

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4004063号

(P4004063)

(45) 発行日 平成19年11月7日(2007. 11. 7)

(24) 登録日 平成19年8月31日(2007. 8. 31)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 9/127 (2006. 01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 49/00 (2006. 01)	A 6 1 K 49/00 C
G O 1 R 33/28 (2006. 01)	G O 1 N 24/02 Y
A 6 1 B 5/055 (2006. 01)	A 6 1 B 5/05 3 8 3
A 6 1 J 1/00 (2006. 01)	A 6 1 J 1/00 3 5 3
請求項の数 20 (全 27 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願平8-510174	(73) 特許権者	イマアーレクス・フアーマシューチカル・コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成7年7月26日(1995. 7. 26)		アメリカ合衆国アリゾナ州85749トウーソン・イーストエイティーンズストリート1635
(65) 公表番号	特表平10-505900	(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉
(43) 公表日	平成10年6月9日(1998. 6. 9)		
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/009392	(72) 発明者	アンガー, エバン・シー
(87) 国際公開番号	W01996/008234		アメリカ合衆国アリゾナ州857494トウーソン・イーストカミノラセバディラ13365
(87) 国際公開日	平成8年3月21日(1996. 3. 21)	(72) 発明者	マツナガ, テリー・オー
審査請求日	平成14年7月15日(2002. 7. 15)		アメリカ合衆国アリゾナ州85710トウーソン・サウスフロントロイヤル751
(31) 優先権主張番号	08/307, 305		最終頁に続く
(32) 優先日	平成6年9月16日(1994. 9. 16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 診断および治療的応用に使用するための多一相組成物を有する容器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性脂質懸濁組成物と実質的に不溶性のガスとが容器中に無菌的に密閉されており、かつ、該水性脂質懸濁組成物がリン脂質を含んでおり、使用前の該密閉状態での攪拌により該水性脂質懸濁組成物と該不溶性のガスからガス充填リポソームが生成されることを特徴とする、コントラスト剤として使用するためのガス充填リポソームを生成するための製剤。

【請求項 2】

容器が可溶性ガスをさらに含む、請求項 1 記載の製剤。

【請求項 3】

実質的に不溶性のガスがサルファヘキサフルオリド、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロペンタンおよびペルフルオロメタンから成る群から選択される、請求項 1 または 2 記載の製剤。

【請求項 4】

実質的に不溶性のガスがペルフルオロプロパンおよびペルフルオロブタンから成る群から選択される、請求項 3 記載の製剤。

【請求項 5】

実質的に不溶性のガスがペルフルオロプロパンである、請求項 4 記載の製剤。

【請求項 6】

可溶性ガスが空気、酸素、二酸化炭素および窒素から成る群から選択される、請求項 2 ～

10

20

5 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 7】

リン脂質がホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸から成る群から選択される請求項 1～6 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 8】

リン脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジン酸およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンから成る群から選択される、請求項 7 記載の製剤。

【請求項 9】

水性脂質懸濁組成物が標的化リガンドをさらに含む、請求項 1～8 のいずれかに記載の製剤。 10

【請求項 10】

水性脂質懸濁組成物が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジン酸およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン－PEG5000を含む、請求項 1～9 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 11】

水性脂質懸濁組成物が、約82%:10%:8%のモルパーセント比のジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジン酸およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン－PEG5000を含む、請求項 10 記載の製剤。

【請求項 12】

水性脂質懸濁組成物が懸濁剤をさらに含む、請求項 1～11 のいずれかに記載の製剤。 20

【請求項 13】

水性脂質懸濁組成物が粘性改質剤をさらに含む、請求項 1～12 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 14】

粘性改質剤がグリセロール、プロピレングリコールおよびポリビニルアルコールから成る群から選択される、請求項 13 記載の製剤。

【請求項 15】

水性脂質懸濁組成物が治療薬または診断薬をさらに含む、請求項 1～14 のいずれかに記載の製剤。 30

【請求項 16】

診断薬がMRIコントラスト増強剤である、請求項 15 記載の製剤。

【請求項 17】

MRIコントラスト増強剤が常磁性イオンである、請求項 16 記載の製剤。

【請求項 18】

水性脂質懸濁組成物がポリマーをさらに含む、請求項 1～17 のいずれかに記載の製剤。

【請求項 19】

ポリマーがポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン脂肪酸ポリマーを含んでなる、請求項 18 記載の製剤。

【請求項 20】

ポリマーがポリエチレングリコールである、請求項 18 記載の製剤。 40

【発明の詳細な説明】

関連出願

本出願は、1993年11月30日に出願された米国特許出願第159,687号の一部継続出願であり、次にこれは1993年6月11日に出願された米国特許出願第076,239号の一部継続出願であり、次にこれは両方とも1991年6月18日に出願された米国特許出願第717,084号および同716,899号の一部継続出願であり、次にこれらは1990年8月20日に出願された米国特許出願第569,828号の一部継続出願であり、次にこれは1989年12月22日に出願された米国特許出願第455,707号の一部継続出願である。

また本出願は、1993年11月30日に出願された米国特許出願第160,232号の一部継続出願で 50

あり、次にこれは1993年6月11日に出願された米国特許出願第076,250号の一部継続出願であり、次にこれは両方とも1991年6月18日に出願された米国特許出願第717,084号および同716,899号の一部継続出願であり、次にこれらは1990年8月20日に出願された米国特許出願第569,828号の一部継続出願であり、次にこれは1989年12月22日に出願された米国特許出願第455,707号の一部継続出願である。

さらに本出願は、1994年3月11日に出願された米国特許出願第212,533号の一部継続出願であり、次にこれは両方とも1993年6月11日に出願された米国特許出願第076,239号および同076,250号の一部継続出願である。米国特許出願第076,239号および076,250号の親出願は、上記に説明する。

これら各出願の優先権はこれにより請求され、そして各々の開示は全部、引用により本明細書に編入する。

発明の背景

超音波は他の診断法に優る、多数の重要な意味のある利点を提供する診断造影法である。核医学およびX線のような造影法とは異なり、超音波は患者をイオン化照射の有害作用に暴露しない。さらに、超音波は比較的高価ではなく、そして移動式の検査として行うことができる。

超音波造影では、音響が患者または動物に変換器を介して伝達する。音波が体内を通して伝わる時、それらは組織および流体からの界面と会う。体内の組織および流体の音響特性に応じて、超音波の音波は一部または全部反射するか、または吸収される。音波が界面により反射される時、それらは変換器中の受信器により検出され、そして画像を作成するように処理される。体内の組織および流体の音響特性は、生成した画像に現れるコントラストを決定する。

磁気共鳴造影(MRI)は比較的新しい造影法であり、これはX線とは異なり、イオン化照射を利用しない。コンピューター連動断層撮影法のように、MRIは身体の断面画像を作成できるが、MRIには任意の走査平面(中心面、冠状面、矢状面または直交面)で画像を作成できるという更なる利点がある。

MRIは磁場、高周波エネルギーおよび磁場勾配を利用して、身体の画像を作成する。組織間のコントラストおよび信号強度の差異は、主に組織のT1およびT2緩和値、およびプロトン密度(実際には、遊離水含量)を反映している。

近年、診断用超音波およびMRI法は進歩した。しかし、種々の技術的改良にもかかわらず、超音波およびMRIは多くの観点で、特に肝臓および脾臓、腎臓、心臓および血流測定を含む脈管の疾患の造影および検出に関して、未だに不完全な道具である。これらの領域を検出し、そしてそのような測定を行う能力は、組織または流体と周辺の組織または流体との間の音響特性(超音波)またはT1およびT2信号強度(MRI)の差異に依存する。したがって、組織または流体と周辺の組織または流体との間のこれらの差異を増加させ、そして超音波および磁気共鳴造影および疾患の検出を向上させるコントラスト剤が熟考された。このような努力の結果、新規で、かつより良いコントラスト剤が開発された。これにもかかわらずそのような多くのコントラスト剤で再度生じた問題の1つは、長期の保存に問題を生じる使用期限の安定性であった。

本発明は、超音波または磁気共鳴造影法のような応用、ならびに他の使用に応用するための優れたガス-充填リポソームコントラスト剤を、使用前に攪拌して作成する、水性の脂質懸濁液相および実質的に水性の脂質懸濁液相とは分離されているガス相を含んで成る便利な容器を提供することにより、これらの、および他の関心事を取扱う。そのようなコントラスト剤は使用直前に調製されるので、使用期限の安定性の問題が回避される。

発明の要約

本発明は、(i)水性の脂質懸濁液相および(ii)水性の脂質懸濁液相とは実質的に分離しているガス相を含んで成る容器を提供する。使用前に、容器中の内容物を攪拌し、これにより例えば超音波または磁気共鳴造影、ならびに治療的応用に使用するためのコントラスト剤として優れた利用性を有するガス-充填リポソーム組成物を作成できる。使用直前にコントラスト剤を調製するための本発明の能力は、多くの従来のコントラスト剤で経験

10

20

30

40

50

するような使用期限の安定性の問題を回避する。本発明の自蔵式ユニットは、容易な滅菌が可能である。

本発明のこれらの、および他の観点および利点は、以下でさらに詳細に考察する。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、脂質の水性懸濁液および実質的に分離されているガスの頭隙を満たした容器の横断面である。

図 2 は、図 1 の容器を攪拌するために使用できる攪拌デバイスの図解であり、これにより水性脂質懸濁液およびガスを混合し、そして超音波または磁気共鳴造影用のコントラスト剤を生成する。

図 3 は、図 1 に示す容器および図 2 に示す攪拌デバイスを使用して生成したガスー充填リポソームの顕微鏡写真である。 10

発明の詳細な説明

本発明の容器は、水性脂質懸濁液相および実質的に分離しているガス相を含んで成る。使用前に、この容器および内容物を攪拌し、脂質およびガス相を混合して、ガスを封入したガスー充填リポソームを生成することができる。生成したガスー充填リポソームは、特に超音波または磁気共鳴造影を使用する診断造影用の優れたコントラスト増強剤を提供する。

広範な脂質を、水性脂質懸濁液相に使用できる。所望により、脂質は飽和または不飽和であってよく、そして直鎖または分枝状でよい。そのような脂質は例えば、好ましくは約 12 個の炭素原子から約 22 個の炭素原子の間の広い範囲の炭素原子を含む脂肪酸分子を含んで成ることができる。イソプレノイド単位、フェニル基および／またはステロール部分（例えばコレステロール、硫酸コレステロールおよびその同族体）から成る炭化水素基も、同様に使用できる。脂質は両親媒性ポリマー ポリエチレングリコール（PEG）もしくはポリビニルピロリドン（PVP）またはその誘導体（インビボ ターゲッティング用に）のようなポリマー鎖、またはポリリシンもしくはポリアルギニンのような荷電アミノ酸（負に荷電した化合物に結合するために）、または米国特許第 4,310,505 号明細書に記載されたような炭化水素（インビボ ターゲッティング用に）、または糖脂質（インビボ ターゲッティング用に）、または抗体および他のペプチドおよびタンパク質（インビボ ターゲッティング用に）等を、所望により有するものでよい。そのようなターゲッティング用または結合用化合物を、単に水性脂質懸濁液相に加えるか、または脂質に特別に化学的に付加することができる。脂質はまた、それ自体が薬剤、遺伝物質または他の治療物質のような他の化学的に結合できるように、所望によりアニオン性またはカチオン性脂質であってよい。 20 30

適当な脂質および特に適当な脂質の種類例には；ジオレオイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）およびジステアロイルホスファチジルコリンのようなホスファチジルコリン；ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび N-スクシニル-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンのようなホスファチジルエタノールアミン；ホスファチジルセリン；ホスファチジルグリセロール；スフィンゴリピッド；ガングリオシド GM1 のようなグリコリピッド；グルコリピッド；スルファチド；グリコスフィンゴリピッド；ジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）のようなホスファチジン酸；パルミチン脂肪酸；ステアリン脂肪酸；アラキドン脂肪酸；ラウリン脂肪酸；ミリスチン脂肪酸；ラウロレイン脂肪酸；フィゼテリン脂肪酸；ミリストオレイン脂肪酸；パルミトレイン脂肪酸；ペトロセリン脂肪酸；オレイン脂肪酸；イソラウリン脂肪酸；イソミリスチン脂肪酸；イソパルミチン脂肪酸；イソステアリン脂肪酸；コレステロールおよびコレステロールヘミスクシネート、コレステロールサルフェートおよびコレステリル-(4'-トリメチルアンモニオ)-ブタノエートのようなコレステロール誘導体；ポリオキシエチレン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレン脂肪酸アルコール；ポリオキシエチレン脂肪酸アルコールエーテル；ポリオキシエチレン化ソルビタン脂肪酸エステル；グリセロール ポリエチレングリコール オキシステアレート；グリセロール ポリエチレングリ 40 50

コール リシノレート；エトキシ化大豆ステロール；エトキシ化ひまし油；ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン脂肪酸ポリマー；ポリオキシエチレン脂肪酸ステアレート；12-(((7'-ジエチルアミノクマリン-3-イル)-カルボニル)-メチルアミノ)-オクタデカン酸；N-[12-(((7'-ジエチルアミノ-クマリン-3-イル)-カルボニル)-メチル-アミノ)-オクタデカノイル]-2-アミノ-パルミチン酸；1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール；1,2-ジパルミトイル-sn-3-スクシニルグリセロール；1,3-ジパルミトイル-2-スクシニル-グリセロール；ならびに1-ヘキサデシル-2-パルミトイル-グリセロホスホエタノールアミンおよびパルミトイルホモシステイン；ラウリルトリメチルアンモニウム ブロミド(ラウリル-＝ドデシル-)；セチルトリメチルアルモニウムブロミド(セトリル-＝ヘキサデシル-)；ミリスチルトリメチルアンモニウム ブロミド(ミリスチル-＝テトラデシル-)；アルキルがC₁₂、C₁₄またはC₁₆アルキルであるようなアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ベンジルジメチルドデシルアンモニウム ブロミド；ベンジルジメチルドデシルアンモニウム クロライド、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム ブロミド；ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウム クロライド；ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム ブロミド；ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム クロライド；セチルジメチルエチルアンモニウム ブロミド；セチルジメチルエチルアンモニウム クロライド；セチルピリジニウム ブロミド；セチルピリジニウム クロライド；N-[1-2,3-ジオレオイルオキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム クロライド(DOTMA)；1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)；および1,2-ジオレオイル-e-(4'-トリメチルアンモニオ)-ブタノイル-sn-グリセロール(DOTB)を含む。

10

20

当業者はいったん本開示事項を身に付すれば明らかであるように、前述の脂質の一覧は例示であり、そして他の有用な脂質、脂肪酸および誘導体ならびにそれらの組み合わせを使用でき、そしてそのようなさらなる化合物も本明細書で使用する用語、脂質の範囲内にあるものとする。当業者はそのような脂質および／またはそれらの組み合わせが、容器を攪拌したときに、ガス相からガスをその内部空間に封入するリポソーム（すなわち、内部空間を有する脂質球）を形成することを認識するだろう。このリポソームは1つの脂質相（脂質単層）、2つの脂質相（脂質二重層）または2つより多くの脂質層（脂質多重層）から成ることができる。

一般的に、ゲル状である脂質が好ましく、すなわち特に攪拌中は、脂質物質のゲル状態から液体結晶状態への相転移温度（T_m）未満が好ましい。種々の脂質のゲル状態から液体結晶状態への相転移温度は周知である。そのような温度は、周知技法により容易に算出することもできる。以下の表1は、Derek Marsh, “CRC 脂質二重層のハンドブック(CRC Handbook of Lipid Bilayers)”, 第139頁、CRC出版、ボカ ラトン、フロリダ州(1990)の引用であるが、例えば種々の代表的な飽和ホスホコリン脂質に関して、主鎖の相転移温度を表している。

30

表 1

飽和 ジアシル-sn-グリセロ-(3)-ホスホコリン:

主鎖の融解転移

#アシル鎖中の炭素	主相転移温度℃
1, 2-(12:0)	-1.0
1, 2-(13:0)	13.7
1, 2-(14:0)	23.5
1, 2-(15:0)	34.5
1, 2-(16:0)	41.4
1, 2-(17:0)	48.2
1, 2-(18:0)	55.1
1, 2-(19:0)	61.8
1, 2-(20:0)	64.5
1, 2-(21:0)	71.1
1, 2-(22:0)	74.0
1, 2-(23:0)	79.5
1, 2-(24:0)	80.1

本発明の好適な態様では、水性脂質相はさらにポリマー、好ましくは両親媒性ポリマー、そして好ましくは脂質に直接結合している（すなわち、化学的に結合している）ポリマーを含んで成る。好ましくは両親媒性ポリマーは、ポリエチレングリコールまたはその誘導体である。最も好ましい組み合わせは、ポリエチレングリコール（PEG）、特に平均分子量が約5,000のPEGに結合した脂質ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）である（DPPE-PEG5000）。PEGまたは他のポリマーは、DPPEまたは他の脂質に、アミド、カルバメートまたはアミン結合のような共有結合を介して結合できる。あるいは、エステル、エーテル、チオエステル、チオアミドまたはジスルフィド（チオエステル）結合をPEGまたは他のポリマーと共に使用して例えば、ポリマーをコレステロールまたは他のリン脂質に結合できる。特に好適な脂質の組み合わせは、DPPC、DPPE-PEG5000およびDPPA、特に約82%:8%:10%（モル%）比のDPPC:DPPE-PEG5000:DPPAである。

水性相を調製するために、脂質を水（好ましくは蒸留水）、通常の（生理的）塩溶液、リン酸緩衝化塩溶液または当業者には周知な他の水性を基本とする溶液と混合することができる。

広範な種々のガスを、本発明のガス相に使用できる。好ましくはガスは水性の脂質懸濁相中で実質的に不溶性である。実質的に不溶性とは、ガスが20℃、そして1気圧の水中で溶解度を約18mlのガス/kg水以下に維持することを意味する。このように、実質的に不溶性のガスは窒素ガスよりも低い溶解度を有する。好ましくは溶解度は20℃かつ1気圧で、約15mlガス/kg水以下であり、より好ましくは約10mlガス/kg水以下である。1つの好適な種類のガスでは、上記温度および圧力で溶解度は約0.001から約18mlのガス/kg水の間、または約0.01から約15mlのガス/kg水の間、または約0.1から約10mgのガス/kg水の間、または約1から約8mgのガス/kg水の間、または約2-6ml/kg水の間である。ペルフルオロカーボンガスおよびフッ素化ガスサルファヘキサフルオリドは、例えば20℃および1気圧で、10mlのガス/kg水よりも溶解度が低く、したがって好ましい。本明細書で定義するよう

10

20

30

40

50

な実質的に不溶性ではないガスは、可溶性ガスと言う。

他の適当な実質的に不溶性または溶解性のガスは、限定するわけではないがヘキサフルオロアセトン、イソプロピルアセチレン、アレン、テトラフルオロアレン、三弗化ホウ素、1,2-ブタジエン、1,3-ブタジエン、1,2,3-トリクロロブタジエン、2-フルオロ-1,3-ブタジエン、2-メチル-1,3-ブタジエン、ヘキサフルオロ-1,3-ブタジエン、ブタジイン、1-フルオロブタン、2-メチルブタン、デカフルオロブタン（ペルフルオロブタン）、デカフルオロイソブタン（ペルフルオロイソブタン）、1-ブテン、2-ブテン、2-メチル-1-ブテン、3-メチル-1-ブテン、ペルフルオロ-1-ブテン、ペルフルオロ-1-ブテン、ペルフルオロ-2-ブテン、4-フェニル-3-ブテン-2-オン、2-メチル-1-ブテン-3-イン、硝酸ブチル、1-ブチン、2-ブチン、2-クロロ-1,1,1,4,4,4-ヘキサフルオロブチン、3-メチル-1-ブチン、ペルフルオロ-2-ブチン、2-プロモ-ブチルアルデヒド、カルボニルスルフィド、クロトノニトリル、シクロブタン、メチルシクロブタン、オクタフルオロシクロブタン（ペルフルオロシクロブタン）、ペルフルオロイソブタン、3-クロロシクロペンテン、シクロプロパン、1,2-ジメチルシクロプロパン、1,1-ジメチルシクロプロパン、エチルシクロプロパン、メチルシクロプロパン、ジアセチレン、3-エチル-3-メチルジアジリジン、1,1,1-トリフルオロジアゾエタン、ジメチルアミン、ヘキサフルオロジメチルアミン、ジメチルエチルアミン、ビス-(ジメチルホスフィン)アミン、2,3-ジメチル-2-ノルボルナン、ペルフルオロジメチルアミン、ジメチルオキソニウム クロライド、1,3-ジオキソラン-2-オン、1,1,1,1,2-テトラフルオロエタン、1,1,1-トリフルオロエタン、1,1,2,2-テトラフルオロエタン、1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタン、1,1-ジクロロエタン、1,1-ジクロロ-1,2,2,2-テトラフルオロエタン、1,2-ジフルオロエタン、1-クロロ-1,1,2,2,2-ペンタフルオロエタン、2-クロロ-1,1-ジフルオロエタン、1-クロロ-1,1,2,2-テトラフルオロエタン、2-クロロ-1,1-ジフルオロエタン、クロロエタン、クロロペンタフルオロエタン、ジクロロトリフルオロエタン、フルオロエタン、ニトロペンタフルオロエタン、ニトロソペンタフルオロ-エタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロエチルアミン、エチルビニルエーテル、1,1-ジクロロエチレン、1,1-ジクロロ-1,2-ジフルオロ-エチレン、1,2-ジフルオロエチレン、メタン、メタン-スルホニル-クロライド-トリフルオロ、メタン-スルホニル-フルオリド-トリフルオロ、メタン-(ペンタフルオロチオ)トリフルオロ、メタン-プロモ-ジフルオロ-ニトロソ、メタン-プロモ-フルオロ、メタン-プロモ-クロロ-フルオロ、メタン-プロモ-トリフルオロ、メタン-クロロ-ジフルオロ-ニトロ、メタン-クロロ-ジニ
 10
 20
 30
 40
 50

ルオリド、サルファ（ジ）-デカフルオロ (S_2F_{10})、トルエン-2,4-ジアミノ、トリフルオロアセトニトリル、トリフルオロメチルペルオキシド、トリフルオロメチルスルフィド、六弗化タンダステン、ビニルアセチレン、ビニルエーテル、ネオン、ヘリウム、クリプトン、キセノン（特にルビジウム リッチ 過分極化キセノンガス）、二酸化炭素、ヘリウムおよび空気を含む。フッ素化ガス（すなわち、サルファヘキサフルオリドのような1つ以上のフッ素分子を含むガス）、フルオロカーボンガス（すなわち、フッ素化炭素またはガスであるフッ素化ガス）、およびペルフルオロカーボンガス（すなわち、ペルフルオロプロパンおよびペルフルオロブタンのような完全にフッ素化されたフルオロカーボンガス）が好ましい。

本発明のガス相中にほとんどすべてのガスを理論的には使用できるが、生成するコントラスト媒質に望まれる特性を最適にするために、そして特定の診断応用に合うように特定のガスを選択できる。例えば、あるガスは他のガスよりも安定なガスー充填リポソームを振盪時に生成し、このようなガスが好ましいと判明した。特定のガスがより良い画像を超音波またはMRIのような診断造影で提供することも判明した。

ガスー充填リポソームの安定性増大の例として、二酸化炭素<酸素<空気<窒素<ネオン=ヘリウム<ペルフルオロカーボン ガスであることが判明した。これらの、ならびに他の理由から、フッ素化ガス、特にペルフルオロカーボンガスが好ましい。

本発明において数種の可溶性ガスがガス相として十分に機能する場合もあるが、特に攪拌によるコントラスト剤の生成時には、実質的に不溶性ガスが高溶解性ガスよりも、より高い安定性を生じる傾向にある。また本発明に従い、そのような不溶性ガスを有するガス相は水性脂質相から攪拌前に実質的に分離しておくことが容易であろう。すなわち、既に定義した実質的に不溶性のガスが好ましい。

超音波画像の質およびその画像の持続時間は、水性環境中でのガスの溶解度と相関する。ガスの溶解度が減少すれば、一般的に超音波ではより良い解像度および長期の継続時間を提供する。

さらに、攪拌で生成するガスー充填リポソームのサイズは、水性環境中でのガスの溶解度と相関し、より大きな溶解度のガスでより大きなガスー充填リポソームが生成することが一般的に観察された。またリポソームのサイズは、ガスとリポソーム内壁との相互作用により影響を受け得ると考えられる。特に、界面での相互作用は張力に影響を及ぼし、その結果、内部ガスのリポソームの内部脂質壁に対する外向きの力に影響を及ぼすと思われる。張力の低下は、内部ガスが作用する力の減少により、より小さいリポソームを可能とし、すなわち水性環境がリポソームの外側に作用する力でガスー充填リポソームを縮ませる。

水性溶媒中のガスの溶解度は、Henryの法則を使用することにより予測でき、なぜならそれは一般的に最高約1気圧まで、かつわずかに可溶性のガスに応用できるからである（Daniels, FおよびAlberty, R.A., 物理化学 (Physical Chemistry)、第3版、ウィリー アンド サンズ社 (Wiley & Sons Inc.)、ニューヨーク、1966)。一例として、大気は25°Cで1kgの水に18.68mlの溶解度を有し、窒素は25°Cで約18.8mlkg⁻¹の溶解度を維持する。一方、サルファーヘキサフルオリドは25°Cで約5.4mlkg⁻¹の溶解度を保持する。

まとめると、フッ素化ガス、フルオロカーボンガスおよびペルフルオロカーボンガスが、安定性、不溶性および生成するリポソームのサイズの点から好ましい。特に好適なものは、フッ素化ガスサルファヘキサフルオリドおよびペルフルオロカーボンガス、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタンおよびペルフルオロペンタン、特にペルフルオロプロパンおよびペルフルオロブタンである。

5個未満の炭素原子を有するペルフルオロカーボンは、室温でガスであることに注目すべきである。例えばペルフルオロペンタンは、約27°Cまで液体である。この温度より高いと、これは容器の頭隙を占めるだろう。しかしペルフルオロペンタンは室温でも頭隙（すなわち、バイアル中の脂質懸濁液相の上）を満たすために使用できることが実証された。頭隙を満たすように算出した液体ペルフルオロペンタンの規定値を選択し、そして液体を容

10

20

30

40

50

器に低温（例えば -20°C ）で加え、そして次に容器を吸引し（頭隙の空気を効果的に除去する）、そして容器の密閉することにより、ペルフルオロペンタンは1気圧で沸点より低い温度で液相から気相へ転移するだろう。すなわち、室温で頭隙の一部または全部がガスで満たされる。当業者には認識できるように、液相から気相への転移温度の減少は、通常の経験則による予想を使用して予測することができる。特に圧力が半分に減少する毎に、沸点は約 10°C 減少する。あるいはBoyleの法則に基づく理想ガスの法則に基づく関係を使用して、圧力低下の関数として温度の低下を算出することができる。頭隙をペルフルオロペンタンで満たすための別の方法は、初めに頭隙を吸引し、そして次に頭隙をペルフルオロペンタンガスを 27°C より高い温度で満たすことである。もちろん、この方法はペルフルオロペンタンだけに限定されず、すべてのペルフルオロカーボンガス、ならびにガスの沸点が知られていればすべてのガスに一般的に応用される。

10

所望により、2種以上の異なるガスを頭隙と一緒に充填するために使用できる。ガスの混合物は、生成するガスー充填リポソームの広範な応用に（超音波造影、MR造影等の応用のような）、多くの利点を有することができる。少量の実質的に不溶性ガスを可溶性ガスと混合して、組み合わせにより予想されるよりも高い安定性を提供することができることが判明した。例えば、少量のペルフルオロカーボンガス（一般的に例えば少なくとも約1モル%で）を、空気、窒素、酸素、二酸化炭素または他のより可溶性ガスと混合できる。攪拌後に生じる、生成したガスー充填リポソームコントラスト剤は、空気、窒素、酸素、二酸化炭素、または他のより可溶性ガス単独よりも安定であり得る。

さらにガスの混合物を使用することは、ガスー充填リポソームのサイズを相補するために使用でき、そうしなければインビボで生じるのはインビボ注入する純粋なペルフルオロカーボンガス含有リポソームである。幾つかのペルフルオロカーボンガスは酸素のような他のガスを吸着または吸収する傾向があることが判明した。したがってもしペルフルオロカーボンガスを静脈に注射すれば、循環している血液中に溶解している酸素または他の可溶性ガスを取り込むことができる。生成する気泡はこの取り込みの結果、インビボで成長できる。この現象の知識を用いて準備すれば、ペルフルオロカーボンガスを空気、窒素、酸素、二酸化炭素のような可溶性ガスと前混合し、これによりペルフルオロカーボンの吸着または吸収特性を飽和させることができる。この結果、これにより血流中でのガスー充填リポソームの膨張の可能性を防ぐまたは排除さえする。これはリポソームが $10\mu\text{M}$ よりも大きなサイズに成長すると、血流中に投与された時に危険な塞栓を生じ得る可能性がある、という事実の観点から極めて重大である。頭隙にペルフルオロカーボンガスよりも可溶性のガスをペルフルオロカーボンガスと一緒に充填することにより、ガスー充填リポソームは一般的にインビボに注入された後にサイズが増すことはない。したがって本発明の結果、リポソームの膨張に由来する塞栓形成の問題は、そのような膨張が排除されるか、または有意に防げるようリポソームを生成することにより回避できる。

20

30

したがって本発明に従い、所望により実質的に不溶性のガスは可溶性ガスと組み合わせて、高度に効果的かつ安定なガスー充填リポソームを効率的に生成できる。

以下の表2は、頭隙ガスとして変動する割合の実質的に不溶性のペルフルオロプロパン（PFP）および空気を使用して調製したガスー充填リポソームの試料分析を提供する。ガスを脂質水性相と、3300RPMで60秒間攪拌することにより混合した。光学整粒器（Optical Particle Sizer、パーティクルサイジングシステムズ:Particle Sizing Systems、サンタバーバラ、カリフォルニア州）を、ガスー充填リポソームのサイズおよび総数を分析するために使用した。5マイクロリットルの試料容量を各分析で使用し、各測定には4つの試料を使用した。

40

表2に示すように、ガスのわずか20%がPFP（実質的な不溶性ガス）であり、そしてガスの80%が空気（可溶性ガスの混合物）であるときでさえ、空気単独（0%PFP）を使用した時に生成したリポソームの100倍以上が生成された。さらに空気単独（0%PFP）を使用した時、リポソームはより一層不安定であり、そしてより大きな画分は10ミクロンより大きかった。しかし20%PFPおよび80%空気のリポソームは、80%PFPおよび20%空気のリポソームならびに他の中間PFP濃度試料と丁度同じように安定であり、そ

50

して80%空気を含む20% P F P のリポソームは、20%空気を含む80% P F P のように多くのガスー充填リポソームを生成した。

表 2

泡のサイズおよび数に対するペルフルオロプロパンの割合の効果

ガス %PFP	数 重量 平均	容 量 重 量 平 均	予想される 粒子数	粒子の割合 <10 μ m	mLあたりの 予想される #粒子の割合	粒子の割合 >10 μ m
80% 平均 STD _{e.v} CV	2.37 0.07 3%	28.76 0.82 3%	5.45E+05 4.67E+04 9%	98.94 0.08 0%	1.10E+09 8.20E+07 7%	1.05 0.07 7%
60% 平均 STD _{e.v} CV	2.14 0.02 1%	20.75 5.93 29%	5.87E+05 7.08E+04 12%	99.36 0.10 0%	1.15E+09 1.27E+08 11%	0.64 0.09 14%
50% 平均 STD _{e.v} CV	2.13 0.07 3%	30.35 12.15 40%	5.23E+05 1.49E+04 3%	99.29 0.11 0%	1.07E+09 4.37E+07 4%	0.68 0.10 15%
20% 平均 STD _{e.v} CV	2.00 0.04 2%	13.64 6.79 50%	5.35E+05 2.26E+04 4%	99.61 0.06 0%	1.07E+09 3.92E+07 4%	0.41 0.07 16%
0% 平均 STD _{e.v} CV	2.30 0.21 9%	93.28 66.05 71%	5.03E+03 4.96E+02 10%	98.23 0.26 0%	1.00E+09 8.60E+05 9%	1.93 0.36 19%

表 2 において、S T D e v = 標準偏差、そして C V = 変動係数。また表 2 において、E + は特定数に関する指数を表し、例えば 5.45E+0.5 = 5.45 $\times$ 10⁵。

要するに、可溶性ガスであるほとんどのガスとともに、わずかに少量の比較的不溶性ガス (P F P のような) が、リポソームを安定化する為に必要であることが分かった。以下の式

$$(\text{溶解度ガスA}) \times (\text{ガスAのモル\%}) + (\text{溶解度ガスB}) \times (\text{ガスBのモル\%})$$

100

により算出できるような2つ以上のガスの組み合わせの効果的溶解度は、可溶性ガスの溶解度とはわずかに異なるだけであるが、わずかに少量不溶性ガスを加えることで、一層高いガスー充填リポソーム数およびガスー充填リポソーム安定性となる。

任意の操作原理に結び付けることを意図するわけではないが、実質的に不溶性のガスは膜安定化効果に重要であると考えられる。事実、実質的に不溶性ガス (P F P のような) は脂質膜に対してバリアーとして作用し、可能であれば膜の内表面上に層を効果的に形成し、こ

れが可溶性ガス（空気、窒素等のような）が出て行くことを遅らせる、と考えられる。この知見はわずかに少量の実質的に不溶性のガス（例えば、ペルフルオロカーボンまたは他のフッ素化ガス）および空気または窒素のような主要なより生物適合性ガス（毒性の可能性が低い）を使用して、ほとんどのリポソーム容量を構成できるので、驚くべきことであり、かつ有用の両方である。

任意の混合物中の実質的に不溶性ガスおよび可溶性ガスの量は、当業者が認識するように大変広範である。しかし典型的には、総ガス量の少なくとも約0.01%が実質的に不溶性ガスであり、より好ましくは少なくとも約0.1%、さらにより好ましくは少なくとも約1%、そして最も好ましくは少なくとも約10%が実質的に不溶性ガスである。実質的に不溶性ガスの適当な範囲は、さらに使用する可溶性ガス、脂質の種類、特定の応用等のような様々な因子に依存して変動する。例示的範囲は、約0.01%から約99%の間の実質的に不溶性ガス、好ましくは約1%から約95%の間、より好ましくは約10%から約90%の間、そして最も好ましくは約30%から約85%の間の不溶性ガスを含む。

診断用の磁気共鳴造影（MRI）に使用するような診断用超音波造影の外の使用のために、強力な常磁性酸素 $^{17}\text{O}_2$ ガス（ $^{17}\text{O}_2$ ）、ネオン、キセノン（特にルビジウム リッチ 過分極化キセノンガス）または酸素（より強力ではないが、これもまた常磁性）は、例えば頭隙を満たすために好ましく使用できるが、他のガスも使用できる。最も好ましくは $^{17}\text{O}_2$ ガス、ネオン、ルビジウム リッチ 過分極過化キセノンガスまたは酸素ガスを、例えばペルフルオロカーボンガスのような実質的に不溶性のガスと組み合わせる。常磁性ガスは当該技術分野で周知であり、そして適当な常磁性ガスは、当業者には容易に明らかである。MRIへの応用に最も好適なガスは、単独または他のガスと組み合わせて使用するにせよ、 $^{17}\text{O}_2$ である。

ガスを組み合わせて使用することにより、 $^{17}\text{O}_2$ または他の常磁性ガスは最適なコントラストを提供し、そしてペルフルオロカーボンは攪拌後に封入されたガス内で $^{17}\text{O}_2$ を安定化する。ペルフルオロカーボンガスを加えないと、 $^{17}\text{O}_2$ のようなガスはその溶解度ゆえに静脈注入後に脂質封入から外へ拡散するので一般的により効果が低い。さらに $^{17}\text{O}_2$ ガスは大変高価である。ペルフルオロカーボンガスと $^{17}\text{O}_2$ ガスを組み合わせることにより、生成物の効力が大きく増大し、そして経費がかかる $^{17}\text{O}_2$ ガスのより効率的使用を通じて経費は下がる。同様に、例えばネオンのような所望の常磁性を有する他のガスを、ペルフルオロカーボンガスと混合することができる。

以下の表3から、広範な種々のガスをMR造影法に使用できることが明らかである。表3において、ガスー充填リポソーム中の種々のガスに関する R_2 ($1/T_2/\text{mmol/L}\cdot\text{sec}^{-1}$)を表す。表3に示すように、種々のガスー充填リポソームの緩和に劇的な差異があり、より高い R_2 緩和値はそのリポソームがMR造影剤としてより効果的であることを示している。示したガスの中で、空気が最高の R_2 値を有する。空気は空気中の酸素の常磁性効果により、最高であると考えられる。しかし純粋な酸素は、効果が幾分低く、酸素のより高い溶解性およびリポソーム周囲の水性環境中への酸素の平衡化によるものであろう。空気を用いると、窒素（空気は約80%が窒素である）がリポソーム中の酸素の安定化を助ける。窒素は空気よりも水への溶解度が低い。上記のように、PFPまたは他のペルフルオロカーボンガスを、空気、酸素、 $^{17}\text{O}_2$ またはルビジウム リッチ過分極化キセノンのような、より磁性的に活性なガスと混合することができる。そのように行くと、安定な高度に磁性的に活性なガスー充填リポソームを調製できる。

表 3

大きさの分布および緩和

ガス	数重量分布 (μm)	容積重量 分布 (μm)	R_1
窒素	6.96 ± 0.63	31.08 ± 7.42	474.6 ± 59.9
サルファヘキサ フルオリド	4.31 ± 0.13	44.25 ± 1.23	319.3 ± 42.5
キセノン(Rb)	7.02 ± 1.19	160.90 ± 92.46	191.2 ± 30.8
アルゴン	8.14 ± 0.49	41.45 ± 13.02	55.29 ± 41.3
空気	6.05 ± 1.05	23.28 ± 0.41	1510.4 ± 0.41
ペルフルオロ プロパン	4.24 ± 0.72	49.88 ± 11.11	785 ± 31.8
酸素	7.26 ± 0.98	30.99 ± 3.90	732.4 ± 73.9
ネオン	7.92 ± 0.71	26.20 ± 1.03	595.1 ± 97.2
ペルフルオロ ブタン	5.88 ± 0.36	51.25 ± 3.97	580.1 ± 45.5

容器の頭隙は所望により、周囲圧、減圧または加圧下でガスを用いて充填することができる。

本発明の容器では、ガス相は実質的に水性脂質懸濁液相とは分離している。実質的に分離しているとは、約50%未満のガスが攪拌前に水性脂質相と混合されることを意味する。好ましくは約40%未満、より好ましくは約30%未満、さらにより好ましくは約20%未満、そして最も好ましくは約10%未満のガスを水性脂質相と混合する。ガス相は容器を攪拌し、そしてガス相および水性脂質相が混合されてガス-充填リポソームの水性懸濁液を形成するまで、実質的に水性脂質相と分離しておく。この様式では、超音波または磁気共鳴造影用の優れたコントラスト剤が生成される。さらに、コントラスト剤は使用直前に調製されるので、使用期限安定性の問題は最小である。

攪拌は広範な様々な方法で行うことができ、そして機械的および／または手動による攪拌、ならびに超音波処理（音波）のような他の手段を含むことができる。機械的および／または手動の攪拌が好ましい。攪拌は例えば、振盪、攪拌（stirring）、ボルテックス処理、振動等により行える。好ましくは図2に表すような攪拌デバイスを使用できる。特に図2に機械的攪拌デバイス（10）を表す。攪拌は開始-停止ボタン（11）を使用して行い、そして止めることができる。攪拌デバイス（10）はまた、種々のスピード（RPM）調整を提供するノブ（12）を含んで成る。ノブ（12）を時計回りに回すことにより、攪拌速度（RPMで）が上がる。逆にノブ（12）を反時計回りに回すことにより、攪拌速度が下がる。本発明の容器内容物は、容器を攪拌デバイス（10）のハウジングモジュール（13）に置くことにより攪拌できる。ハウジングモジュール（13）は、攪拌デバイス（13）の攪拌手段として役立つ。攪拌のために容器をしっかりとハウジングモジュール中に確実に置くために、スクリュー（14）

を使用する。

本発明に使用する容器は、種々の異なる形状をとることができる。所望により、図1に示すように、容器(1)は本体(2)およびキャップ(3)を有し、実質的に互いに分離しているガスの頭隙(4)および脂質の水性懸濁液(5)を含む。あるいは容器は所望により1つ以上のフィルターを取り付けた予め充填したシリンジ状態でもよい。この場合は、シリンジに水性相および予め選択したガスの頭隙を満たす。このシリンジは一般的に、長軸が振盪方向に対して垂直に配置されている振盪デバイスに取り付けられる。振盪後、ガス-充填リポソームがシリンジ中で生成され、直ぐに使用できる。好ましくは容器は、図1に示すような容器、シリンジまたは別の種類の容器であるにかかわらず、その内容物と一緒に滅菌される。

種々の異なる材料を、本発明の容器を製造するために使用でき、ガラス、珪硼酸ガラス、珪酸ガラス、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリアクリレート、ポリスチレンまたは他のプラスチックのようなシリンジを含む。シリンジを含む好適な容器は、ガス不浸透性またはガスを充填する前に外部ガス不浸透性バリアー内に包まれている。もちろん、容器内に予め選択したガスの完全性を維持することが望ましい。ガスを詰める能力を有するシリンジ材料の例は、限定するわけではないが珪酸ガラスまたは珪硼酸ガラスであり、シリカー融合シリンジまたはルアーロック型(luer-lock type)シリンジ、およびテフロンチップまたはテフロン被覆プランジャーが付いている。当業者は本開示の物質から準備をはじめれば、種々の添加物を本発明の水性脂質懸濁相にその相を安定化するために、または攪拌時にガス-充填リポソームを安定化するために使用できると認識するだろう。所望により、これらの添加物を攪拌前に水性脂質相に加えるか、または攪拌そしてガス-充填リポソームの調製物の生成後に組成物中に加えることができる。もちろんそのような添加物は、当業者には明らかであるように、生成したガス-充填リポソームの特定の応用目的に依存する。

本発明に使用できる多数の安定化剤は入手可能であり、キサンタンガム、アカシア、寒天、アガロース、アルギン酸、アルギン酸塩、アルギン酸ナトリウム、カラゲナン、デキストラン、デキストリン、ゼラチン、グアガム、トラガカント、イナゴマメ、バッシリン(Bassorin)、カラヤ、アラビアガム、ペクチン、カゼイン、ベントナイト、未精製ベントナイト、精製ベントナイト、ベントナイト マグマ、コロイド状、セルロース、セルロース(微結晶)、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース ナトリウム、カルボキシメチルセルロース ナトリウム12、ならびに他の天然の、または修飾された天然のセルロース、ポリソルベート、カルボマー 934P、珪酸マグネシウムアルミニウム、モノステアリン酸アルミニウム、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポビドン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ポリビニルピロリドン、二酸化珪素、コロイド状二酸化珪素を含む。

ペルフルオロオクチルブロミド(PFOB)、ペルフルオロオクチルヨージド、ペルフルオロトリプロピルアミンおよびペルフルオロトリブチルアミンを、安定化剤として脂質相に使用することができる。5個の炭素原子よりも大きいペルフルオロカーボンは一般的に、体温で液体であり、そしてそのようなペルフルオロカーボンは安定化剤としても高度に好ましい。適当なペルフルオロカーボンには、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロペプタン、ペルフルオロオクタン、ペルフルオロデカリン、およびペルフルオロドデカリンを含む。さらに過フッ素化脂質または部分フッ素化脂質も、安定化を助けるために使用できる。当業者には明らかであるように、本発明に記載した広範な種々の脂質の過フッ素化または部分フッ素化同族体を使用できる。炭化水素脂質に関するそれらの比較的疎水的な性質により、そのような過フッ素化または部分フッ素化脂質は、安定性という観点からさらに利点を提供する。過フッ素化または部分フッ素化脂質の例は、 F_6C_{11} ホスファチジルコリン(PC)および F_8C_5 PCである。そのような同族体は、例えばSantaellaら、Federation of European Biochemical Societies(FEBS)、第336巻、第3号、第418-484頁、(1993)に記載され

10

20

30

40

50

ており、その開示は全部、引用により本明細書に編入する。

ピーナッツ油、キャノーラ油、オリーブ油、ベニバナ油、トウモロコシ油、アーモンド油、綿実油、ペルジック(persic)油、ゴマ油、ダイズ油、鉍物油、鉍物軽油、オレイン酸エチル、ミリスチルアルコール、イソプロピルミリステート、イソプロピルパルミテート、オクチルドデカノール、プロピレングリコール、グリセロール、スクワレン、または他の任意の消化性であると知られている市販の油のような広範な種々の生物適合性油も、安定化を補助するために使用できる。これらには、レシチン、スフィンゴミエリン、コレステロール、硫酸コレステロールおよびトリグリセリドを含んでよい。

安定化は広範な種々の粘稠改質剤（すなわち、粘度改質剤）を加えることによって行うことができ、これは本発明に従い安定化剤として役立つことができる。この種類の化合物は限定するわけではないが； 1）炭化水素およびそれらのリン酸化およびスルホン化誘導体； 2）400から8000の分子量範囲のポリエーテル； 3）ジーおよびトリヒドロキシアルカン、および800から8000の間の分子量範囲のそれらのポリマーを含む。リポソームは、限定するわけではないが、アカシア、コレステロール、ジエタノールアミン、グリセリルモノステアレート、ラノリンアルコール、レシチン、モノーおよびジグリセリド、モノエタノールアミン、オレイン酸、オレイルアルコール、ポリオキサマー、ポリオキシエチレン50ステアレート、ポリオキシ35キャスター油、ポリオキシ10オレイルエーテル、ポリオキシ20セトステアリルエーテル、ポリオキシ40ステアレート、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80、プロピレングリコールジアセテート、プロピレングリコールモノステアレート、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、モノラウリル酸ソルビタン、モノオレイン酸ソルビタン、モノパルミチン酸ソルビタン、モノステアリン酸ソルビタン、ステアリン酸、トロールアミン、乳化ワックス、プルロニックF61、プルロニックF64およびプルロニックF68から成る乳化および／または可溶化剤と組み合わせて使用できる。

加えることができる他の薬剤は、グリセロール、プロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールを始めとするポリアルコール類のような増強剤、グルコース、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム等を含む。

所望により、抗菌剤および／または保存剤を組成物中に含むことができる。そのような薬剤は、安息香酸ナトリウム、すべての四級アンモニウム塩、アジ化ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸ナトリウム、アスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、クロロブタノール、デヒドロ酢酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、モノチオグリセロール、安息香酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、ソルビン酸カリウム、重亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄および有機水銀塩を含む。

所望により浸透圧を制御するために、浸透剤を使用できる。適当な浸透的に活性な物質は、単糖類、二糖類、糖アルコール、アミノ酸および種々の合成化合物のような生理的に適合性のある化合物を含む。適当な単糖類または糖アルコールは、例えばエリスロース、トレオース、リボース、アラビノース、キシロース、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、イドース、ガラクトース、タロース、トレハロース、リブロース、フルクトース、ソルビトール、マンニトールおよびセドヘプチュロースを含み、好適な単糖はフルクトース、マンノース、キシロース、アラビノース、マンニトールおよびソルビトールである。適当な二糖類は、例えばラクトース、スクロース、マルトースおよびセルビオースを含む。適当なアミノ酸は、例えばグリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニンおよびヒスチジンを含む。合成化合物は、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ポリエチレングリコールおよびポリビニルピロリドンを含む。様々な他の適当な浸透圧的に活性な物質も、同様に当業者には周知であり、そして本明細書で使用するような浸透圧的に活性な薬剤という用語の範囲内にあるものとする。

上記に考察したような種々のポリマーは、種々の異なる目的および使用のためにも加える

10

20

30

40

50

ことができる。

当業者は特定の最終的な使用に応じて、上記の懸濁剤のような広範囲の添加物量を、必要に応じて、または所望により本発明の水性脂質懸濁液相に使用できることを認識するだろう。そのような添加物を一般的に、生成するコントラスト組成物の0.01容量%から95容量%の間で含んで成るが、より高い、または低い量を使用してもよい。一般的なガイダンスとして、懸濁剤は典型的には少なくとも約0.5容量%、より好ましくは少なくとも約1容量%、さらにより好ましくは少なくとも約10容量%で存在する。一般的に懸濁剤は典型的には約50容量%未満、より好ましくは約40容量%未満、さらにより好ましくは約30容量%未満の量で存在する。例えば、典型的な懸濁剤の量は約20容量%である。また典型的には一般的に好ましい浸透性範囲にするために、約25g/l未満、より好ましくは約20g/l未満、さらにより好ましくは約15g/l未満、より一層好ましくは10g/l未満の浸透的に活性な物質を使用でき、そして場合によっては浸透的に活性な物質を使用しない場合もある。最も好適な浸透的に活性な物質の範囲は、一般的に約0.002g/lから約10g/lの間である。これらの、ならびに他の適当な添加物の範囲は、いったん本発明を入手すれば当業者には容易に明らかである。

10

種々の治療薬および／または診断薬も、望ましい治療薬または診断薬を相に単に加えることにより、水性脂質懸濁液相に包含することができる。適当な治療薬および診断薬、ならびにそれらの適当な量は、いったん本開示から手掛ければ当業者には容易に明らかである。これらの薬剤を脂質膜中または上に取り込むか、または生成したリポソーム中にカプセル化できる。

20

さらに、MRIのために生成するガスー充填リポソームの磁性効果を向上させるために、例えば常磁性または超常磁性コントラスト剤のような1つ以上のMRIコントラスト増強剤を加えることができる。有用なMRIコントラスト増強剤には、鉄(Fe^{+3})、銅(Cu^{+2})およびマンガン(Mn^{+2})を含む遷移金属のような常磁性イオン、ならびにガドリニウム(Gd^{+3})およびジスポロシウム(Dy^{+3})のようなランタニド、ニトロキシド、酸化鉄(Fe_3O_4)、硫酸鉄ならびにヒドロキシアパタイトで置換されたマンガン(Mn^{+2})のような常磁性粒子を含む。同様に、クロミウム(Cr^{+3})、ニッケル(Ni^{+2})、コバルト(Co^{+2})およびユーロピウム(Eu^{+2})は、使用できる他の常磁性イオンの例である。ニトロキシド基または常磁性を持つ不対電子スピンを維持する任意の他の原子のような、他のコントラスト増強剤を使用できる。理想的には、コントラスト増強剤を攪拌前に水性脂質相に加え、そして攪拌後にこのコントラスト増強剤をガスー充填リポソーム内または上に取り込むように設計するが、リポソーム調製後に添加することも可能である。生成したガスー充填リポソームは、緩和を大いに増大させることができ、特に磁気共鳴造影に効果的なコントラスト剤を提供する。例としてマンガン(Mn^{+2})は、水性脂質相にホスファチジルコリンまたはホスファチジルセリンを使用する時、脂質の主基上に取り込まれる。所望により、金属は例えばUngerら、米国特許第5,312,617号明細書(その内容は全部、引用により本明細書に編入される)に示されているような脂溶性化合物を使用してキレート化することができる。そのような脂溶性化合物はリポソーム膜中に容易に取り込まれるので、大変有用である。酸化鉄および他の粒子が、リポソーム面中または上へ最適に取り込まれるためには、それらは一般的に小さく、好ましくは約1 μ 未満、より好ましくは約200nm未満、そして最も好ましくは100nm未満であるべきである。取り込みを向上するために、脂肪性または親液性化合物で被覆した酸化鉄は、それらが発泡面の脂質コートに取り込まれる傾向があるので使用できる。

30

40

水性脂質懸濁相が、自然にはゲル化しない脂質ポリマーおよび金属のゲル化を引き起こす、またはゲル化を増強する材料を含むことができることも、本発明の範囲であり、多価金属カチオン、糖およびポリアルコールのようなゲル化剤を使用できる。ゲル化剤として有用な多価金属カチオンの例には、カルシウム、亜鉛、マンガン、鉄およびマグネシウムを含む。有用な糖はグルコース、ガラクトース、フルクトース、アラビノース、アロースおよびアルトロースのような単糖、マルトース、シュクロース、セロピオースおよびラクトースのような二糖、ならびに澱粉のような多糖である。好ましくは単純な糖であり、すな

50

わち単糖または二糖である。本発明に有用なポリアルコールゲル化剤は、例えばグリシドール、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、ペンタエリスリトール、ガラクトールおよびポリビニルアルコールを含む。最も好ましくは、本発明に使用するゲル化剤はシュクロースおよび／またはカルシウムである。本発明の様々な組成物中に使用できる特定のゲル化剤は、いったん本開示から準備すれば当業者には明らかであろう。脂質の組み合わせ、例えばホスファチジン酸とカルシウムまたはマグネシウム塩、ならびにアルギン酸、ヒアルロン酸またはカルボキシメチルセルロースのようなポリマーを脂質を安定化するために使用できる。二価カチオンが脂質とポリマーとの間に金属ブリッジを形成し、脂質／ポリマー系内でガスー充填リポソームを安定化すると予想される。同様に、キトサン（またはキチンを基本とした物質）、ポリリシン、ポリエチレンイミンおよびアルギン酸（またはその誘導体）またはヒアルロン酸の混合物を含む懸濁液を調製できる。

攪拌の速度、水性脂質相を含んで成る脂質の量、および密閉容器のサイズは、任意のガスー充填リポソームの最終的なサイズに影響を及ぼすことができる。さらに、そのような試薬の比率がガスー充填リポソームのサイズ分布にも同様に重要であることが判明した。振盪速度、バイアルのサイズおよび脂質濃度と共に考慮した時に、ガスー充填リポソーム界面および水性環境中での表面張力は、ガスー充填リポソームの最終的なサイズのさらなる決定因子であると考えられる。

水性相およびガスの頭隙を充填した滅菌容器では、攪拌後のリポソームのサイズを変化させ、これにより所望のサイズ分布のリポソーム生成物を得るために、どのように変化が容易かつ簡単になされるかが見いだされた。さらにフィルターは振盪後のコントラスト剤のサイズ分布をさらに規定するために使用できる。以下では本発明の組成物中のどのような変化が、リポソームのサイズを変化させるために使用できるか、という再考を提供する。第一に水性相中の種々の物質は、生成するガスー充填リポソームのサイズを制御するために重要であり得ることが判明した。表4は、水性相および窒素の頭隙で充填された滅菌容器を振盪することにより生成したリポソームのサイズを表す。すべての場合で、リポソームサイズはパーティクルサイジングシステム モデル770 ライト オブスキュレーション 整粒器（パーティクルサイジングシステムズ、サンタバーバラ、カリフォルニア州）により測定した。データから明らかなように、水性相中の脂質の比率は生成するガスー充填リポソームのサイズ分布に影響を及ぼす。特別に、以下の表4は平均リポソームサイズに対する脂質組成の効果を表す。

表4

平均リポソームサイズに対する脂質組成の効果

脂質濃度	平均リポソームサイズ
77.5 : 15 : 7.5	5.26 μm
77.5 : 20 : 2.5	7.33 μm
82 : 10 : 8	6.02 μm

★ ジパルミトイルホスファチジルコリン：ジパルミトイルホスファチジン酸：ジパルミトイルホスファチジエタノールアミン－PEG5000の比、モル％で。

表5は、定めた脂質組成混合物の濃度の平均リポソームサイズに対する依存性を実証している。表5に示すように、脂質の総濃度中の変動も振盪後のリポソームのサイズに重要な影響を及ぼす。これらの実験において、3種の脂質成分の比率は一定に保たれ、水性中の脂質濃度は0.5から5.0mgml⁻¹の間で変動した。使用したガスは窒素であった。水性相中の脂質濃度が1.0mgml⁻¹であるとき、ペルフルオロブタンの頭隙を有する超音波診断用に最適なサイズの泡が生成した。

表5

平均リポソームサイズに対する脂質濃度の効果

脂質濃度	平均リポソームサイズ
1 mg ml ⁻¹	1.8 μm
3 mg ml ⁻¹	4.0 μm
5 mg ml ⁻¹	7.2 μm

10

★ すべての試料に関する脂質濃度は、82:10:8のジパルミトイルホスファチジルコリン：ジパルミトイルホスファチジン酸：ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG5000のモル%に基づいた。使用したガスは窒素であった。

リポソームのサイズは、例えば脂質のような安定化媒質濃度に加えて、頭隙中のガス組成にも依存し得る。例えば、1.0mgml⁻¹脂質濃度で、窒素を使用した時、5.0mgml⁻¹濃度の脂質とペルフルオロブタンを用いた時とおよそ同じ直径のガス-充填リポソームを生成することが判明した。しかし、より高濃度で少し大きなガス-充填リポソームに歪んだ分布を生じ得ることが判明した。この現象はより高脂質濃度で、ガス-充填リポソームの安定性の増大を反映している傾向がある。したがって高濃度の脂質が、水性相中での安定化剤として作用することにより安定性に寄与するか、あるいはより高濃度の脂質がガスの回りにより多くのラメラを提供してリポソームをより安定にするかのいずれかであり、そしてこれはより大きな割合で大きなリポソームが存続することを可能にすると考えられる。さらに、ガス頭隙のサイズもガス-充填リポソームのサイズに影響させるために使用できることが判明した。水性相のサイズと比較して、比例的により多くのガスを含有するより大きな頭隙は、より小さなサイズの頭隙よりも一般的に大きなリポソームを生成するだろう。攪拌の速度は、正しいサイズのリポソームを生成するために重要である。1分あたり100から10,000回転(RPM)の間の攪拌速度をリポソームを作成するために使用できるが、定めたサイズのリポソームを迅速かつ再現性よく作成するという意味においては最適がある。本明細書にて使用する時、1回転という用語は、1回の前後、上下、右左、回転等の運動を言い、ここでこの運動はある点から始まり、そしてその元の点で終わる(すなわち戻る)。表3は82モル%のジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)と10モル%のジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)と8モル%のジパルミトイルホスファチジルーエタノールアミン-PEG5000(DPPE-PEG5000)の水性相およびペルフルオロプロパンガスを含んで成る頭隙から生成されたリポソームのサイズを示す。この調製物を、Wig-L-Bug(商標)(クレセント デンタル:Crescent Dental Mfg.,リオン、イリノイ州)で2分間振盪した。水性脂質相および頭隙ガスを充填した2mlの琥珀色バイアル(ウィートン インダストリーズ:Wheaton Industries、ミリビル、ニュージャージー州、実際の容量は3.7ml)を使用して、本発明の多相容器をWig-L-Bug(商標)上に置き、そして速度をCo-Palmerモデル08210ピストルグリップタコメーター(コード-パルモア、ニール、イリノイ州)を通して測定した。表6は結果を表し、そして生成する平均リポソームサイズに対する攪拌速度の効果を示している。

20

30

40

表 6

平均リポソームサイズに対する攪拌速度の効果

速度 (RPM)	平均リポソームサイズ
1 5 0 0	3 . 4 μm
2 8 0 0	3 . 3 μm
3 3 0 0	2 . 9 μm

10

実際、所望サイズのリポソームを生成するための最適スピードがあることが見いだされた。最適なスピードで、ガスー充填リポソームは5分未満、さらに1または2分以内、そしてさらには30秒以下で大変迅速に形成する。振盪法および運動が、正しい大きさのリポソームを形成するには重大であることに注目される。特に最適な大きさのリポソームは振盪の往復運動が孤形状に生じる時、生じることが判明した。孤形運動の程度は2°から20°間であることが好ましい。より一層好ましくは、孤形運動の程度は4°から10°間である。さらに一層好ましくは、孤形運動の程度は5°から8°間である。最も好ましくは、孤形運動の程度は6°から7°間である。本発明のさらなる態様では、RPM数は好ましくは約500から約10,000、より好ましくは約1000から約5000の間であり、そして最も好ましくは約2500から約4000の間である。

20

攪拌する液体内容物が利用できる頭隙のサイズ、形および量も、最適な大きさのガスー充填リポソームの形成に極めて重要であることも見いだされた。例えば、3.7mlの実際容量(ウィートン 300珪硼酸ガラス、ウィートンインダストリーズ、ミルビレ、ニュージャージー州、2mlサイズと言う、直径×高さ=15mm×32mm)を使用する時、ガスー含有頭隙の容量は好ましくは全バイアル容量の約10%から約60%の間であることは、本発明で見いだされたことである。一般的にバイアル中のガスー含有頭隙は、全バイアル容量の約10%から約80%の間であるが、特別な状況および所望の応用に応じて、より多い、または少ないガスが適当かもしれない。より好ましくは頭隙は、全容量の約30%から約70%の間を含んで成る。ガスー含有頭隙の容量が全バイアル容量の約60%を含んで成ることが一般的に最も好ましい。

30

これゆえに、本発明の上記考察から最適サイズは攪拌の強度および動き、ならびにバイアルのサイズ、形および充填容量を含む様々な因子に依存することが明らかである。

塗料混合機、卓上型振盪機およびボルテックスのような種々の攪拌デバイスをガスー充填リポソームを調製するために使用でき、振盪のジオメトリーおよび速度がガスー充填リポソームの生成を最適化するためには重要である。Wig-L-Bug(商標)は攪拌のための最も最適なデバイスである。

滅菌容器のサイズ、容器のジオメトリーおよび振盪装置に対する容器の方向は、すべてガスー充填リポソームサイズの決定に重要である。振盪デバイス、例えばWig-L-Bug(商標)は、一般的に滅菌容器の重量が特定レベルを越えると、より一層ゆっくりと振盪する。標準的なWig-L-Bug(商標)は、10mlバイアルよりも2mlバイアル(実際の容量は3.7ml)をより早く振盪する。この実験は10mlの透明バイアル(ウィートン インダストリーズ、ミルビレ、ニュージャージー州)および2ml(実際の容量は3.7ml)の琥珀色のバイアル(ウィートン インダストリーズ、ミルビレ、ニュージャージー州)を使用して行った。再度、コードーパルマー ピストン グリップ タコメーター(コードーパルマー、ニレ、イリノイ州)を使用して、振盪速度を測定した。表7に結果を掲載する。

40

表7は電気振盪機の振盪速度の、振盪に使用するバイアルのサイズに対する依存性を示している。

表 7

Wig-L-Bug(商標)振盪速度に対するバイアルサイズの効果

バイアルサイズ	振盪速度 (RPM)
2 m l vial	3 2 5 0
1 0 m l vial	2 9 5 0

10

一般的に本発明は滅菌容器で行われ、ここで水性相はすでにビンの中に存在している。しかし選択した応用のために、滅菌媒質を容器中に乾燥または凍結乾燥状態で保存することができる。この場合、水溶液（例えば、滅菌リン酸緩衝塩溶液）を振盪直前に滅菌容器に加える。そのように行くと、上記のようにガスー充填リポソームを生成するように、水溶液中の再水和した滅菌媒質が再度、振盪中にガス頭隙と相互作用するだろう。乾燥または凍結乾燥懸濁媒質の再水和は、必ず生成物をさらに複雑にし、そして一般的には望ましくないが、特定の調製物では生成物の使用期限をさらに延長するために有用であり得る。例えば、シクロホスホアミド、ペプチドおよび遺伝物質（DNAのような）のような特定の治療薬は、長期間の水性保存で加水分解するかもしれない。水性相および頭隙を形成するために、すでに凍結乾燥した振盪前の試料の再水和は、そうしなければ十分な使用期限を

20

もたないかもしれない化合物を含有するガスー充填リポソームの生成を、現実的に可能にできる。

これまでにガスー充填リポソームのサイズを決定する種々のパラメーターを説明した。リポソームのサイズは生成物の効力を最大にし、かつ毒性を最小にする意味で重要である。さらにリポソームは効力を最大にし、かつ肺へ入るような悪い組織的相互作用を最小にする両方が可能なように、できるかぎり柔軟であるべきである。本発明は大変薄く取り扱い易い膜を持つ所望サイズのリポソームを作成する。リポソーム膜が大変薄く、そして取り扱い易いので（例えば、わずか 1 mgml^{-1} 脂質を膜を安定化するために要する）、より大きな直径のガスー充填リポソームが肺高血圧症を生じることなく使用できることが判明した。例えば肺高血圧症の兆候無しに、ブタに最高5回、必要な診断造影剤の投与量を投与した。

30

対照として、より小さい直径のアルブミン被覆気泡をこのような動物により低い投与量で投与した時、重篤な肺高血圧症を引き起こす。本発明のリポソームは大変柔軟かつ変形可能であるので、肺の毛細管を通して容易にするりと入る。さらに本脂質に採用する被覆技術（例えば、ポリエチレングリコール保持脂質）は、肺との悪い相互作用を下げると同時に、生成物のインビトロおよびインビボ安定性および効力を増大させる。

40

一般的な超音波コントラスト媒質として使用するために、ガスー充填リポソームのサイズは、ガスー充填リポソームがレイリー散乱型（Rayleigh scattering regime）となるような周波数の時、後方散乱または超音波効果が6乗まで半径に比例するので、できるかぎり大きい（閉塞効果を生じない）べきである。またMRIにも、本発明のより大きなリポソームが好ましい。毒性効果の可能性がより少ない、より大きなリポソームサイズを調製および使用するための本発明の能力は、他の生成物と比較してその効力が増大する。

超音波コントラストに影響を及ぼす更なるパラメーターは、リポソーム膜の弾性である。弾性が大きくなると、コントラスト効果が大きくなる。本リポソームは脂質の超一薄膜により被覆されているので、弾性は裸のガスと同様であり、そして反射およびコントラスト効果が最大になる。

本発明の攪拌手順は、滅菌容器内の水性相およびガス頭隙からリポソームを容易に生成する。本発明は超音波または磁気共鳴造影法用に高度に望ましいリポソームを生成するために十分である。しかし選択した応用のために、フィルターを使用してより一層均一なサイズ分布および望ましい直径を有するリポソームを生成できる。例えばガスー充填リポソームの調和現象を利用して、超音波に対してインビボ圧力を測定するためには、サイズが狭

50

い範囲内にある大変厳しく規定したリポソーム直径を有することが有用になるかもしれない。これはリポソーム（水性相およびガス頭隙を有する容器を振盪することにより生成される）を定めたサイズのフィルターを通して注入することにより容易に達成される。生成したリポソームは、フィルター膜中のフィルターの孔サイズの近似値よりは小さい。上記のように、多数の超音波またはMRI応用のために、できる限り大きなガスー充填リポソームを有することが望ましい。しかし特定の応用には、より小さなガスー充填リポソームが望ましいかもしれない。例えば腫瘍または他の疾患組織の標的化において、ガスー充填リポソームは管空間中に留まり、そして組織間隙に入ることが必要であるかもしれない。さらに小さいガスー充填リポソームは、このような応用に有用であり得る。これらのより小さなガスー充填リポソーム（例えば、好ましくは直径が1ミクロン未満）は大部分、水性相中の化合物（組成および濃度）ならびに頭隙（ガス組成および頭隙の容量）を変化させることにより生成できるが、フィルターを通す注入によっても生成できる。実質的に均一サイズの大変小さいガスー充填リポソームは、例えば0.22ミクロンフィルターを通して注入することにより生成される。生成するナノメートルサイズのガスー充填リポソームは、次に標的化に望ましい特性を有するすことができる。

10

上記の脂質懸濁液の例は、懸濁液の大きさにそれほどの変化無くオートクレーブを介して滅菌することもできる。コントラスト媒質の滅菌は、オートクレーブおよび／または攪拌工程の前または後のいずれかに行われる滅菌濾過により、あるいは当業者に周知な他の手段により行うことができる。

容器を水性相および予め選択したガスの頭隙で充填した後、密閉ビンを無期限に保存できる。沈殿する粒子、破裂するガスー充填リポソームはなく、あるいはガスー充填リポソーム、粒子、コロイドまたは乳液間の望ましくない相互作用は無い。水性相およびガス頭隙を満たした容器の使用期限は、水性相中の化合物の安定性にのみ依存する。これらの長期使用期限および滅菌可能性の特性は、従来技術に優る実質的利点を本発明に付与する。超音波コントラスト媒質の技術分野に大変よくある粒子の凝集および沈殿を伴うような安定性の問題に、本明細書では取り組んだ。

20

本発明の多相容器の攪拌により生成するガスー充填リポソームは、超音波または磁気共鳴造影のような診断造影用にコントラスト剤として優れた利用性を有することが判明した。このリポソームは一般的に患者の造影に有用であり、かつ／または患者内の疾患組織の存在を診断するために特に有用である。造影法は本発明のガスー充填リポソームを患者に投与し、そして次に超音波または磁気共鳴造影を使用して患者をスキャンニングして、患者の内部領域および／または領域中の任意の疾患組織の可視画像を得ることにより行える。患者の領域とは、患者の全身または患者の特定領域または一部分を意味する。リポソームコントラスト剤は、脈管、心臓、肝臓および脾臓の画像を提供するために、ならびに胃腸管領域または他の体腔の造影に、あるいは当業者には容易に明らかな組織の特性決定、血液プール造影等のような他の方法に使用できる。任意の様々な型の超音波または磁気共鳴造影デバイスが本発明の実施に使用でき、デバイスの特定の型またはモデルが、本発明の方法に不可欠であることはない。

30

本発明のガスー充填リポソームは、当業者が認識するように種々の疾患、疾病または病気を処置するために、患者に様々な治療物質を送達するためにも使用できる。

40

また、磁気的に活性なりポソームをMRIによる圧力を予想するために使用できる。リポソームは内部帯磁性が増大し、したがって T_2 緩和が増加するが、 T_2^* 緩和はさらに一層増加する。静電場勾配がスピンエコー実験で主に補正される効果により（パルスをリフォーカスする 180° 無線周波数による）、静電場効果が補正されない所ではリポソームの効果は T_2^* 加重パルス配列よりも T_2 でより少なく記録される。圧力が増すと、リポソームまたはリポソーム粉碎（より可溶性ガスに関して）の損失を生じ、ならびにリポソーム直径の減少を生じる。したがって $1/T_2$ は圧力上昇に伴い減少する。圧力の解除後、残りの幾つかのリポソームは再度一広がり、そして $1/T_2$ は再度、わずかに増加する。約80%のPF₆と20%の空気から成るリポソームは、圧力の解除後にベースラインに戻る圧力で、増大した安定性および $1/T_2$ のわずかな下降を表す（すなわちリポソームは安定であるが、わずか

50

な $1/T_2$ 圧力効果を示す)。勾配エコー画像が得られ、そしてシグナル強度が測定される時、これらの効果はより一層注目される。シグナル強度は圧力上昇で増加する($1/T_2$ ★は圧力減少で増加する)。実験を比較的迅速に行ったので(T_2 を測定するためよりも勾配エコー造影を行うために $1/10$ の時間未満を要する)。圧力に対する暴露期間はさらに少なく、窒素-充填リポソームは圧力解除後にほぼベースラインに戻る(すなわち、リポソームの損失は大変少ない)。したがって、勾配エコーに関するシグナル強度は、周囲圧力に戻った時点でほぼベースラインに戻る。MRIによる圧力測定のために、リポソームを圧力上昇でばらばらになるように、あるいは安定であるが、リポソーム直径が圧力上昇で減少するように、いずれかに設計できる。MRIについては、リポソーム半径は $1/T_2$ ★に影響するので、この関係はMRIによる圧力を予想するために使用できる。

10

当業者が認識するように、ガス-充填リポソームの患者への投与は、例えば注射で静脈内または動脈内に、経口的に、または直腸に、様々な様式で行うことができる。有用な投与量および投与の特定の様式は、年齢、体重ならびに特定の哺乳類およびそのスキニングまたは処置する領域、ならびに使用する特定のコントラスト媒質または治療薬に大変依存するだろう。典型的には投与量は低いレベルから始めて、そして所望のコントラスト増強または治療効果が達成されるまで増加する。患者は任意の種類の哺乳類でよいが、最も好ましくはヒトである。

以下の実際の実施例は、どのように本発明が使用されたか、ならびに本発明が特別に有用性を持つ幾つかの分野を説明するものである。これらの実施例は単に例示であり、そして添付の請求の範囲を限定すると考えるべきではない。

20

実施例

実施例 1

窒素ガス-充填リポソームの形成

ガス-充填脂質二重層を、通常の(生理)塩溶液:プロピレングリコール:グリセロール(8:1:1、容量:容量:容量)を含有する6mlの希釈剤を有する2つの20mlバイアル中で調製した。これに終濃度 5 mgml^{-1} で、82:10:8(モル%)のモル比のジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC):ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA):ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG5000混合物を加えた。次に試料を気密に密閉し、そして圧力を隔壁キャップにより維持した。これらを次にパージし、そして少なくとも3回、窒素ガス(99.98%、アリゾナウェルディング社:Arizona Welding Co.、タクソン、アリゾナ州)を排気した。次に試料を 121°C で15分間、バーンステットモデルC57835蒸気滅菌器中(バーンステッド/サーモリン社:Barnstead/Thermolyne Corporation、ダブрук、アイオワ州)でオートクレーブ処理するか、またはNuclepore $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルター(コスター:Costar、プリーサントン、カリフォルニア州)を1-3回通すことにより滅菌濾過のいずれかを行った。試料を次にオートクレーブから取り出し、そしてほぼ周辺温度に冷却した。試料を次にWig-L-Bugボルテックス(クレセントデンタルMfg社、リオン、イリノイ州)で2分間、ボルテックス処理した。生成した混合物は、泡に似ているガス-充填二重層を形成するために十分であった。このガス-充填二重層を次に3つの方法、パーティクルサイジングシステムズモデル770ライトオブスキュレーション検出器(パーティクルサイジングシステムズ、サンタバーバラ、カリフォルニア州)、カリブレーション接眼鏡が付いたReichert-Jungモデル150光学顕微鏡(ケンブリッジインスツルメンツ:Cambridge Instruments、バッファロー、NY)、およびコールターモデル(コールターインダストリーズ:Coulter Industries、ルートンベッツ、英国)により整粒した。試料は、少なくとも95%の粒子が10ミクロンより小さい、約5-7ミクロンの平均数重量サイズを示した。

30

40

実施例 2

ペルフルオロペンタンガス-充填リポソームの形成

ガス-充填脂質二重層を、通常の(生理)塩溶液:プロピレングリコール:グリセロール(8:1:1、容量:容量:容量)を含有する6mlの希釈剤を有する2つの20mlバイアル中で調製した。これに終濃度が 1 mgml^{-1} から 5 mgml^{-1} の間で変動する、重量比で82:10:8(重量:重量)のジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC):ホスファチジン酸:ジパルミ

50

トイルホスファチジルエタノールアミン-PEG5000混合物を加えた。この混合物に50 μ L (30.1 μ moles)のペルフルオロペンタン(PCR、ゲインズビル、フィラデルフィア州)を加えた。試料を-20°Cとし、そして気密に密閉し、そして圧力を隔壁キャップにより維持した。試料を次に121°Cで15分間、バーンステット モデルC57835蒸気滅菌器中(バーンステッド/サーモリン社、ダブーク、アイオワ州)でオートクレーブ処理した。試料を次にオートクレーブから取り出し、そして約40°Cに冷却した。試料を次にWig-L-Bug (商標) ボルテックス(クレセント デンタルMfg社、リオン、イリノイ州)で2分間、ボルテックス処理した。生成した混合物は、泡に似ているガス-充填二重層を形成するために十分であった。この泡の容量および高さを記録し、そして1つの試料を-20°Cの冷凍庫(ケンモアブランド:Kenmore Brand、シェアーズ-ローブック:Sears-Roebuck、シカゴ、イリノイ州)に置いた。次に試料は3時間後に取り出し、その時点でおよそ90%の元の容量が保持されたことを記録した。この試料を冷凍庫に一晚(約17時間)置き、そして取り出した時に元の容量の50%が維持されていることが見いだされた。対照として使用した残りのバイアルは、30°Cで同じ時間インキューベーター中に維持された。容量の損失は起こらないことが分かり、ガス-充填二重層内のガスの冷却で凝縮し、これによりガス容量が減少したことを示している。最後に、冷たい試料を30°Cのインキューベーターに置き、ここで約45分後に元の泡容量の20%が元に戻ったことが分かった。これは凝縮したガスがもう一度揮発し、そしてガス-充填リポソームのサイズに膨らんだことを示している。

10

実施例 3

ペルフルオロプロパンガス-充填リポソームの形成

20

実施例1に記載と同じ方法を繰り返したが、使用したガスはペルフルオロプロパン(99.9%、アルコン サージカル:Alcon Surgical、フォート ワース、テキサス州)であり、そして使用したバイアルサイズは2 mlの琥珀色のバイアル(実際の容量=3.7ml)(ウィートン、ミルビル、ニュージャージー州)である点は異なった。バイアルに1.5mlの脂質/希釈賦形剤混合物を満たした。工程は実施例1と同じ方法を介して整粒したが、今回は95%より多くの粒子が10ミクロン未満の4-6ミクロンのサイズを生成した。

実施例 4

ペルフルオロブタンガス-充填リポソームの形成

実施例1に記載と同じ方法を繰り返したが、使用したガスはペルフルオロブタン(97+%、フルラ社:Flura Corporation、ナッシュビル、テネシー州)であり、そして使用したバイアルサイズは2 mlの琥珀色のバイアル(実際の容量=3.7ml)(ウィートン、ミルビル、ニュージャージー州)である点は異なった。バイアルに1.5mlの脂質/希釈賦形剤混合物を満たした。工程は実施例1と同じ方法を介して整粒したが、今回は95%より多くの粒子が10ミクロン未満の4-6ミクロンのサイズを生成した。

30

実施例 5

ペルフルオロシクロブタンガス-充填リポソームの形成

実施例1に記載と同じ方法を繰り返したが、使用したガスはペルフルオロシクロブタン(99.8%、ファルツ アンド バウワー社:Pfaltz & Bauer、ウォーターヴェリー、コネクチカット州)であり、そして使用したバイアルサイズは2 mlの琥珀色のバイアル(実際の容量=3.7ml)(ウィートン、ミルビル、ニュージャージー州)である点は異なった。バイアルに1.5mlの脂質/希釈賦形剤混合物を満たした。工程は実施例1と同じ方法を介して整粒したが、今回は95%より多くの粒子が10ミクロン未満の4-6ミクロンのサイズを生成した。

40

実施例 6

サルファヘキサフルオリドガス-充填リポソームの形成

実施例1に記載と同じ方法を使用した。使用したガスはサルファヘキサフルオリド(99.99%、アルコン サージカル、フォート ワース、テキサス州)であり、そして使用したバイアルサイズは2 mlの琥珀色のバイアル(実際の容量=3.7ml)(ウィートン、ミルビル、ニュージャージー州)である点は異なった。バイアルに1.5mlの脂質/希釈賦形剤混合物を満たした。工程は実施例1と同じ方法を介して整粒したが、今回は95%より多くの粒子

50

が10ミクロン未満の4－6ミクロンのサイズを生成した。

実施例 7

インビトロ音響減衰試験を使用した圧力下のペルフルオロブタンガスー充填リポソームの安定性

ペルフルオロブタンガスー充填脂質二重層は、実施例4に記載のように調製した。脂質濃度が 1 mgml^{-1} から 5 mgml^{-1} の間で変動する試料を、 $200\text{ }\mu\text{L}$ のアリコートに取り、そして通常の生理塩溶液を希釈剤として10,000:1に希釈した。試料を始めにマグネチックスターラーを用いて混合して均一とし、そして次に止めた。変換器の原点から約25cmに位置するステンレス鋼板を完全反射板として使用した。使用した変換器は5.0MHzの広帯域の非-焦点浸漬型変換器であった(パナメトリックス:Panametrics、ウォルトハム、マサチューセツ州)。すべてのデータを488.2GPIB板(ナショナル インスツルメンツ、オースチン、テキサス州)を介して転送し、そしてGateway200080486プロセッサで処理した。

ガスー充填脂質二重層のサンプリングに先立ち、ベースライン調整を通常な塩溶液のみで行った。調整条件が確立した直後に、 $200\text{ }\mu\text{L}$ のアリコートを塩溶液に加え、そしてデータを周囲温度(20°C)で90秒間蓄積した。音響の減衰(図4を参照)は、 $2.0\pm 0.5\text{ dBcm}^{-1}$ の減衰で90秒間一定であった。第二試料を得、これにより試料の圧力が120mmHgに上昇し、そして減衰を記録した。周囲温度の実験のように、減衰は90秒間の試験時間にわたって少しの変動も無く一定であったが、減衰は約 0.9 dBcm^{-1} 間であった。別の試料を 37°C の一定温度で測定した。再度90秒間にわたって、減衰は一定であり、そしてその減衰はおおよそ 0.9 dBcm^{-1} であった。最後の試料を 37°C および120mmHg圧で測定した。今回は減衰が90秒間にわたって時間経過に従い直線的に 0.9 dBcm^{-1} から 0.4 dBcm^{-1} へと減少した。これは窒素ー充填脂質二重層よりも、この組成物の安定性が増したことを実証している。

実施例 8

インビトロ音響減衰試験を使用する、圧力下での窒素ガスー充填リポソームの安定性
実施例7と同一の実験を行ったが、ガスー充填脂質二重層は実施例1に記載の窒素ガスである点が異なった。減衰は周囲温度(20°C)およびヒト体温(37°C)の両方で安定な減衰であり意味があったが、内容物の希釈物を120mmHg圧に暴露すると減衰は急にベースライン調整値に下がった。これは窒素ー充填脂質二重層が、圧力下ではペルフルオロブタンー充填脂質二重層に比べて安定性を欠くことを示していた。

実施例 9

ペルフルオロシクロブタンガスー充填リポソームの数重量平均サイズに対する脂質濃度の効果

ペルフルオロシクロブタンガスー充填脂質二重層は、3種の脂質組成物濃度を除き、実施例5に記載のように調製した。この組成物は通常の(生理的)塩溶液:プロピレングリコール:グリセロール(8:1:1、容量:容量:容量)から成った。これに、終濃度が 1 mgml^{-1} から 5 mgml^{-1} の間で変動する82:10:8(モル%)のモル比のジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC):ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA):ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG5000(DPPE-PEG5000)の混合物を加えた。試料は2mlバイアル(実際の容量=3.7ml)(ウィートン イノダストリーズ、ミルビレ、ニュージャージー州)中で調製し、そしてパーティクルサイジングシステムズ モデル770ライトオブスキュレーションサイジングシステムで整粒した。以下の表で結果を記載する。

表9は脂質濃度の、例としてペルフルオロシクロブタンを使用したペルフルオロカーボンガスー充填脂質二重層の平均サイズに対する効果を実証している。

表 9

ペルフルオロシクロブタンガスー充填リポソームに対する

脂質濃度の効果

脂質濃度	数重量平均サイズ
1.0 mg ml ⁻¹	3.1 μm
3.0 mg ml ⁻¹	3.8 μm
5.0 mg ml ⁻¹	4.7 μm

10

実施例 10

実質的に不溶性ガスー充填リポソームを使用して、血流力学的変化が無いことの証明
 実施例 3、4、5 および 6 に記載のような脂質混合物を含むガスー充填脂質二重層の試料
 を、ペルフルオロプロパン (PFP)、ペルフルオロシクロブタン (PFCB)、ペルフルオロブタ
 ン (PFB) およびサルファヘキサフルオリド (SHF) を使用して、1 mgml⁻¹ および 3 mgml⁻¹ の全
 脂質濃度を用いて調製した。造影は体重約 28 kg の雑種のイヌについて、5 メガヘルツの変
 換器を装備したモデル 5200S 音響造影超音波機を使用して行った。動物をペントバルビタ
 ールナトリウムを用いて静かにさせ、部屋の換気を行い、そして肺動脈圧、全身の動脈圧
 および脈拍を監視した。心臓の造影は短軸位で行い、そして動物は 1 kg あたり 5 マイクロ
 リットル巨丸薬 PFP、PFCB、PFB を受容し、1 mgml⁻¹ および 3 mgml⁻¹ 脂質濃度の両方を試験し
 た。各注射の間を少なくとも 15 分間あけ、残存する任意のコントラストを除去した。すべ
 てのペルフルオロカーボン充填リポソーム (PFP、PFCB および PFB) は、1 mgml⁻¹ 脂質で心
 筋灌流増強を示したが、PFB は他よりもより強力であった。PFP は 3 mgml⁻¹ で向上した。SHF
 充填リポソームは 1 ml の脂質あたり 1 mg の濃度では、実証できるほどの心筋灌流増強を示
 さなかったが、1 ml の脂質あたり 3 mg の濃度で顕著な心筋増強を示した。

20

上記の実験を実際に別のイヌで繰り返し、そして同じ結果を得た。

30

ペルフルオロプロパン充填リポソームを使用して、血流力学的実験を別のイヌで行った。
 動物はキログラムあたり最高 300 マイクロリットルの巨丸薬を急速に多回受容し、すなわ
 ちイヌの造影よりも 50 回高い。多回投与が薬剤の血流力学的に高い安定性を示すことにも
 かかわらず、動物は任意の血流力学的パラメーターに変化が全くないことを示した。

実施例 11

Balb/c マウスを対象とした毒性試験に基づく治療率(ウィンドウ)の証明

毒性試験は、体重約 20 から 25 グラムの Balb/c マウスを対象とした行った。ペルフルオロプロ
 パン (PFP)、ペルフルオロシクロブタン (PFCB)、ペルフルオロブタン (PFB) およびサル
 ファヘキサフルオリド (SHF) の試料をトラップするリポソームの 1 mgml⁻¹ 脂質濃度の LD₅₀
 は、急速な巨丸薬の投与を介して試験した。各 PFCB、PFB および PFP 試料の LD₅₀ は、それぞ
 れ 12 mlkg⁻¹ よりも大きく、SHF ガスー充填脂質二重層に関しては 30 mgkg⁻¹ よりも大きく、
 これらの超音波診断に有用な生成物についてそれぞれ 2,400-1 および 6,000-1 より大きい
 治療指数を示している。

40

実施例 12

超音波コントラスト剤としてのペルフルオロペンタンガスー充填リポソームの使用

ニュージーランド ホワイト ウサギを、1 cc/kg のラビットミックス (8:5:2、容量:容量:
 容量、キシラジン、20 mgml⁻¹:ケタミン、10 mgml⁻¹:アセプロマジン、100 mgml⁻¹) の筋肉注
 射で麻酔をかけた。ウサギを Acoustic Imaging モデル 5200 診断用超音波および Acoustic
 Imaging モデル 5200S 診断用 Color Doppler インストルメント (アコースティック イメー
 ジング、フォエニックス、アリゾナ州) で造影した。ウサギには 23G バタフライカテーテ

50

ルを介して、縁の耳静脈に注射した。ウサギは 0.01cckg^{-1} から 0.1cckg^{-1} の範囲のペルフルオロペンタン-充填脂質二重層を、5-10秒の期間にわたって投与された。7.5MHzの変換器を使用した長軸の画像は、すべての4つの心室および心筋の明るい画像を20分から1時間にわたって明らかにした。変換器を次に肝臓領域に移動し、ここで明るいコントラストが肝臓静脈、肝門部静脈ならびに肝臓洞に観察された。変換器を次に腎臓上に置き、これは髓質と皮質領域中のコントラスト、ならびに腎臓動脈の脈管構造を明らかにした。診断用超音波変換器を次にカラードップラーと交換し、そして継続し、動物体内のすべての脈管化組織にわたって明るいコントラストが観察された。

実施例 1 3

ガス-充填リポソームの数およびサイズに対する、種々の濃度のペルフルオロプロパンおよび空気の効果

2 mlのバイアル（実際のサイズは3.7ml）（ウィートン、インダストリー、ミリバレ、ニュージャージー州）中の、重量比が8:1:1の通常の塩溶液:グリセロール:プロピレングリコール中の多数の脂質溶液試料（ 1mg/mL ；82:10:8モル%比のDPPC:DPPA:DPPE-PEG-5000）を、4つのキュービックフットキャパシティーを持つ変更したEdward モデル S04凍結乾燥機入れ、そして減圧にした。次にバイアルの頭隙に20%の空気を含む80% PFP、40%の空気を含む60% PFP、50%の空気を含む50% PFP、80%の空気を含む20% PFP、または100%の空気を封入した。種々の試料の頭隙中のガスの割合は、ヒューレットパッカード (Hewlett Packard) Chem(商標)ソフトウェアと接続したヒューレット パッカードガスクロマトグラフ モデル 1050Lのガスクロマトグラフィーによりで確認した。検出モードはフレイム (Flame) イオン化検出であった。次に試料をWig-L-Bug(商標)を使用して3,300RPMで60秒間振盪し、そして整粒し、そしてリポソーム数をすでに記載した光学的粒子整粒機で測定した。結果を上記表 2 に表す。

本明細書で引用または参照とした各特許および公報は、その全部を本明細書に編入する。本明細書で示し、そして記載したものに加えて、本発明の様々な変更態様が前述の記載から当業者には明らかであろう。そのような変更態様も添付の請求の範囲内にあるものと考ええる。

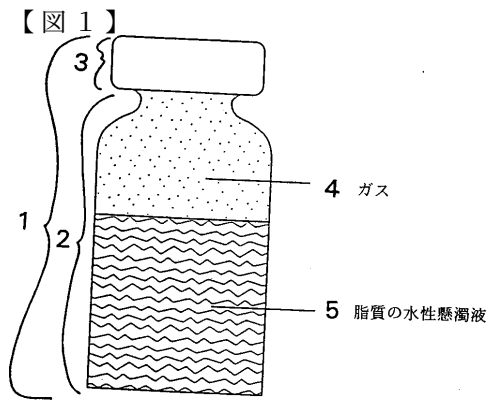


FIG. 1

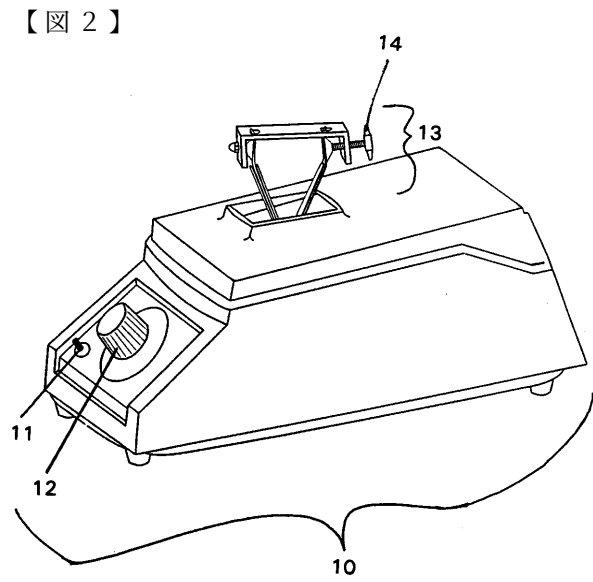


FIG. 2

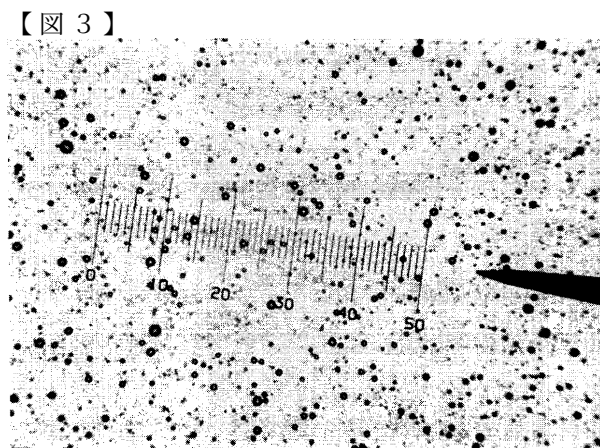


FIG. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
B 6 5 D 81/20 (2006.01) B 6 5 D 81/20 H

(72)発明者 イエローヘア, デイビッド
アメリカ合衆国アリゾナ州85746 トゥーソン・サウスビュプロモントリオ7350

審査官 齋藤 恵

(56)参考文献 国際公開第91/005546 (WO, A1)
国際公開第94/016739 (WO, A1)
国際公開第94/009829 (WO, A1)
特開平07-316079 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 9/127
A61K 49/00