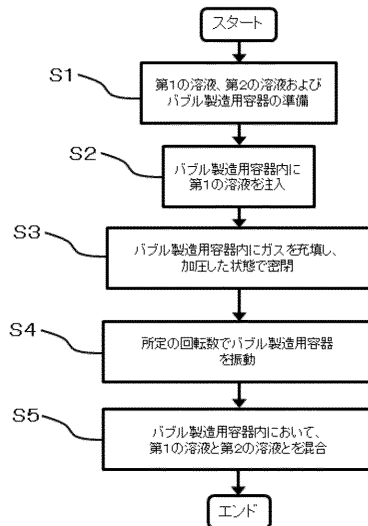
【0143】

1...分子標的薬パブル 100...パブル 2...外殻 3...ガス 4...分子標的薬 5...薬物 10...第1の溶液 11...空隙部 12...混合液 20...製造容器 21...容器本体 22...蓋 221...ゴム栓 222...締付部

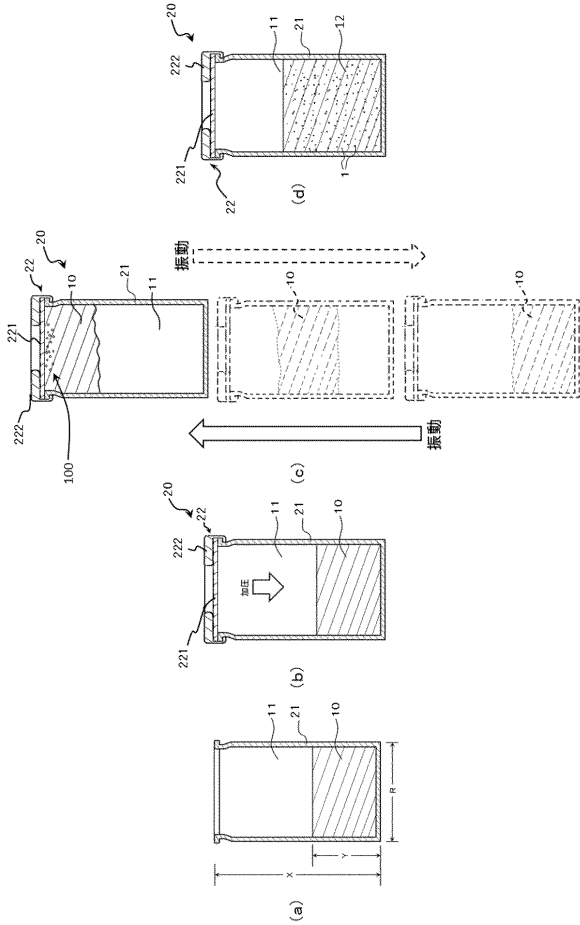
【図1】



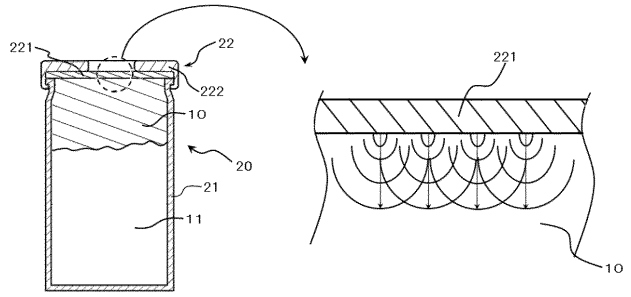
【図2】



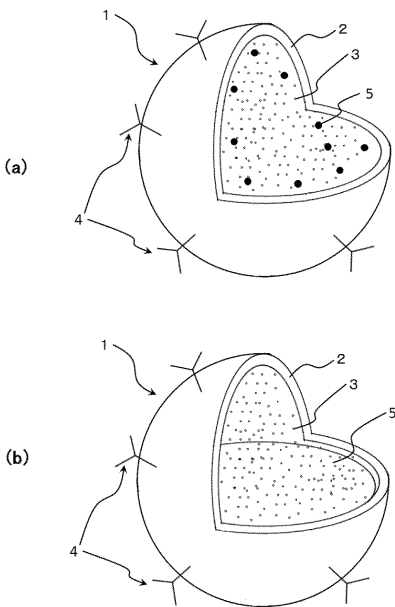
【 図 3 】



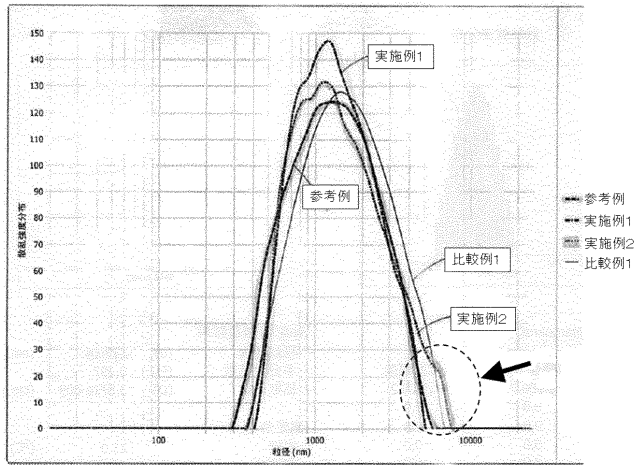
【 図 4 】



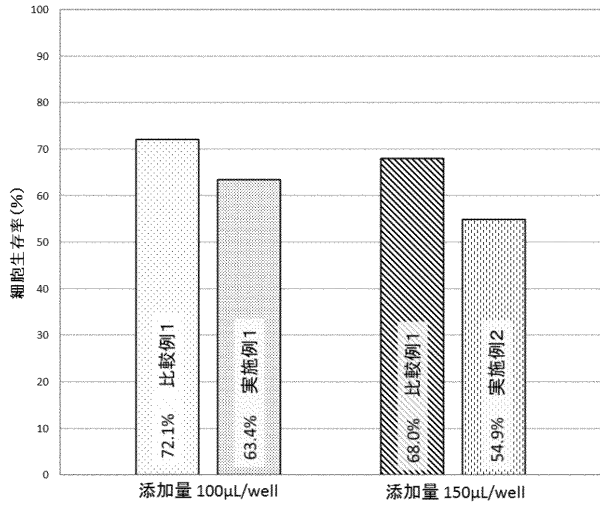
【 図 5 】



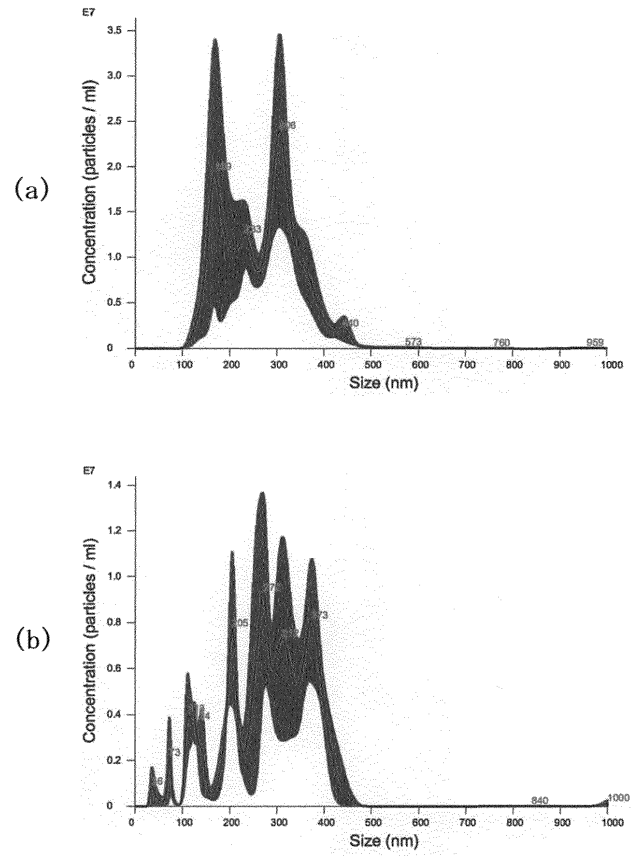
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395		T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		

Fターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB13 CC27 CC29 DD21 DD34 DD35 EE41A GG21
4C084 AA03 AA17 MA05 MA24 MA66 NA13 ZB262 ZC412
4C085 AA14 EE01 GG02