(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3910630号
(P3910630)
(45)発行日　平成19年4月25日(2007.4.25)　(24)登録日　平成19年2月2日(2007.2.2)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 9/127	(2006.01)	A61K	9/127	
A61K 31/70	(2006.01)	A61K	31/70	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	M
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61P 7/00	(2006.01)	A61P	7/00	

請求項の数 32　(全 47 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-501807
(86)(22)出願日　平成6年5月19日(1994.5.19)
(65)公表番号　特表平9-501410
(43)公表日　平成9年2月10日(1997.2.10)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/005620
(87)国際公開番号　WO1994/028873
(87)国際公開日　平成6年12月22日(1994.12.22)
審査請求日　平成13年5月8日(2001.5.8)
(31)優先権主張番号　08/076,250
(32)優先日　平成5年6月11日(1993.6.11)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　597097962
イマアーレクス・フアーマシユーチカル・コーポレーシヨン
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７１９トウーソン・イーストエイテイーンスストリート１６３５
(74)代理人　100060782
弁理士　小田島　平吉
(72)発明者　アンガー,　エバン・シー
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７４９トウーソン・イーストカミノラセバデイラ１３３６５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規治療薬送達システム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

脂質および治療用化合物を含んでなる水溶液をガスの存在下、該脂質のゲルから液晶への相転移温度を下廻る温度で振盪することを特徴とするガス－充填リポソームを含む標的指向型治療用システムの調製方法。

【請求項２】

脂質を含む水溶液をガスの存在下、該脂質のゲルから液晶への転移温度を下廻る温度において振盪してガス－充填リポソームを形成し、そして該リポソームに治療用化合物を加える工程を含んでなるガス－充填リポソームを含む標的指向型治療用送達システムの調製方法。

【請求項３】

治療に使用するために得られるガス－充填リポソームを分離する工程をさらに含む請求項１または２記載の方法。

【請求項４】

リポソームを、選択した孔サイズの少なくとも１つのフィルターを通して押し出すことを含んでなる請求項１～３のいずれかに記載の方法。

【請求項５】

ガス－充填リポソーム微小球を含有する治療用組成物の作成方法であって、

（ａ）脂質および治療化合物を含んで成る水溶液を槽中に導入し、

（ｂ）該槽にガスを導入し、

（ｃ）該ガスの存在下で少なくとも該ガスの一部が該水溶液中に導入されるように該脂質水溶液を振盪し、ここで該振盪を該脂質のゲルから液晶への相転移温度を下廻る温度で実施して、該水溶液の上にガス－充填リポソーム含有泡を生成せしめ、そして
（ｄ）該ガス－充填リポソーム含有泡の少なくとも一部を該槽から抽出する、
工程を含んで成る上記方法。
【請求項６】
水溶液の冷却工程をさらに含んで成る請求項５記載の方法。
【請求項７】
水溶液の冷却工程が、該水溶液を該水溶液中の脂質のゲルから液晶への相転移温度を下回る温度に調節することを含んで成る、請求項６記載の方法。
【請求項８】
槽を加圧化する工程をさらに含んで成る、請求項７記載の方法。
【請求項９】
水溶液の振盪工程が上記槽の振盪工程を含む請求項５記載の方法。
【請求項１０】
ａ）槽を形成するバレルを備え、少なくとも１つのフィルターおよび針も備えるシリンジ、
ｂ）脂質および治療用化合物を含んで成る水溶液を該槽に導入する手段、
ｃ）ガスを該槽に導入する手段、
ｄ）該脂質のゲル状態から液晶状態への相転移温度を下廻る温度で槽中の該水溶液中に該ガスを封入し、それにより該槽内にガス－充填リポソームを含有する泡を生成する手段、および
ｅ）該泡を槽から抽出する手段であって、該バレルからフィルターを通してリポソームを押し出すことによりガス－充填リポソームの分粒手段を備える抽出する手段、
を含んでなるガス－充填リポソームを作成するための装置。
【請求項１１】
水溶液中へガスを封入する手段がシリンジを振盪する手段を備える請求項１０記載の装置。
【請求項１２】
フィルターが３０ｎｍ～２０μｍのサイズを有する細孔を備える請求項１０または１１記載の装置。
【請求項１３】
第１フィルターおよび第２フィルターを備え、かつ、第２フィルターが１０μｍの細孔サイズを有しそして第１フィルターが８μｍの細孔サイズを有するものである請求項１０記載の装置。
【請求項１４】
バレル、フィルターアッセンブリーおよび針を有するシリンジ含んで成るガス－充填リポソーム装置であって、該フィルターアッセンブリーが該バレルおよび該針の間に取り付けられ、そして少なくとも１つのフィルターを含んで成り、該バレルは、脂質を含んでなる水溶液をガスの存在下、該脂質のゲルから液晶への相転移温度を下廻る温度で振盪することにより調製されたガス－充填リポソームを含有し、そして治療用化合物をさらに含むものである、上記装置。
【請求項１５】
フィルターアッセンブリーが、針に面する側およびバレルに面する側を有する第１フィルター、第２フィルター、第１フィルターの該針に面する側およびバレルに面する側のそれぞれに第１および第２金属のメッシュディスク、該第２金属メッシュディスクと該第２フィルターとの間のＯ－リングを備える段階的フィルターアッセンブリーであり、そして該第２フィルターは該第１フィルターのバレルに面する側から１５０μｍ離れている、請求項１４記載の装置。
【請求項１６】

第１フィルターおよび第２フィルターが細孔を有し、該第２フィルターは１０μｍの細孔サイズを、そして該第１フィルターは８μｍの細孔サイズを有する、請求項１５記載の装置。
【請求項１７】
ガス－充填リポソームが一枚膜である請求項１～９のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
ガス－充填リポソームが一枚膜である請求項１０～１６のいずれかに記載の装置。
【請求項１９】
一枚膜リポソームがリン脂質を含んでなる請求項１７記載の方法。
【請求項２０】
一枚膜リポソームがリン脂質を含んでなる請求項１８記載の装置。
【請求項２１】
水溶液がポリマーをさらに含んでなる請求項１～９のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
ポリマーがポリエチレングリコール、キチン、ポリグルタミン酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリリシン、ポリアルギニン、アルギン酸、デキストラン、澱粉、ＨＥＴＡ澱粉、ポリラクチド、ポリエチレンイミン、ポリイオネンおよびポリイミノカルボキシレートからなる群より選ばれる請求項２１記載の方法。
【請求項２３】
ポリマーがポリエチレングリコールを含んでなる請求項２２記載の方法。
【請求項２４】
水溶液がポリマーをさらに含んでなる請求項１０～１３のいずれかに記載の装置。
【請求項２５】
ポリマーがポリエチレングリコール、キチン、ポリグルタミン酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリリシン、ポリアルギニン、アルギン酸、デキストラン、澱粉、ＨＥＴＡ澱粉、ポリラクチド、ポリエチレンイミン、ポリイオネンおよびポリイミノカルボキシレートからなる群より選ばれる請求項２４記載の装置。
【請求項２６】
ポリマーがポリエチレングリコールを含んでなる請求項２５記載の装置。
【請求項２７】
リポソームがポリマーを含んでなる請求項１４～１６のいずれかに記載の装置。
【請求項２８】
ポリマーがポリエチレングリコール、キチン、ポリグルタミン酸、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン、ポリリシン、ポリアルギニン、アルギン酸、デキストラン、澱粉、ＨＥＴＡ澱粉、ポリラクチド、ポリエチレンイミン、ポリイオネンおよびポリイミノカルボキシレートからなる群より選ばれる請求項２７記載の装置。
【請求項２９】
ポリマーがポリエチレングリコールを含んでなる請求項２８記載の装置。
【請求項３０】
脂質が凍結乾燥されたものである請求項１～９のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
脂質が凍結乾燥されたものである請求項１０～１３のいずれかに記載の装置。
【請求項３２】
ガス－充填リポソームが凍結乾燥リポソームから再水和されたものである請求項１４～１６のいずれかに記載の装置。
【発明の詳細な説明】
関連出願
本出願は、各々1991年6月18日に出願された同時係属出願の米国特許出願第716,899号および同717,084号の一部継続出願であり、これらは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1990年8月20日出願の米国特許出願第569,828号の一

部継続出願である。これらの各々の特許出願の開示は全部、引用により本明細書に編入される。

発明の背景

発明の分野

本発明は治療薬送達の分野に関し、より詳細には治療化合物を含んで成るガス－充填微小球（マイクロスフェア）に関する。本発明はさらに、そのような微小球を治療薬送達システムとして使用する方法に関する。

発明の背景

標的指向型薬物送達は、薬物の毒性が問題である場合に特に重要である。特異的な薬物送達法は毒性の副作用を最少にし、必要な投与量を減少させ、そして患者の経費を下げるのに役立つ可能性がある。本発明はこれらの、そして／または薬物送達の分野における他の重要なニーズに取り組む事を対象とする。

例えば生細胞に遺伝物質を導入するための従来技術の方法および材料には限界があり、そして効率が悪い。今日まで、数種類の異なる機構が遺伝物質を生細胞に送達するために開発されてきた。これらの方法には、リン酸カルシウム沈殿法および電気穿刺法、ならびにカチオン性ポリマーおよび水性－充填リポソームのようなキャリアーを含む。これらの方法はすべてインビボでは比較的非効率的であり、そして細胞培養トランスフェクションに使用されているだけである。これらの方法はいずれも遺伝物質を標的細胞に局所放出し、送達し、そして組換えを強化するために使用されてはいない。

遺伝物質のような治療物質のための、よりよい送達手段が広範なヒトおよび動物の治療のために必要とされている。遺伝疾患の特徴決定およびタンパク質転写の解明については多大な研究がなされてきているが、ヒトおよび動物疾患の治療のために遺伝物質を細胞へ送達することに関しては比較的進歩がない。

原理的な難しさは、遺伝物質を細胞外空間から細胞内空間へ送達すること、またはさらに遺伝物質を選択した細胞膜の表面に効果的に局存させることであった。様々な技術がインビボで試されて来たが、成功しなかった。例えばアデノウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルスが遺伝物質を細胞に移すベクターとして使用された。ウイルス全体が使用されたが、ウイルスカプセルの内部に存在できる遺伝物質の量は限られ、かつ生ウイルスにより引き起こされるかもしれない危険な相互作用の可能性についての心配がある。ウイルスカプセルの本質的成分を単離し、そして選択した細胞に遺伝物質を運ぶために使用することができる。しかし、インビボではこの送達ビークルが特定の細胞を認識しなければならないだけでなく、これらの細胞に送達されなければならない。ウイルスベクターに関する徹底的な実験にもかかわらず、遺伝物質をインビボで送達するための標的ウイルス媒介ベクターを成功裏に開発することは困難であった。

従来の液体－含有リポソームは、細胞培養中の細胞に遺伝物質を送達するために使用されて来たが、遺伝物質の細胞送達にはインビボで大概は効果的ではなかった。例えば、カチオン性リポソームの伝達法はインビボではうまくいかなかった。遺伝物質のような治療物質の細胞送達を向上させる、より効果的な手段が必要である。

発明の要約

本発明はガス－充填微小球を使用して、治療薬の部位特異的送達に関する薬物送達システムを提供する。いったん微小球が患者の体内に投与されると、治療化合物は標的部位に向けられ、そして微小球を破壊し治療化合物を放出させる音波エネルギーの使用により、特異的組織を標的にすることができる。

特に本発明は治療化合物を含んで成るガス－充填微小球を含んで成る標的指向型治療薬送達システムを提供する。

本発明はまた、患者の部位への制御された治療化合物の送達法を提供し、その方法は（ｉ）患者に治療化合物を含んで成るガス－充填微小球を投与し、（ii）その微小球がその部位に存在することを測定するために超音波を使用して微小球を監視し、そして（iii）超音波を使用して微小球を破壊してその部位に治療化合物を放出する、工程を含んで成る。

さらに、本発明は薬物送達剤として使用するために適するガス－充填リポソームを調製す

るための方法および装置を提供する。本発明の好適な方法は例えば、治療薬を含んで成るガス－充填リポソームの製造の簡便さ、および経費節減の可能性という利点を提供する。ガス－充填リポソームはドラッグキャリアーとして特に有用である。水溶性である薬物をカプセル化するためにのみ適する、液体内部を持つ従来技術のリポソームとは異なり、本発明により作成されたガス－充填リポソームは親油性薬物をカプセル化するためにも特に有用である。さらに、メタロセンジハライドのアルキル化誘導体のような薬物の親油性誘導体は容易に脂質層に包含されることができる。Kuoら、J.Am.Chem.Soc.1991 113,9027-9045。

本発明の利点の１つは、微小球中のガスにより超音波エネルギーを補足し、これは崩壊時に膜の流動体を局所的に増大させ、これにより治療薬の細胞内取り込みが増強するという点であると考えられる。

本発明のこれらの、および他の特徴および利点は以下の図面および記載によりさらに詳しく説明されるだろう。

【図面の簡単な説明】

第１図はリポソーム微小球の壁内に埋め込まれた治療化合物を有するガス充填リポソーム、ならびに続いて超音波の適用時の治療薬の放出を図式的に表したものである。

第２図はリポソーム微小球の壁の内層中に埋め込まれた治療化合物を有するガス充填リポソーム、および暴露されたガス－充填内部、ならびに続いて超音波の適用時の治療薬の放出を図式的に描いたものである。

第３図はリポソーム微小球の壁の外層内に埋め込まれた治療化合物を有するガス充填リポソーム、および暴露されたガス－充填内部、ならびに続いて超音波の適用時の治療薬の放出を図式的に説明したものである。

第４図はリポソーム微小球の壁の内および外層内に埋め込まれた治療化合物を有するガス充填リポソーム微小球、ならびに暴露されたガス－充填内部および外部環境、ならびに続いて超音波の適用時の治療薬の放出を図式的に説明したものである

第５図はリポソーム内部に結合した治療化合物を有するガス充填リポソーム微小球、ならびに続いて超音波の適用時の治療薬の放出を図式的に描いたものである。

第６図はリポソーム微小球の外部に結合した治療化合物を有するガス充填リポソーム微小球、ならびに続いて超音波の適用時に治療薬の放出を図式的に説明したものである。

第７図はリポソーム微小球の内部および外部に結合した負に荷電した薬物（Ａ）または正に荷電した薬物（Ｂ）のような治療化合物を有するガス充填リポソーム微小球、ならびに続いて超音波の適用時の治療薬の放出を図式的に描いたものである。

第８図はガス－充填空間内部中にカプセル化された治療化合物を有するガス充填リポソーム微小球、ならびに続いて超音波の適用時の治療薬の放出を図式的に説明したものである。

第９図は本発明の治療物質含有ガス－充填リポソーム微小球を調製するための、本発明による好適な装置の一部図解の概観である。

第１０図は、本発明の治療物質含有ガス－充填リポソーム微小球を濾過および／または調剤するための好適な装置を表す。

第１１図は、本発明の治療物質含有ガス－充填リポソーム微小球を濾過および／または調剤するための好適な装置を描いたものである。

第１２図は、第１１図の装置の一部分解組立図の概観である。

第１３図は吸引乾燥ガス封入法により調製した、実質的に内部に液体が無く、薬物が中にカプセル化されていないガス充填リポソームのdB反射能をグラフで表したものである。データはAcoustic Imaging(商標)モデル5200スキャナー（アコースティック イメージング:Acoustic Imaging、フェニックス、アリゾナ州）を使用して7.5メガワットでスキャンニングし、そして反射能を測定する試験ソフトウェアシステムを使用することにより得た。このシステムは各実験の前に、既知の音響インピーダンスの疑似模型で標準化した。

第１４図は、薬物含有乾燥吸引ガス封入リポソームの調製のための好適な装置、および吸引乾燥ガス封入法により調製した実質的に内部に液体がない薬物含有ガス封入リポソーム

を表す。
第１５図は、本発明のガス－充填リポソームの濾過前（Ａ）および後（Ｂ）の大きさを表すマイクログラフである。
第１６図は、本発明のガス－充填リポソームの濾過前（Ａ）および後（Ｂ）の大きさの分布をグラフで描いたものである。
第１７図は、フィルターから押し出される前（Ａ）および後（Ｂ）の脂質懸濁液のマイクログラフである。
第１８図は、脂質懸濁液の濾過およびオートクレーブに続いて形成されたガス－充填リポソームのマイクログラフであり、このマイクログラフはガス－充填リポソームの濾過による大きさの分別前（Ａ）および後（Ｂ）に作成された。

発明の詳細な説明

本発明は治療化合物を含んで成るガス－充填微小球を含んで成る標的指向型薬物送達システムを提供する。微小球とは内部空間を有する、比較的球状の構造と定義する。治療化合物は所望により微小球の壁部に埋め込まれ、微小球にカプセル化され、かつ／または微小球に結合させられる。“結合させられる”という句またはその変形が本明細書にて治療化合物の位置との関係で使用される場合、治療化合物は微小球の内側および／または外側壁に、共有またはイオン結合あるいは他の化学的または電気化学的結合、もしくは相互作用を介して結合するような、例えば第５、６および７図に示すような幾つかの様式で連結されていることを意味する。“カプセル化される”という句またはその変形が本明細書にて治療化合物の位置との関係で使用される場合、治療化合物は例えば第８図に示すように、微小球の内部空所に位置することを表す。“中に埋め込まれる”という句またはその変形が本明細書にて治療化合物の位置との関連で使用される場合、例えば第１、２、３および４図に示すように微小球の壁内に治療化合物は位置することを意味する。“治療物質を含んで成る”という句は微小球と関連して位置する治療用物質のさまざまな種類のすべてを言う。したがって、治療物質はさまざまに位置することができ、例えばガス－充填微小球の内部空所内に閉じ込められるか、ガスとガス－充填微小球の内壁との間に位置するか、ガス－充填微小球の外部表面中に包含されるか、かつ／または微小球の構造自体の網目にからませることができる。また当業者はいったん本開示から準備を始めれば、微小球の壁が脂質を含んで成るとき、壁は１つ以上の脂質二重層を有することができると理解するだろう。

本発明の微小球はインビボまたはインビトロのいずれかで標的指向型治療物質を送達するために使用することができる。好ましくは各々別個の微小球が、実質的にすべての治療化合物を超音波適用時に放出することができる。“実質的にすべて”とは、少なくとも約80％、そして好ましくは少なくとも約90％、そして最も好ましくは約100％を言う。特定の態様では、すべての微小球からのすべての治療化合物の放出は即座に起こり、そして別の態様では放出は徐々に起こる。当業者はいったん本開示から準備を始めれば、放出の好適速度が治療的投与の種類に応じて大変異なると考えるだろう。特定の好適な態様では、例えば治療化合物は微小球にカプセル化され、したがって実質的にすべての治療化合物が微小球の崩壊時直ぐに放出される。さらに、当業者はいったん本開示から準備を始めれば、適用する超音波の周波数および期間は治療化合物の所望の放出速度を達成するために変化させることができると考えるだろう。

したがって上記のように、送達される治療物質を多種の治療物質のようにガス－含有微小球内にカプセル化することができ、カチオン性脂質を負に荷電したDNAで、またはアニオン性脂質を正に荷電した薬物で被覆するようにガス－含有微小球の表面に取り込むことができ、ならびに/または油親性治療物質のようにガス－含有微小球の壁中に埋め込むことができる。微小球は治療物質を含んで成る微小球として調製でき、あるいは微小球を治療物質なしで調製し、そして使用前に治療物質をガス－充填微小球に加えることもできる。後者の場合は、例えば水性媒質中のガス－充填微小球に治療物質を加え、そして微小球を治療物質で被覆するように振盪することができる。

本明細書で使用する“ガス－充填”とは、少なくとも約10％のガス、好ましくは少なくと

も約25%のガス、より好ましくは少なくとも約50%のガス、さらに一層好ましくは少なくとも約75%のガス、そして最も好ましくは少なくとも約90%のガスである内部容量を有する微小球を意味する。当業者はいったん本発明の開示から準備をすれば、ガス状の前駆体も使用でき、続いて活性化されてガスを生成すると考えるであろう。

様々な生物適合性のガスを本発明のガス－充填微小球に利用できる。そのようなガスには、空気、窒素、二酸化炭素、酸素、アルゴン、フッ素、キセノン、ネオン、ヘリウムまたは任意のすべてのこれらの混合物を含む。他の適当なガスは、当業者がいったん本発明の開示から準備をすれば明らかになるだろう。

本発明の微小球は、好ましくは不透過性材料を含んで成る。不透過性材料とは、典型的な保存条件で、または超音波が誘導する放出が起こる使用前に微小球の内容の実質的量を通過させない材料と定義する。典型的な保存条件とは例えば、0.9% NaClの非－脱気水溶液中で4℃で48時間維持される。不透過性との関連で実質的とは、内容の約50%より多い量と定義し、そして内容とはガスおよび治療用物質の両方である。好ましくは保存中に25%以下のガスおよび治療物質が放出し、より好ましくは約10%以下のガスおよび治療物質が放出し、最も好ましくは約1%以下のガスが放出する。保存条件の温度は、好ましくは微小球を形成する材料の相転移温度未満である。

少なくとも一部は、ガス－充填リポソームのガス不透過性はゲル状態から液体結晶状態への相転移温度に関連することが判明した。“ゲル状態から液体結晶状態への相転移温度”とは脂質二重層がゲル状態から液体結晶状態へ転換する温度を意味する。例えば、Chapmanら、J.Biol.Chem.1974 249,2512-2521を参照にされたい。一般的に、ゲル状態から液体結晶状態へのより高い相転移温度で、リポソームは所定温度で、よりガス不透過性であると考えられる。飽和ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンの主鎖融解転移に関しては、下記表ＩおよびDerekおよびMarsh、CRC脂質二重層ハンドブック(CRC Handbook of Lipid Bilayers)(CRC出版、ボカ　ラトン、フィラデルフィア州、1990)、第139頁を参照にされたい。しかし、ゲル状態から液体結晶状態への相転移温度が低い脂質から成るガス－充填リポソームから治療用化合物を放出するためには、一般的により低度のエネルギーの使用でよいことにも注目すべきである。

表Ｉ

飽和ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン

主鎖のゲル状態から液体結晶状態への相転移温度

# アシル鎖中の炭素	主な相転換温度(℃)
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

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当業者には容易に明らかであり、そして例えばGregoriadis編集、リポソーム技法(Liposome Technology)、第Ｉ巻、1-18(CRC出版、1984)に記載されている。

特定の好適な態様では、微小球を形成する材料の相転移温度は微小球が投与される患者の体内温度よりも高い。例えば、約37℃よりも高い相転移温度を有する微小球はヒトに投与するのに好ましい。一般的に、約20℃より高い相転移温度を有する微小球が好ましい。

好適な態様では、本発明の微小球は安定であり、安定性とは形成された時から超音波適用までの間の破壊に対する耐性と定義する。微小球を構築するために使用する脂質のような材料を安定性のために選択することができる。例えばDSPC(ジステアロイルホスファチジルコリン)から成るガス－充填リポソームは、DPPC(ジパルミトイルホスファチジルコリン)から成るガス－充填リポソームよりも安定であり、そしてこれらは次に卵ホスファチジルコリン(EPC)から成るガス-充填リポソームよりも安定である。好ましくは約50%以下の微小球が、形成された時から超音波の適用までに崩壊し、より好ましくは約25%以下の微小球が崩壊し、そしてさらに一層好ましくは約10%以下の微小球、そして最も好ましくは約1%以下の微小球が崩壊する。

さらに、少なくとも少量の負に荷電した脂質がリポソーム膜に包含されると（必須ではないが）、一緒に融合することによる崩壊傾向が無いリポソームを提供するのに有利であると判明した。少なくとも少量とは、全脂質の約１モルパーセントを意味する。適当な負に荷電した脂質は当業者には容易に明らかであり、そして例えばホスファチジルセリンおよび脂肪酸を含む。共鳴周波数超音波の適用に際して破壊する能力、エコジェニシティー(echogenicity)および安定性に関して最適なのは、ジパルミトイルホスファチジルコリンから調製されたリポソームである。

さらに本発明の微小球は、好ましくは再循環に耐えるように管脈構造中で十分に安定である。ガス－充填微小球は網内系による取り込みが最小になるように被覆されることができる。有用なコーティングには、例えばガングリオシド、グルクロネート、ガラクツロネート、グルウロネート、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、デキストラン、澱粉、リン酸化およびスルホン化モノ、ジ、トリ、オリゴおよびポリサッカライドならびにアルブミンを含む。微小球はまた免疫系による認識を回避するような目的のために被覆することもできる。

材料の不透過性から、好適な態様では標的にされ、そして超音波を適用する患者の内部領域に到達するまでに、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは約90%、そして最も好ましくは約100%の微小球の治療物質およびガス内容物が微小球に留まる。

さらに、微小球を形成するために使用する材料は生物適合性があるものでなければならない。生物適合性材料とは投与される量で患者に非毒性であり、そして好ましくは疾病を発生させず、そして最も好ましくは無害である。

微小球を形成するために使用する材料も好ましくは柔軟である。ガス－充填微小球の内容において定義される柔軟性とは、例えば微小球よりも小さいサイズの開口を通過するために、その形を変形するための構造の能力である。

リポソームはガスを閉じ込めるのに高度に有用であるので、本発明の好適態様である。さらにガス－充填リポソームは、その生物適合性および油親性治療化合物をリポソームが破壊した後に容易に細胞膜を通過させることができる能力から、好ましい。当業者は本開示から準備すれば使用目的に応じて特定の脂質を選択できると認識するだろう。

微小球の循環半減期が十分に長いならば、一般的に微小球は体内を通過しながら標的組織を通過するだろう。したがって、治療すべき選択した組織に対して音波を誘導し、崩壊を集中させることにより、治療物質が標的組織に局所的に放出されるだろう。さらに標的指向型を促進するために、抗体、炭水化物、ペプチド、糖ペプチド、糖脂質およびレクチンも微小球の表面に包含することができる。

脂質材料が微小球を作成するために使用される場合、これはリポソームを形成し、種々の脂質を微小球を構築するために使用することができる。リポソームを調製するために使用できる脂質には、リポソームの調製に適する当業者には周知の任意の材料またはその混合物を含む。脂質は天然または合成起源のものであってよい。特定の脂質を所望の特性に至適化するために選択され、例えばそれは最大の血清安定性のための短いプラズマ半減期対　長いプラズマ半減期などである。

ガス－充填リポソーム中の脂質は単二重層または多重膜二重層の状態であることができ、そして好ましくは多重膜二重層である。

リポソーム微小球を作成するために使用することができる脂質は、限定するものではないが以下のものを含む：脂肪酸、リゾリピッドのような脂質、飽和または不飽和脂質の両方を有するホスファチジルコリン（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、ジペンタデカノイルホスファチジルコリン、ジラウロ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、ジステアロイルホスファチジルコリンを含む）；ジオレオイル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、ホスファチジルイノシトールのようなホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンのようなスフィンゴリピッド；ガングリオシドGM1およびGM2、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のような糖脂質；

ホスファチジン酸；パルミチン酸；ステアリン酸；アラキドン酸；オレイン酸；ポリエチレングリコール、キチン、ヒアルロン酸またはポリビニルピロリドンのようなポリマーを持つ脂質；スルホン化モノ－、ジ－、オリゴ－またはポリサッカライドを持つ脂質；コレステロール、硫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；トコフェロール ヘミスクシネート；エーテルまたはエステル－結合脂肪酸を持つ脂質、重合脂質、ジアセチルホスフェート、ステアリルアミン、カルジオリピン、6－8の炭素長の短鎖脂肪酸を持つリン脂質、非対称アシル鎖を持つ合成リン脂質（例えば１つが6個の炭素原子のアシル鎖であり、もう１つが12個の炭素原子を持つアシル鎖）、6-(5-コレステン-3β-イルオキシ)-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド、ジガラクトシルジグリセリド、6-(5-コレステン-3β-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド、6-(5-コレステン-3β-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシル-1-チオ-α-D-マンノピラノシド、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；コレステリル)4'-トリメチル-アミノ)ブタノエート；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ノ；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；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；および／またはそれらの混合物。所望により、DOTMA、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；DOTAP、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアミノ)プロパン；およびDOTB、1,2-ジオレオイル-3-(4'-トリメチル-アンモニオ)ブタノイル-sn-グリセロールのような様々のカチオン性脂質を使用できる。一般的に、リポソーム中のカチオン性脂質の非カチオン性脂質に対するモル比は、例えば1:1000、1:100、好ましくは2:1から1:10の間、より好ましくは1:1から1:2.5の間の範囲、そして最も好ましくは1:1（カチオン性脂質のモル量 対 非カチオン脂質のモル量の比、例えばDPPC）。カチオン性脂質が微小球を構築するために使用される時、広範な種類の脂質が非カチオン脂質を含んで成ることができる。好ましくはこの非カチオン性脂質は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ルエタノールアミンまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミンである。上記のカチオン性脂質の代わりに、ポリリシンまたはポリアルギニンのようなカチオン性ポリマーを持つ脂質も微小球を構築するために使用することができ、遺伝物質のような負に荷電した治療物質を微小球の外側に結合することを可能にする。

本発明の範囲を逸脱することなく当業者には明らかである、他の有用な脂質またはそれらの混合物も、本発明に包含される。例えば炭水化物－含有脂質は、米国特許第4,310,505号明細書に記載されるようにインビボ標的指向型に使用されることができ、この開示は全部、引用により本明細書に編入される。

もっとも好ましい脂質はリン脂質、好ましくはDPPCおよびDSPC、そして最も好ましいのはDPPCである。

ガス－充填微小球を作成するために使用できる飽和および不飽和脂肪酸は、限定するものではないが好ましくは12から22個の間の炭素原子を有する、直鎖もしくは分枝状態の分子を含む。使用できる飽和脂肪酸の例には限定するものではないが、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸およびステアリン酸がある。使用できる不飽和脂肪酸の例には限定するものではないが、ラウロレイン酸、フィゼテリン酸、ミリストオレイン酸、パルミトレイン酸、ペトロセリン酸およびオレイン酸がある。使用できる分枝脂肪酸の例には限定するものではないが、イソラウリン酸、イソミリスチン酸、イソパルミチン酸およびイソステアリン酸およびイソプレノイドがある。

脂質溶液またはガス－充填リポソーム溶液は、例えば種々の粘性モディファイヤーの添加により安定化させることができ、それらには限定するものではないが、炭水化物およびそれらのリン酸化およびスルホン化誘導体；分子量範囲が400から8000の間の範囲のポリエーテル；ジ-およびトリヒドロキシアルカンならびにそのポリマー、好ましくは800から8000の間の分子量範囲のものを含む。乳化剤および／または可溶化剤も脂質またはリポソー

ムと一緒に使用できる。そのような薬物は限定するものではないが、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－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、ポロキサマー、ポリオキシエチレン50ステアレート、ポリオキシル35キャスター油、ポリオキシル10オレイルエーテル、ポリオキシル20セトステアリルエーテル、ポリオキシル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、トロラミンおよび乳化ロウを含む。脂質またはリポソーム溶液とともに使用できる懸濁化および／または増粘剤は、限定するものではないがアカシア、寒天、アルギン酸、モノステアリン酸アルミニウム、ベントナイト、マグマ、カーボマー（carbomer）934P、カルボキシメチルセルロース、カルシウムおよびナトリウムおよびナトリウム12、カラゲーナン、セルロース、デキストリン、ゼラチン、グアガム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、珪酸アルミニウムマグネシウム、メチルセルロース、ペクチン、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポビドン、アルギン酸プロピレングリコール、二酸化珪素、アルギン酸ナトリウム、トラガカントおよびキサンタンガムを含む。

様々な治療物質を微小球にカプセル化することができる。本明細書で使用する治療物質とは、患者に有利な効果を有する薬物を意味する。本明細書で使用するように、治療物質という用語は薬物という用語の類義語である。

適当な治療用物質には、限定するものではないが以下のものがある；白金化合物のような抗悪生物質剤（例えば、スピロプラチン、シスプラチンおよびカルボプラチン）、メトトレキセート、アドリアマイシン、マイトマイシン、アンサミトシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシド、アラビノシルアデニン、メルカプトポリリシン、ビンクリスチン、ブズルファン、クロラムブシル、メルファラン（例えばPAM、L-PAMまたはフェニルアラニンマスタード）、メルカプトプリン、ミトタン、塩酸プロカルバジン、ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、タキソール、マイトマイシン、ピリカマイシン（ミトラマイシン）、アミノグルテチミド、エストラムスチンリン酸ナトリウム、フルタミド、酢酸ロイプロリド、酢酸メゲストロール、クエン酸タモキシフェン、テストラクトン、トリロスタン、アムサクリン（m-AMSA）、アスパラギナーゼ（L-アスパラギナーゼ）Erwinaアスパラギナーゼ、エトポシド（VP-16）、インターフェロン α-2a、インターフェロン α-2b、テニポシド（VM-26）、硫酸ビンブラスチン（VLB）、硫酸ビンクリスチン、ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、メトトレキセート、アドリアマイシンおよびアラビノシル；非経口鉄、ヘミン、ヘマトポルフィリンおよびその誘導体のような血液生成物；ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド、微生物細胞壁成分、リンホカイン（例えばリポ多糖のような細菌エンドトキシン、マクロファージ活性化因子）、細菌の副単位（マイコバクテリア、コリネバクテリアのような）、合成ジペプチド N-アセチル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミンのような生物反応モディファイヤー；ケトコナゾール、ニスタチン、グリセオフルビン、フルシトシン(5-fc)、ミコナゾール、アンフォテリシンB、リシン、およびβ-ラクタム抗生物質（例えばサルファゼシン）のような抗真菌剤；成長ホルモン、メラノサイト活性化ホルモン、エストラジオール、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ベタメタゾン、酢酸ベタメタゾンおよびリン酸ナトリウムベタメタゾン、リン酸二ナトリウムベタメタゾン、リン酸ナトリウムベタメタゾン、酢酸コルチゾン、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸ナトリウムデキサメタゾン、フルニソリド、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンシピオネート、リン酸ナトリウムヒドロコルチゾン、コハク酸ナトリウムヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、酢酸メチルプレドニゾロン、コハク酢酸ナトリウムメチルプレドニゾロン、酢酸パラメタゾン、プレドニゾロン、酢酸プレドニゾロン、リン酸ナトリウムプレドニゾロン、プレドニゾロンテブテート、プレドニゾン、トリアムシノロン、トリ

アムシノロンアセトニド、トリアムシノロン二酢酸、トリアムシノロンヘキサアセトニドおよび酢酸フルドロコルチゾンのようなホルモン；シアノコバラミンネイノイックアシッド、レチノイドおよびパルミチン酸レチノールのような誘導体、およびα-トコフェロールのようなビタミン；過酸化マンガンジスムターゼのようなペプチド；アルカリホスファターゼのような酵素；アメレキサノックスのような抗－アレルギー剤；フェンプロコーモンおよびヘパリンのような抗－凝固剤；プロプラノールオールのような循環薬物；グルタチオンのような代謝増強剤；パラアミノサリチル酸、イソニアジド、硫酸カプレオマイシン、サイクロセリン、塩酸エタンブトール、エチオナミド、ピラジンアミド、リファムピンおよび硫酸ストレプトマイシンのような抗結核剤；アシクロビル、アマンタジン、アジドチミジン（AZTまたはジドブジン）、リバビリンおよびビダラビン１水和物（アデニンアラビノシド、ara-A）のような抗ウイスル剤；ジルチアゼン、ニフェジピン、バラパミル、四硝酸エリトリチル、イソソイルビジドジニトレート、ニトログリセリン（三硝酸グリセリル）および四硝酸ペンタエリスルトールのような抗狭心症剤；フェンプロコーモン、ヘパリンのような抗凝固剤；ダプゾン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、セファクロール、セファドロキシル、セファレキシン、セファラジン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、リンコマイシン、アモキシリン、アンピシリン、バカンエピシリン、カルベニシリン、ジクロキサシリン、サイクラシリン、ピクロキサシリン、ヘタシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリンG、ペニシリンV、チカルシリン、リファンピンおよびテトラサイクリンのような抗生物質；ジフルニサル、イブプロフェン、インドメタシン、メクロフェナメート、メフェナム酸、ナプロキセン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、トルメチン、アスピリンおよびサリチレートのような抗炎症剤；クロロキン、ヒドロキシクロロキン、メトロニダゾール、キニンおよびメグルミンアンチモネートのような抗原虫剤；ペニシラミンのような抗リューマチ剤；アヘン安息香チンキのような麻酔剤；コデイン、ヘロイン、メタドン、モルフィンおよびオピウムのようなアヘン誘導体；デスラノシド、ジギトキシン、ジゴキシン、ジギタリンおよびジギタリスのような強心薬グリコシド；メシル酸アトラクリウム、ガラミントリエチオダイト、臭化ヘキサフルオレニウム、ヨウ化メトクリン、臭化パンクロニウム、塩化スクシニルコリン（塩化スキサメトニウム）、塩化ツボクラリンおよび臭化ベクロニウムのような神経筋遮断剤；アモバルビタール、アモバルビタールナトリウム、アプロバルビタール、ブタバルビタールナトリウム、クロラール水和物、エトクロルビノール、エチナメート、塩酸フルラゼパム、グルテチミド、塩酸メトトリメプラジン、メチプロリン、塩酸ミダゾラム、パラアルデヒド、ペントバルビタール、ペントバルビタールナトリウム、フェノバルビタールナトリウム、セコバルビタールナトリウム、タルブタール、テマゼパムおよびトリアゾラムのような鎮静剤（低張性）；塩酸ブピバカイン、塩酸クロロプロカイン、塩酸エチドカイン、塩酸リドカイン、塩酸メピバカイン、塩酸プロカインおよび塩酸テトラカインのような局所麻酔剤；ドロペリドール、エトミデート、ドロペリドールとクエン酸フェンタニール、塩酸ケタミン、メトヘキシタールナトリウムおよびチオペンタールナトリウムのような全身麻酔剤；ならびにストロンチウム、ヨウ化レニウムおよびイットリウムのような放射性粒子またはイオン。

特定の好適な態様では、治療物質はメラノーマ抗原に結合できるモノクローナル抗体ようなモノクローナル抗体である。

他の好適な治療物質には天然または合成のいずれかの起源の核酸、RNAおよびDNAがあり、組換えRNAおよびDNAならびにアンチセンスRNAおよびDNAを含む。使用できる遺伝物質には例えば、プラスミド、ファジミド、コスミド、酵母組換え染色体（yeast artificial chromosomes:YACs）のような発現ベクターを持つ遺伝子、ならびに欠陥または“ヘルパー”ウイルス、アンチジーン核酸、一本および二本鎖RNAおよびDNAならびにそれらの類似体（ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートオリゴデオキシヌクレオチドのような）が含まれる。さらに、遺伝物質を例えばタンパク質または他のポリマーと混合することができる。

本発明の微小球を使用して投与できる遺伝的治療物質には、少なくともHLA遺伝子の一部

をコードするDNA、少なくともジストロフィンの一部をコードするDNA、少なくともCFTRの一部をコードするDNA、少なくともIL-2の一部をコードするDNA、少なくともTNFの一部をコードするDNA、少なくともRasの一部をコードするDNAに結合できるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

特定のタンパク質をコードするDNAは、多くの様々な種類の疾患の治療に使用できる。例えば、アデノシンデアミナーゼはADA欠損症の治療に提供できる；腫瘍壊死因子および／またはインターロイキン-2は進行した癌を治療するために提供できる；HDLレセプターは肝臓疾患の治療に提供できる；チミジンキナーゼは卵巣癌、脳腫瘍またはHIV感染の治療に提供できる；HLA-B7は悪性黒色腫の治療に提供できる；インターロイキン-2は神経芽腫、悪性黒色腫、または腎臓癌の治療に提供できる；インターロイキン-4は癌の治療に提供できる；HIV envはHIV感染の治療に提供できる；アンチセンスras/p53は肺癌の治療に提供できる；第VIII因子は血友病Ｂの治療に提供できる。例えばScience 258 744-746を参照にされたい。

所望により、微小球を使用して1種以上の治療物質を投与することができる。例えばリポソームが１種より多くの治療物質以上を含むことができ、あるいは種々の治療物質を含むリポソームを同時に投与することができる。例として、黒色腫抗原に結合できるモノクローナル抗体および少なくともIL-2の一部をコードするオリゴヌクレオチドを同時に投与することができる。本明細書にて使用する“少なくとも一部”という句は、表される遺伝子の一部が遺伝子発現を効果的に遮断するかぎり、すべての遺伝子がオリゴヌクレオチドにより表される必要がないことを意味する。

同様に、プロドラッグを微小球中にカプセル化することができ、プロドラッグは本明細書にて使用する治療物質という用語の範囲に含まれる。プロドラッグは当該技術分野でよく知られており、不活性な薬物前駆体であり、酸素または他の存在下で高温、代謝酵素、キャビテーションおよび／または圧力にさらされると、あるいはリポソームから放出されると活性な薬物を形成するものを含む。そのようなプロドラッグは、キャビテーション、加熱、圧力および／またはリポソームからの放出の結果、プロドラッグ含有リポソームに超音波を適用すると、本発明の方法で活性化されることができる。適当なプロドラッグは当業者には明らかであり、そして例えばSinkulaら、J.Pharm.Sci.1975 64,181-210に記載されており、その開示内容は全部、引用により本明細書に編入される。

プロドラッグは例えば活性薬物の不活性状態を含んで成り、そのプロドラッグ中にプロドラッグを不活性にし、かつ／または可溶性または他の特性を薬物に与える化学的官能基が存在する。この状態でプロドラッグは一般的に不活性であるが、周辺環境中または他の作用による加熱、キャビテーション、圧力および／または酵素により、いったん化学的官能基がプロドラッグから開裂すると、活性薬物が生成する。そのようなプロドラッグは当該技術分野においてよく記載されており、エステルから短、中または長鎖脂肪族炭化水素、有機リン酸エステル、ピロリン酸エステル、硫酸エステルのヘミエステル、アミド、アミノ酸、アゾ結合、カルバメート、ホスファミド、グルコシドウロネート、N-アセチルグルコサミンおよびβ-グリコシドのような結合を介して化学的官能基に結合する広範な種類の薬物を含んで成る。

親分子および可逆的修飾または結合を持つ薬物の例は以下の通りである；コンバラトキシンとケタール、ヒダントインとアルキルエステル、クロロフェネジンとグリシンまたはアラニンエステル、アセトアミノフェンとカフェイン複合体、アセチルサルチル酸とTHAM塩、アセチルサルチル酸とアセチルアミドフェニルエステル、ナロキソンと硫酸エステル、15-メチルプロスタグランジン$F_{2\alpha}$とメチルエステル、プロカインとポリエチレングリコール、エリスロマイシンとアルキルエステル、クリンダマイシンとアルキルエステルまたはリン酸エステル、テトラサイクリンとベタイン塩、7-アシルアミノセファロスポリンと環－置換アシルオキシベンジルエステル、ナンドロロンとフェニルプロピオネートデカノエートエステル、エストラジオールとエノールエーテルアセタール、メチルプレドニゾロンと酢酸エステル、テストステロンとn-アセチルグルコサミニドグルコシドウロネート（トリメチルシリル）エーテル、コルチゾールまたはプレドニゾロンまたはデキサメタゾン

と21-リン酸エステル。
プロドラッグは、可逆的な薬物誘導体として設計され、そして薬物の部位－特異的組織への薬物送達を増強するようなモディファイヤーとして使用されることもできる。部位－特異的組織への薬物送達に影響する可逆的な修飾または結合を有し、そして治療的効果を増大する親分子の例には、イソシアネートとハロアルキルニトロソウレア、テストステロンとプロピオン酸エステル、メトトレキセート（3-5'-ジクロロメトトレキセート）とジアルキルエステル、シトシンアラビノシドと5'-アシレート、ナイトロジェンマスタード（2-2'-ジクロロ-N-メチルジエチルアミン）、ナイトロジェンマスタードとアミノメチルテトラサイクリン、ナイトロジェンマスタードとコレステロールまたはエストラジオールまたはデヒドロエピアンドロステロンエステル、ならびにナイトロジェンマスタードとアゾベンゼンがある。
当業者は、所定の薬物を修飾するための特定の化学的官能基が選択されて、薬物の膜または微小球の内部空間のいずれかへの分配に影響を与えることができると認識するだろう。化学的官能基を薬物に連結するために選択する結合は、所望の代謝速度を有するように選択することができ、例えばガス－充填微小球から放出された後に血清エステラーゼの存在下でエステル結合の加水分解などの場合がそうである。さらに特定の化学的官能基を選択して、ガス－充填薬物を有する微小球の発明に使用する薬物の生物分布に影響を与えることができ、それには例えば卵巣アデノカルシノーマのためのN,N-ビス(2-クロロエチル)-ホスホロジアミド酸とサイクリックホスホラミドがある。
さらにガス－充填微小球中に使用されるプロドラッグは、作用効果の延長または補給を提供するために活性の作用期間のモディファイヤーとして使用される、可逆的誘導体を含むように設計できる。例えばニコチン酸はデキストランおよびカルボキシメチルデキストランエステルで、ストレプトマイシンはアルギン酸塩で、ジヒドロストレプトマイシンはパモエート塩で、シタラビン（ara-Ｃ）は5'-アダマントエートエステルで、ara-アデノシン（ara-Ａ）は5-パルミテートおよび5'-ベンゾエートエステルで、アンフォテリシンBはメチルエステルで、テストステロンは17-β-アルキルエステルで、エストラジオールはギ酸エステルで、プロスタグランジンは2-(4-イミダゾリル)エチルアミン塩で、ドーパミンはアミノ酸アミドで、クロラムフェニコールはモノ－およびビス（トリメチルシリル）エーテルで、そしてシクログアニルはパモエート塩で修飾されることができる。この状態で長期作用薬物の補給または貯蔵作用物は、ガス－充填プロドラッグ保持微小球からインビボで放出されることができる。
さらに一般的に熱に不安定な化合物は、毒性を含まないラジカル化合物を作成するために利用できる。高温で分解するアゾ結合、ペルオキシドおよびジスルフィド結合が好ましい。このプロドラッグの状態で、アゾ、ペルオキシドまたはジスルフィド結合含有化合物はキャビテーションかつ／または高エネルギー音とガス－充填微小球との相互作用により引き起こされる上昇加熱により活性化され、中に閉じ込められたこれらプロドラッグからフリーラジカルのカスケードを作成する。アゾ化合物のような広範の薬物または化学薬物はこれらのプロドラッグを構成することができ、そのような化合物の一般構造はR-N=N-R(式中、Rは炭化水素鎖である)であり、この２つの窒素原子間の二重結合は反応してインビボでフリーラジカル生成物を作成することができる。
フリーラジカル生成物を作成するために使用できるプロドラッグまたは化合物は、アゾベンゼン、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、アゾジカルボンアミド、アゾリトミン、アゾマイシン、アゾセミド、アゾスルファミド、アゾキシベンゼン、アゾトレオナム、サダンIII、スルファクリゾイジン、スルファミドクリゾイジンおよびスルファサラジンのようなアゾ含有化合物、ズルベンチン、チアミジジスルフィド、チオールチン、チラムのようなジスルフィド結合含有化合物、過酸化水素およびベンゾイルペルオキシド、2,2'-アゾビススイブチロニトリル、2,2'-アゾビス（2-アミドプロパン）ジヒドロクロライドおよび2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)のようなペルオキシド含有化合物を含む。
酸素ガスを充填したガス－充填リポソームは、キャビテーションにより大量のフリーラジ

カルを生成するにちがいない。また遷移系からの金属イオン、特にマンガン、鉄および銅は酸素から反応性酸素中間体の形成速度を上昇させることができる。微小球に金属イオンをカプセル化することにより、インビボのフリーラジカル形成を増加できる。これらの金属イオンは遊離塩として、錯体（例えばEDTA、DTPA、DOTAまたはデスフェラリオキサミンと）として、あるいは金属イオンの酸化物としてリポソームに取り込まれることができる。さらに、例えば金属イオンの誘導化錯体は脂質の主基に結合できるか、またはイオンの親油性錯体は脂質二重層の中に取り込まれることができる。熱的刺激、例えばキャビテーションにさらされた時、次にこれらの金属イオンは反応性の酸素中間体の形成速度を増すだろう。さらに、メトロニダゾールおよびミゾニダゾールのような放射性増感剤は、ガス－充填リポソーム中に取り込まれて、熱的刺激に対してフリーラジカルを生成することができる。

プロドラッグの使用例のようにアシル化化学基を、血清中の酵素作用によりインビボで容易に開裂するエステル結合を介して薬物に連結させることができる。アシル化プロドラッグは本発明のガス－充填リポソーム中に取り込まれる。ガス－充填リポソームが超音波からの音波パルスによりポンと爆発し、リポソーム中にカプセル化されたプロドラッグが血清中にさらされる。次にこのエステル基は、血清中のエステラーゼにより開裂され、これによって薬物が放出される。

同様に超音波はガス－充填リポソームを破壊することができるだけでなく、化学的開裂速度を上昇させ、そしてプロドラッグから活性薬物の放出を増大させることができる熱的効果も引き起こす。

微小球を、微小球の内側および外側の両方に薬物が対象的に、または非対象的に分布するように設計することもできる。

治療物質の特定の化学構造を選択または修飾して、所望の溶解性を達成して治療物質を微小球ガス－充填空間内部にカプセル化するか、微小球に結合させるか、または微小球中の網目にからませるかのいずれかを可能にする。表面に結合した治療物質は１つ以上のアシル鎖を有するので、微小球がキャビテーションにより泡がはじける、または加熱される、または破壊されたとき、アシル化された治療物質が表面から放出され、そして／または治療物質がアシル鎖化学基から開裂することができる。同様に他の治療物質も、構造が芳香族またはステロールである疎水性基と構成され、リポソームの表面に取り込まれることができる。

脂質に加えて微小球を形成するために使用することができる他の材料は、例えばアルブミンのようなタンパク質、ポリグルタミン酸のような合成ペプチド、ならびにガラクトースおよび他のヘキソサッカライドの直鎖および分枝オリゴマーおよびポリマー、ならびにリン酸化およびスルホン化ペントースおよびヘキソース糖および糖アルコールから誘導されたポリマーがある。アルギン酸、デキストラン、澱粉およびHATA澱粉のような炭化水素ポリマーも使用できる。ヒアルロン酸のような他の天然ポリマーも使用できる。ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリラクチド、ポリエチレンイミン（直鎖および分枝）、ポリイオンまたはポリイミノカルボキシレートも使用できる。

微小球にカプセル化される治療物質が負に荷電している場合（遺伝物質のように）、カチオン基をもつカチオン性脂質またはペルフルオロアルキル化基を、負に荷電している治療物質を結合するために利用できる。例えば、GarelliおよびVierling,Biochim.Biophys Acta,1992,1127,41-48(この内容は全部、引用により本明細書に編入される)に記載されている両親媒性のペルフルオロアルキル化ビピリジンを使用できる。

一般的に、遺伝物質のような負に荷電している治療物質を混合ミセル成分の親水性主基に結合させることができ、例えばそれには非－カチオン性脂質とカチオン性脂質、例えばDOTMAまたはステアリルアミンまたはトリメチルステアリルアミンのような置換アルキルがある。有用な混合ミセル成分には限定するものではないが、次のものがある：ラウリルトリメチルアンモニウムブロミド（ドデシル－）、セチルトリメチルアンモニウムブロミド（ヘキサデシル－）、ミチスチルトリメチルアンモニウムブロミド（テトラデシル－）、アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライド（アルキル＝C_{12}、C_{14}、C_{16}）、ベ

ンジルジメチルドデシルアンモニウムブロミド／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／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／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／クロライド、またはセチルピリジニウムブロミド／クロライド。

リポソームの生体分布およびクリアランスをモジュレートするために、所望により薬物含有リポソームの大きさを押し出し法、濾過法、超音波処理、均一化、液体の非混和性さや(sheath)中に投入された液体の芯の層流、加圧下で所定の大きさの孔を通す押し出し法ならびに同様の方法を含む様々な方法で調整することができる。このような方法ならびに他の方法は例えば米国特許第4,728,578号明細書、英国特許出願公開第2193095号明細書、米国特許第4,728,575号明細書、米国特許第4,737,323号明細書、国際特許出願公開第PCT/US85/01161号明細書、Mayerら、Biochimica et Biophysica Acta, 第858巻、161-168頁(1986)、Hopeら、Biochimica et Biophiyica Acta第812巻、55-65頁(1985)、米国特許第4、533,254号明細書、Mayhewら、Methods in Enzymology第149巻、64-77頁(1987)、Mayhewら、Biochimica et Biophisyca Acta,第755巻、169-74頁、1984、Chengら, Investigative Radiology,第22巻、47-55頁、(1987)、PCT/US89/05040、米国特許第4,162,282号明細書、米国特許第4,310,505号明細書、米国特許第4,921,706号明細書およびリポソーム技法(Liposomes Technology)、Gregoriadis,G.,編集、第Ｉ巻、第29-31、51-67および79-108頁(CRC出版社、ボカ　ラトン、フィラデルフィア州、1984)を参照にされたい。上記のそれぞれの特許、特許出願公開および特許出願は全部、引用により本明細書に編入される。

本発明の微小球の大きさは使用目的に依存する。微小球の大きさは生体分布に影響するので、様々な大きさの微小球を様々な目的に選択できる。より小さい微小球では、超音波の周波数はより大きい微小球よりも一般的に高い。

例えば、血管投与のために好適な大きさの範囲は平均外径が約30ナノメーターから約10ミクロンの間であり、好ましい平均外径は約5ミクロンである。より特別には血管投与のために好適な微小球の大きさは好ましくは平均外径が約10μm以下であり、そして好ましくは約7ミクロン以下、そしてさらに好ましくは5μm以下の平均外径である。好ましくは微小球は平均外径が約30ナノメーター以上である。

肝臓のような器官に治療用物質の送達を提供するためには、そして正常組織から腫瘍の識別を可能にするために、平均外径が約30ナノメーターから約100ナノメーターの間の、より小さい微小球が好ましい。

腎臓または肺のような組織の塞栓には、好ましくは微小球の平均外径は200ミクロン未満である。

鼻内、直腸内または局所投与のためには、微小球は好ましくは平均外径が約100ミクロン未満である。

大きな微小球（例えば大きさ１から10ミクロンの間）は、一般的に毛細管シヌソイドの内側を覆マクロファージおよびクッパー細胞のような管の内側を覆う食作用要素によりクリアーされるまで、管内空間に閉じる込められる。シヌソイドを越えた細胞を通過するためには小さい微小球、例えば約1ミクロン未満の直径（例えば大きさが約300ナノメーター未満）を使用できる。

好適な態様では、微小球は例えばマトリックスに埋め込まれるよりは、個々に投与される。

一般的に本発明の治療物質送達システムは、水または塩溶液（例えばリン酸緩衝塩溶液）のような水性懸濁液の状態で投与される。好ましくは水は滅菌状態である。また、好ましく塩溶液は等張塩溶液中であり、しかし所望により、塩溶液は低張（例えば約0.3から約0.5% NaCl）であってもよい。また溶液は所望により約pH5から約pH7.4の範囲のpHに緩衝化されてもよい。さらにデキストロースを好ましくは媒質に含むことができる。さらにガス－充填リポソームの投与に使用できる溶液は、限定するものではないが、アーモンド油、コーン油、綿実油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、鉱物油、ミリスチルアルコール、オクチルードデカノール、オリーブ油、ピーナッツ油、桃仁油、ゴマ油、大豆油およびスクワレンを含む。

使用前の保存には、本発明の微小球は水溶液中（例えばリン酸緩衝塩溶液のような）または単に水に懸濁され、そして好ましくは約2℃から約10℃の間の温度、好ましくは4℃で保存される。好ましくは水は滅菌状態である。最も好ましくは微小球は等張塩溶液中に保存され、しかし所望により、塩溶液は低張（例えば約0.3から約0.5% NaCl）であってもよい。また溶液は所望により約pH5から約pH7.4の範囲にpHに緩衝化されてもよい。保存媒質に使用する適当な緩衝液には限定するものではないが、酢酸、クエン酸、リン酸および重炭酸を含む。

抗菌剤も微小球に含み、保存中の細菌による分解を防ぐことができる。適当な抗菌剤は限定するものではないが、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、ブチルパラベン、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、クロロクレゾール、メチルパラベン、フェノール、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウムおよびソルビン酸を含む。

１つ以上の酸化防止剤をさらにガス－充填リポソームに含んで、脂質の酸化を防止することができる。適当な酸化防止剤にはトロフェロール、アスコルビン酸およびアスコルビルパルミテートを含む。

患者の部位への治療化合物の送達を制御する方法は、

（ｉ）患者に治療化合物を含んで成るガス－充填微小球を投与し、

（ii）その微小球がその部位に存在することを測定するために超音波を使用して微小球を監視し、そして

（iii）超音波を使用して微小球を破壊し、その部位に治療化合物を放出する、工程を含んで成る。

本発明のガス－充填微小球を使用して、超音波エネルギーがガスと相互作用し、微小球を破壊し、そして例えば遺伝物質のような治療物質を放出させ、そして細胞中に送達させる。音のエネルギーが組織または流体媒質中のガスと出会う時、音エネルギーの熱的およびカイネティックエネルギーへの局所的転換が大変増大する。これによって治療物質は微小球から放出され、そして驚くべきことには細胞中に送達される。いかなる特定の操作原理にも関係させられることを意味するわけではないが、細胞のこの部位で生じた熱的およびカイネティックエネルギーは、治療物質の細胞内取り込みを増大させる。

微小球の投与経路は使用目的により異なる。当業者は本発明の治療的送達システムの投与は例えば血管内、リンパ管内、非経口、皮下、筋肉内、鼻内、直腸内、腹腔内、間質内のような様々な様式で、噴霧器を介して気道に、高圧的に、経口的に、局所的に、または腫瘍内に、様々の製剤状態で行うことができると認識するだろう。１つの好適な投与経路は血管内投与である。血管使用には、治療物質送達システムは一般的に静脈に注射されるが、同様に動脈に注射することもできる。本発明のリポソームは間質内に、または任意の体腔に注射することもできる。

超音波を使用する本発明の微小球からの治療物質の送達は、超音波エネルギーの伝達のために良好な音響学的窓を有する組織に関して最もよく達成される。これは筋肉、心臓、肝臓および他のほとんどの生命維持に必要な構造のような体内のほとんどの組織の場合にあてはまる。脳では、超音波エネルギーを頭蓋に通過させるため、外科的な窓が必要かもしれない。

投与されるべき有用な投与量および投与様式は、年齢、体重および処置される動物の種類、そして意図する特定の治療的応用に依存するだろう。典型的には、投与は低レベルで開始し、そして所望の治療的効果が達成されるまで増加させる。

細胞培養への応用のようなインビトロの使用には、ガス－充填微小球を培養中の細胞に加え、そしてインキューベーションすることができる。続いて音エネルギーを、細胞および微小球を含有する培養培地に適用できる。

本発明は患者の部位に治療物質を制御して送達することに使用でき、ここでは患者は本発明の治療物質含有微小球を投与され、部位中で微小球の存在を測定するために微小球は超音波を使用して監視され、そして次に微小球は超音波を使用して破壊されて治療物質をその部位に放出する。

患者は任意の種類の動物であってよいが、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳類、そして最も好ましくはヒトである。患者とは、患者の全部、または患者の特定の領域または部分を意味する。例えば本発明の方法を使用して、治療物質送達は患者の心臓および患者の管脈構造（すなわち静脈または動脈系）に行うことができる。本発明はまた、患者の左心室に治療物質を送達するために特に有用であり、この領域はこれまで治療物質の送達が容易に到達しない場所である。治療物質は患者の肝臓、脾臓および腎臓部位、ならびに他の領域にも本発明を使用して容易に送達できる。

さらに、本発明は特に治療物質を患者の肺に送達するのに有用である。本発明のガス－充填微小球は、例えば従来の液体－充填リポソーム（これは一般的に肺の末梢に到達するよりは中心近位気道に留まる）より軽い。したがって本発明のガス－充填微小球は、気道末端および肺胞を含む肺の末梢への治療用化合物の送達を向上させる。肺への投与のためには、ガス－充填リポソームを例えば噴霧により投与できる。

脂質が内側に存在する肺を標的とするような投与において、治療物質は標的組織の内側に存在する脂質とガス－充填リポソームとの凝集に際して放出され得る。さらに、ガス－充填脂質微小球は投与後に超音波の使用無しで破裂することができる。したがって、上記のような種類の投与には薬物を放出するために超音波を適用する必要がない。

さらに、本発明のガス－充填微小球は水性媒質中で、または酸素および／または周辺空気にさらされた時に分解しうる治療物質に特に有用である。例えば不安定な治療用化合物を使用するために、微小球に窒素またはアルゴンのような不活性ガスを充填することができる。さらに、皮膚および目への投与のような通常は治療用物質が周辺の空気にさらされる患者の部位への使用のために、ガス－充填微小球に不活性ガスを充填し、そして不安定な治療用物質をカプセル化するために使用できる。

またガス－充填微小球は、パッチデリバリーシステムのような経皮的送達に特に有用である。破壊化超音波の使用は治療用物質の経皮的送達を上昇させることができる。さらに機構は、薬物送達を監視およびモジュレートするために使用できる。例えば、診断用超音波をガス－充填微小球の破裂を視覚的に監視し、そして薬物を送達するために使用でき、かつ／またはハイドロホンはガス－充填リポソームの破裂を検出し、そして薬物の送達をモジュレートするために使用できる。

超音波を使用して、ピーク微共鳴周波数での小球のエコジェニシティおよび微小球を破壊する能力は、患者に微小球を投与した後に微小球が所望の部位に存在することを測定するために監視を行い、そして超音波を使用して微小球を破壊し、その領域に治療物質を破壊することにより、患者の部位への治療物質の送達を制御することを可能にする。

本発明の微小球は好ましくは2dBよりも大きい、より好ましくは約4dBから約20dBの間の反射能を有する。これらの範囲内で、より大きい微小球により、より高濃度の微小球により、かつ／またはより高い超音波周波数を使用した時に、本発明の微小球に関して最高の反射能が表される。

好ましくは本発明の微小球は約0.5mHzから約10mHzの間のピーク共鳴周波数を有する。もちろん、本発明のガス－充填微小球のピーク共鳴周波数は外径の大きさ、そしてある程度は微小球の弾性または柔軟性に依存して変化するだろう。より大きく、かつより弾性または柔軟性がある微小球には小さく、かつ弾性または柔軟性が低い微小球よりも低い共鳴周波数を有する。

本発明の治療物質含有微小球の破壊は、患者に微小球を投与した後に、または治療を望む患者の部位にリポソームが到達した後の特定の周波数の超音波を適用することにより、驚くほど容易に行われる。特に治療用物質を含有するガス－充填微小球のピーク共鳴周波数に対応する周波数で超音波を適用したとき、リポソームは崩壊し、そしてその内容物が放出することが予期せずに判明した。

このピーク共鳴周波数は、インビボまたはインビトロのいずれかで決定できるが、好ましくはインビボで、従来の手段を使用してリポソームを超音波に暴露し、反射した共鳴周波数信号を受信し、そして受信した信号のスペクトルを分析してピークを決定することによる。そのようにして決定したピークはピーク共鳴周波数（またはこれは時折、第二調波と

も呼ばれる）に相当する。
ガス－充填微小球は、より高い強度（ワット）および期間（時間）とを組み合わせた非－ピーク共鳴周波数に暴露されたときでも崩壊するだろう。しかしこの高エネルギーは大変な加熱上昇を生じ、これは望ましくない。エネルギーの周波数をピーク共鳴周波数に合わせることにより、崩壊の効率および治療用物質の放出が改良され、相当な組織加熱は一般的には起こらず（約2℃より高い温度上昇はない周波数）、そして全体的に必要なエネルギーが低くなる。したがってピーク共鳴周波数での超音波の適用が、必須ではないが、最も好ましい。
本発明のプラクティスに使用できる任意の様々な種類の診断用超音波画像デバイス、本発明の方法に決定的ではない特定の種類のデバイスのモデルを使用できる。また超音波による高体温を適用するために設計されたデバイスも適当であり、このようなデバイスは米国特許第4,620,546号、同4,658,828号および同4,586,512号明細書に記載されており、各々の開示内容は全部、引用により本明細書に編入される。好ましくはデバイスは共鳴周波数（RF）スペクトル解析機を備えている。変換器プローブは外部に適用するか、または移植されてもよい。超音波は一般的に低強度および短時間で開始し、そしてリポソームが破壊されるまで、次第に強度、期間および／または共鳴周波数を増す。
当業者は一般的なガイダンスによりいったん本開示から準備すれば、平均外径は約1.5から約10ミクロンのガス－充填微小球について、様々な原理が容易に明らかとなるであろうが、共鳴周波数は一般的に約1から約10メガヘルツの範囲になるだろう。標的組織（例えば腫瘍）の中心に焦点ゾーンを調整することにより、ガス－充填微小球は、それらが標的組織中に蓄積されるリアルタイムで超音波下で視覚化されることができる。7.5メガヘルツの曲線アレイ変換器を例として使用して、変換器へ伝達される出力を最大に調整し、そして焦点ゾーンを標的組織内に調整すると、水中の空間的ピークの一時的平均（spatial peak temporal averagr:SPTA）力は、およそ5.31mW/cm^2の最大となるだろう。この出力でガス－充填微小球からある程度の治療用物質が放出されるが、より高出力を使用することによりより多くの放出を達成できる。
変換器をドップラーモードに切り換えることにより、cm^2あたり最高2.5ワットの、より高い出力が同じ変換器から可能になる。機械をドップラーモードで操作して、出力を標的組織内の選択した焦点ゾーンに送達し、そしてガス－充填微小球から治療物質を放出させることができる。変換器をガス－充填微小球の共鳴周波数に合うように選択することで、この治療物質の放出工程はより効率的になるだろう。
より大きい直径のガス－充填微小球（例えば平均外径が3ミクロンより大きい）には、より低い周波数の変換器が治療物質の放出にはより効果的となりうる。例えば、3.5メガヘルツのより低い周波数の変換器(20mmの曲線アレイモデル)をガス－充填微小球の共鳴周波数に対応するように選択できる。この変換器を使用することにより、cm^2あたり101.6ミリワットを焦点スポットに送達でき、そしてドップラーモードに切り換えることにより、出力(SPTA)はcm^2あたり1.02ワットに増加するだろう。
ガス-充填微小球内の薬物／プロドラッグを放出および／または活性化するために、キャビテーション現象を使用することは、キャビテーションが低い周波数でより効果的に起こるので、低い周波数エネルギーの使用でよい。高い電力（最高300ボルト）で作動する0.757メガヘルツの変換器を使用すると、ガス－充填微小球の溶液のキャビテーションは約5.2気圧の限界値で起こるだろう。
表IIは、通常使用されている装置（ピコニック社（Piconics Inc.,:ティングスボロ、マサチューセッツ州）のレシーバーパルサー1966モデル661を備えた一般的な目的のスキャナーPortasvan:ピッカー(Picker:クリーブランド、オハイオ州)の80Cシステムを含むEchoview 8L Scannerまたは：メディソニックス（Medisonics:マウンティインビュー、カリフォルニア州）のモデルD-9 Versatone Bidirectional Dopplerのような）の診断用超音波から、組織に伝達されるエネルギー範囲を表している。一般的にパルス反復に使用されるこれらのエネルギー範囲は、これらの診断およびガス－充填微小球の監視に有用であるが、本発明のガス－充填リポソームを破壊するには不十分である。

表Ⅱ

診断用装置により作成される出力および強度★

パルス反復速度(Ｈｚ)	超音波の総出力Ｐ(ｍＷ)	トランスデューサー面での平均強度I_{TD}(W/m²)
520	4.2	32
676	9.4	71
806	6.8	24
1000	14.4	51
1538	2.4	8.5

★Carsonら、Ultrasound in Med.& Biol.1978 3,341-350,から得た値、

この開示内容は引用により全部、本明細書に編入される。

治療用超音波装置で通常使用するようなより高いエネルギーの超音波は、ガス－充填微小球の活性化に好ましい。一般的に、治療用超音波機は超音波により加熱される組織の面積に応じて、最高50%から100%の使用サイクルを採用する。大量の筋肉塊（すなわち、背中、腿）および心臓のような高度に脈管化した組織の面積には、より大きい使用サイクル、例えば100%が必要になるかもしれない。

ガス-充填微小球の位置を監視するために使用できる診断用超音波では、１つまたは幾つかの音のパルスが使用され、そして機械は反射した音響信号を受信するためにパルス間で停止する。診断用超音波に使用する限られた数のパルスでは、画像化される組織に送達される効果的エネルギーは制限される。

治療用超音波では、より高いエネルギーレベルを送達するために連続的な波長の超音波が使用される。本発明の微小球を使用するには、音響エネルギーをパルスにすることができるが、連続的波長の超音波が好ましい。もしパルス化を採用するなら、音は好ましくは一時に少なくとも約8、好ましくは少なくとも約20パルスの反響列長(echo train lengths)にパルス化されるだろう。

固定周波数または変調周波数の超音波のいずれかを使用できる。固定周波数とは音波の周波数が時間経過にわたって一定であると定義される。変調周波数とは波の周波数が時間の経過にわたって変化するものであり、例えば高から低(PRICH)または低から高(CHIRP)がある。例えば、初期周波数が10MHzの音波エネルギーであるPRICHパルスは、出力を1から5ワットに増加することにより1MHzになる。焦点を定めた、周波数が変調する高エネルギーの超音波は、微小球内の局部的なガスの膨張率を増大させ、そして破裂させて治療物質の局所的送達を提供する。

使用される音の周波数は、約0.025から約100メガヘルツの間で変化してよい。約0.75から約3メガヘルツの範囲の周波数が好ましく、そして約1から約2メガヘルツの間の周波数が最も好ましい。約0.75から約1.5メガヘルツの通常使用される治療用周波数が使用できる。約3から約7.5メガヘルツの通常使用される診断用周波数も使用できる。大変小さい微小球（例えば0.5ミクロン未満の直径）には、これらの小さい微小球が音の高い周波数で音

波のエネルギーをより効率的に吸収するので、より高い音の周波数が好ましいかもしれない。大変高い周波数を使用するとき（例えば10メガヘルツより高い）、音波エネルギーは一般的に流体および組織中への浸透深度に限界がある。外部適用は皮膚または他の表面上の組織には好ましいかもしれないが、深部構造には間質性プローブまたは脈内超音波カテーテルを介して音波エネルギーを適用するのが好ましいかもしれない。
最適な態様では、本発明は新規リポソーム薬物送達システムを提供する。
当業者は、いったん本開示から準備をはじめれば、本発明能力ガス－充填治療物質含有微小球を調製するための様々な方法が、容易に明らかになるだろう。微小球を調製するための好適方法が、好適なリポソーム薬物送達システムと関連して以下に考察されている。
特に好適態様では、本発明の主題であるガス－充填リポソームを含んで成る標的指向型薬物送達システムを調製するための方法は、脂質を含んで成る水溶液をガスの存在下で、脂質のゲルから液体結晶への相転移温度未満の温度で振盪し、ガス－充填リポソームを形成し、そして治療化合物を加える工程を含んで成る。別の好適態様では、本発明の主題であるガス－充填リポソームを含んで成る標的指向型薬物送達システムを調製するための方法は、脂質および治療化合物を含んで成る水溶液を、ガスの存在下で脂質のゲルから液体結晶への相転移温度未満の温度で振盪する工程を含んで成る。他の態様では、ガス－充填リポソームを含んで成る標的指向型治療薬送達システムを調製するための方法は、脂質および治療化合物を含んで成る水溶液を、ガスの存在下で振盪し、そして生成したガス－充填リポソームを治療目的のために分離する工程を含んで成る。前述の方法で調製されたリポソームは、本明細書ではゲル状態振盪ガス封入法(gel state shaking gas installation method)で調製されたガス-充填リポソームと呼び、そして治療化合物を含んで成るか、あるいは治療物質含有ゲル状態振盪ガス封入リポソームと呼ぶ。
したがって本発明の好適方法は、ガスの存在下で脂質および治療化合物を含んで成る水溶液を振盪することを提供する。本明細書で使用する振盪とは、ガスが局所的な周辺環境から水溶液中に導入されるように、水溶液を激しく揺り動かす運動と定義する。水溶液を揺り動かし、そしてガスの導入を生じる任意の種類の運動を振盪に使用できる。この振盪は、一定時間後に泡の形成を生じることができるほどに十分な力でなければならない。好ましくは振盪は30分、そして好ましくは20分以内、さらに好ましくは10分以内という短時間に泡を形成するような十分な力である。振盪は渦巻き（ボルテックス混合によるような）、左右または上下によるものでよい。さらに種々の種類の運動を組み合わせることができる。また、振盪は脂質水溶液を保持する容器を振盪することにより、あるいは容器自体は振盪せずに容器中の水溶液を振盪することにより行ってもよい。さらに振盪は手動または機械により行うことができる。使用できる機械的振盪器は、例えばVWRサイエンティフィック（セリトス、カリフィルニア州）シェーカーテーブルのような振盪台および機械的塗料混合機ならびに他の既知の機械を含む。振盪を形成するための別の手段は、高粘度または圧力下で放出されるガスの作用を含む。また好ましくは大容量の水溶液で、全体の力の量は対応して増大するものと考えられる。激しい振盪とは少なくとも１分間に約60振盪と定義され、そしてこれが好ましい。１分間あたり少なくとも1000回転のボルテックス混合は激しい振盪の例であり、より好ましい。１分間に1800回転のボルテックス混合が最も好ましい。
振盪時のガス－充填リポソームの形成は、水溶液上部の泡の存在により検出できる。これは泡の形成時の水溶液容量の減少と関連する。好ましくは泡の最終容量は少なくとも脂質水溶液の初期容量の約２倍であり、より好ましくは泡の最終容量は水溶液の初期容量の約３倍であり、さらに一層好ましくは泡の最終容量は水溶液の初期容量の約４倍であり、そして最も好ましくはすべての脂質水溶液が泡に転換する。
必要とされる振盪時間の期間は、泡形成の検出により決定できる。例えば50mlの遠心菅中の10mlの脂質溶液は、約15-20分間ボルテックス混合するか、あるいはガス-充填リポソームの粘度が十分に濃く、回転時にもはや側壁に付かなくなるまでであることができる。この時、泡はガス-充填リポソームを含む溶液を生じ、30-35mlのレベルになる。
好適な泡のレベルを形成するために必要な脂質濃度は、使用する脂質の種類に依存し、そ

して当業者はいったん本開示から準備をすれば容易に決定することができる。例えば好適な態様では、本発明の方法によりガス－充填リポソームを形成するために使用する1,2-ジパルミトイル-ホスファチジルコリン(DPPC)は、約20mg/mlから約30mg/mlの塩溶液である。好適な態様に使用するジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)の濃度は約5mg/mlから約10mg/ml塩溶液である。

特に20mg/mlから約30mg/ml濃度のDPPCは、振盪時に全懸濁液を生じ、そして懸濁液容量のみよりも４倍大きい封入ガス容量を生じる。10mg/ml濃度のDSPCは振盪時に、いかなる液体懸濁液容量も完全に含まない全容量を生じ、そして全部が泡であるものを含む。

当業者は本開示から準備すれば、脂質またはリポソームを事前に処理し、そして続いて本発明の方法に供することができると理解するであろう。例えば、脂質を水和し、そして凍結乾燥し、凍結および解凍サイクルを通して化工するか、あるいは単に水和することができる。好適な態様では、ガス－充填リポソームを形成する前に脂質を水和し、そして次に凍結乾燥するか、または水和し、次に凍結および解凍サイクルを通して化工し、そして次に凍結乾燥する。最も好適な態様では、脂質を水和そして振盪し、続いて少なくとも１回、液体窒素中で凍結し、そして解凍し、次に続いて凍結乾燥する。最終的なガス－充填リポソームを形成する前にこれらの処理を行う利点は、脂質を高表面積を有する固体に変換することを含むので、水和時のよりよい溶解性、そして続いてガス－充填リポソームの高収量が可能になる点である。

本発明の好適態様の方法により、局所周辺大気によりガスの存在が提供される。局所周辺大気は密閉容器、または非密閉容器中の大気であってよく、外部環境であってよい。あるいは例えば空気以外のガスを提供するためには、脂質水溶液を含む容器中に、または脂質水溶液自体に注入あるいは他の方法で加えられる。空気よりも軽いガスは密閉容器中に加えることができるが、空気よりも重いガスは密閉または非密閉容器に加えることができる。

上記の本発明の好適な方法は好ましくは、使用する脂質のゲル状態から液体結晶状態への相転移温度未満の温度で行われる。“ゲル状態から液体結晶状態への相転移温度”とは、その温度で脂質二重層がゲル状態から液体結晶状態に転換する温度を意味する。例えば、Chapmanら、J.Biol.Chem. 1974 249,2512-2521を参照にされたい。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、当業者には直ぐに明らかとなり、例えばGregoriadis編集、リポソーム技術（Liposome Technology、第Ｉ巻、1-18(CRC出版、1984)およびDerek Marsh、CRC脂質二重層ハンドブック(CRC Handbook of Lipid Bilayers)(CRC出版、ボカ　ラトン、フィラデルフィア州、1990）、第139頁に開示されている。また上記の表Ｉも参照にされたい。使用する脂質のゲル状態から液体結晶状態への相転移温度が室温よりも高い場合は、例えば脂質溶液を保持している容器を冷却する機構を提供することにより容器中の温度を調節できる。

従来の水性－充填リポソームは、より柔軟であり、したがって液体結晶状態で生物系に有用であるので、脂質のゲルから液体結晶相転移温度よりも高い温度で日常的に形成される。例えば、SzokaおよびPapahadojopoulos、Proc.Natl.Acad.Sci.1978 75.4194-4198を参照にされたい。対照的に、本発明の好適態様により作成されたリポソームはガス－充填され、ガスはより圧縮でき、そして水溶液よりも扱い易いので、これらはより大きな柔軟性を与える。したがってガス－充填リポソームは、脂質の相転移温度よりも低い温度で形成された時、ゲル相がより硬質であっても生物系に利用することができる。

ゲル状態振盪ガス封入法を使用する、治療物質含有ガス－充填リポソーム調製のための好適な装置を第９図に表す。ガス封入の方法はバッチ法または連続供給法のいずれかにより、脂質および水性溶媒の混合物を激しくかき回してガス－充填リポソームを作成する。第９図に関して、脂質供給槽50から乾燥脂質51が、導管59を通って混合槽66に連続流または断続的な塊のいずれかとして加えられる。もしバッチ法を利用するならば、混合槽66はシリンジ、試験管、ビンまたは丸底フラスコのような比較的小さい容器あるいは大きな容器を含んで成ることができる。連続供給法を利用するならば、好ましくは混合槽は大バットのような大きな容器である。

治療用化合物は、例えばガス封入工程の前に添加できる。第９図に関して治療化合物41は、導管42を通って治療物質供給槽40から混合槽66に加えられる。あるいはリポソームが治療用化合物で外側を被覆される時には、治療用化合物をガス封入工程の後に添加することができる。

脂質51および治療化合物51に加えて、塩溶液のような水性媒質53も水性媒質供給槽52から、導管61を通って槽66に添加できる。脂質51および水性媒質53は混合して脂質水溶液74を生成する。あるいは、乾燥脂質51を混合槽66中に導入する前に水和して、脂質を水溶液に導入するようにすることもできる。リポソーム作成法の好適な態様では、溶液74の初めの付加は溶液が混合槽66の容積の一部を占めるようにする。さらに連続法では、脂質水溶液74が加えられ、そして生成したガス－充填リポソームが取り出される速度は、脂質溶液74の容量が混合槽66容積の予め定めた割合を確実に越えないように調節される。

振盪は加圧ガスの高速ジェットを脂質水溶液74に直接導入することにより達成されることができる。あるいは、振盪は水溶液を手動で、または機械により機械的に振盪することにより行うこともできる。そのような機械的振盪は、混合槽66を振盪することにより、または混合槽自体は振盪せずに水溶液74を直接振盪することにより行うことができる。第９図に表すように、好適態様では、機械的振盪機75が混合槽66に連結している。振盪は第９図に示すように、一定期間の後にガス－充填リポソームを含んで成る泡73が水溶液74の上部に形成されるような十分な強度であるべきである。泡73の形成の検出は振盪期間を調節手段として使用でき、これは所定の時間を振盪するというより、振盪は予め定めた容量の泡が生成するまで続行することができる。

ゲル－充填リポソームを作成するための装置の好適態様で、使用する脂質が室温よりも低い脂質のゲルから液体結晶への相転移温度を有する場合に、脂質水溶液74を冷却する手段が提供される。第９図に表される態様では、冷却は混合槽66の回りに配置されたジャケット64により、槽の回りに環状の通路が形成されるように行われる。第９図に表すようにジャケットの入口および出口、それぞれ62および63により、冷却流63がこの環状の通路を流れるようにする。冷却流62の温度および流速を制御することにより、脂質水溶液74の温度を所望温度に維持できる。

第９図に表すように空気または他のガス（窒素またはアルゴンのような）であってよいガス55は、水溶液74と一緒に混合槽66に導入される。空気は非密閉混合槽を使用して、水溶液が連続して周辺の空気にさらされるように導入される。バッチ法では、の固定の局所周辺空気の付加が混合槽66を密閉することにより導入される。空気よりも重いガスを使用する場合、容器を密閉する必要はない。しかし空気よりも軽いガスの導入には、第９図に表すように例えば蓋65を使用して混合槽を密閉する必要がある。ガス55が空気または他のガスであろうと、混合槽66は、例えば第９図に表すように混合槽を加圧ガス供給タンク54に導管57を介して連結することにより過圧にすることができる。

振盪が完了した後、泡73を含むガス－充填リポソームは混合槽66から抽出できる。抽出は第１０図に表すように、シリンジ100の針102を泡73に導入し、そして予め定めた量の泡をバレル104にプランジャー106を引くことにより取り出して行うことができる。さらに以下に述べるように、針102の末端が泡73に位置する部位は、抽出するガス－充填リポソームの大きさを調節するために使用できる。

あるいは、抽出は第９図に表すように抽出管67を混合槽66に挿入して行うことができる。前述のように混合槽66が加圧されるならば、ガス55の圧力はガス－充填リポソーム77を混合槽66から抽出槽76に導管70を通って向かわせるために使用できる。混合槽66の過圧が解除され、抽出槽76は導管78を通って吸引ポンプのような吸引源58に連結されることができるので、その結果、第９図に表すように泡73を抽出槽76に吸い込むに十分な負の圧力が作成される。抽出槽76から、ガス－充填リポソーム77はバイアル82に導入され、これは最終的な使用者へと輸送されることができる。加圧ガス源56は、ガス－充填リポソームの噴射を促進するように抽出槽76に連結することができる。負の圧力はガス－充填リポソームの大きさの上昇を生じるので、ガス－充填リポソームを取り出すには正の圧力が好ましい。

実質的に均一な大きさのガス－充填リポソームを得るために、濾過が好ましくは行われる

。特定の好適な態様では、濾過アッセンブリーは１つ以上のフィルターを含み、そして好ましくは第１２図に表すようにフィルターは互いに密着して隣接していない。濾過前のガス－充填リポソームの大きさの範囲は、約１ミクロンから60ミクロンより大きい（第１５Ａおよび１６Ａ図）。１つのフィルターを通過した濾過後のガス－充填リポソームは、一般的に10ミクロンよりも小さいが、最大25ミクロンの大きさの粒子が残る。２つのフィルターを通過した後（10ミクロンに続いて8ミクロンのフィルター）、ほとんどすべてのリポソームが10ミクロンより小さく、そしてほとんどが5－7ミクロンである（第１５Ｂおよび１６Ｂ図）。

第９図に表すように、濾過はフィルター要素72を抽出管67の末端に直接導入することにより、予め定めた大きさより小さいガス－充填リポソームだけが混合槽66から抽出されるように行われることができる。あるいは抽出管フィルター72に加えて、ガス－充填リポソームの大きさの分別は、第９図に表すようにガス－充填リポソーム77を抽出槽76からバイアル82に向かわせる導管79に包含されるフィルター80により行うことができる。フィルター80は、第１２図に示されるような段階的フィルターアッセンブリー124を含むことができる。第１２図に示される段階的フィルターアッセンブリー124は２つの連続的フィルター116および120を含んで成り、フィルター120はフィルター116の上流に配置されている。好適な態様において、上流フィルター120は“NUCLEPORE”10μmフィルターであり、そして下流フィルター116は“NUCLEPORE”8μmフィルターである。２つの0.15mmの金属メッシュディスク115は好ましくはフィルター116のいずれかの脇に導入される。好適な態様では、フィルター116および120はTeflon（商標）O-リング118により、最低150μm離れている。

濾過に加えて、大きさの分別は大きさに対するガス－充填リポソームの浮力の依存性を利用することによっても行うことができる。ガス－充填リポソームは水よりも明らかに低い密度を有し、したがって混合槽66の上部に浮ぶだろう。最大のリポソームは最低の密度を有するので、それらは最も早く上部に浮ぶだろう。最小のリポソームは一般的に最後に上部に上がり、そして非ガス－充填脂質部分は底に沈むだろう。この現象はガス－充填リポソームを混合槽66から分別浮遊法を介して取り出すことにより、大きさを分けるために有利に使用できる。したがって混合槽66中の抽出管67の垂直の位置設定は、抽出されるガス－充填リポソームの大きさを調節することができ、より高い管でより大きなガス－充填リポソームが抽出される。さらに抽出槽66中の抽出管67の垂直の位置を周期的または連続的に調整することにより、抽出されるガス－充填リポソームの大きさを操作中に調節することができる。そのような抽出は、混合槽66中の抽出管67の垂直の位置を正しく調整できるデバイス68（これは抽出管67に付いた貫通スリーブ72と融合している貫通環71であってよい）を導入することにより容易になる。

ゲル状態振盪ガス封入法自体を、ガス－充填脂質に基づく微小球の大きさの分別を向上させるためにも利用できる。一般的に、より大きな振盪エネルギーで、生成する調節ガス－充填リポソームの大きさはより小さい。

本発明は最終的な使用者に投与する、薬物－含有ガス－充填リポソームの新規調製法も含む。いったんガス－充填リポソームが形成されると、それらは破壊を起こすような温度での加熱により滅菌することができない。したがって汚染の危険性を避けるために、滅菌原料からガス－充填リポソームを形成し、そして引き続き出来る限り少ない操作を行うことが望まれる。本発明により、例えば第１０図に表すように、脂質および水溶液を含む混合槽を振盪前に滅菌し、そして抽出管76を介して混合槽66からゲル－充填リポソーム77を滅菌シリンジ100をバット104に直接施すことにより、さらに化工または操作することなく、すなわち引き続き滅菌をすることなく行うことができる。ガス－充填リポソーム77が付加され、適当に包装されたシリンジ100を、次に最終的な使用者に施すことができる。その後、患者にガス－充填リポソームを投与するために、包装からシリンジを取り出し、そしてシリンジ針102から保護（示さず）を取り除き、そして患者の体内に針を注射するか、またはカテーテルに注入すること以外、さらに生成物を操作する必要はない。さらに、シリンジプランジャー106がバット104中に押された時に生じた圧力は、最大のガス－充填リポソームを破壊し、これにより濾過することなく大きさの分別がある程度達成される。

例えばガス－充填リポソームが濾過されることなく抽出槽76から取り出されるので、またはさらに濾過されることが望まれるので、使用時に濾過することが望まれる場合は第１０図のように、シリンジ100に独自のフィルター108が取り付けられる。これによりガス－充填リポソームが注射される時、ガス－充填リポソームはプランジャー106の作用でフィルター108を通って押し出されることにより大きさが分別される。したがってガス－充填リポソームは１段階で大きさが分別され、かつ患者に投与されることができる。

第１１図に表すように、段階的フィルターハウジング110をシリンジ112に直接取り付けることができ、これにより使用時に段階的濾過を可能とする。第１２図に示すように、フィルターハウジング110は既に述べたように、オスネジを有する下位カラー122とメスネジを有するメスカラー114の間に組み込まれた段階的フィルターアッセンブリー124を含んで成る。下位カラー122はシリンジ112に容易にはめ込むことができるLuerロックを装備し、そして上位カラー114は針102を付けている。

好適な態様では脂質水溶液はフィルターを通して押し出され、そして脂質水溶液は振盪前に加熱滅菌される。いったんガス－充填リポソームが形成されると、それらは上記のように大きさが分別される。ガス－充填リポソームの形成前のこれらの工程は、例えば非水和脂質の量を下げる利点を提供し、したがって有意により高収量のガス－充填リポソームを提供し、ならびに患者に直ぐに投与できる滅菌ガス－充填リポソームを提供する、という利点を与える。例えばバイアルまたはシリンジのような混合槽を濾過した脂質懸濁液で満たし、そして次に溶液を混合槽中で、例えばオートクレーブ処理により滅菌することができる。ガスを脂質懸濁液に入れ、滅菌槽を振盪することによりガス－充填リポソームを形成する。好ましくは滅菌槽はガス－充填リポソームが患者に接触する前にフィルターを通過するように配置されたフィルターを付けている。

脂質溶液がフィルターを通して押し出される、この好適方法の第一工程は、乾燥脂質を粉砕することにより非水和脂質の量を減少させ、そしてより大きい表面積が水和のために暴露される。好ましくはフィルターは約0.1から約5μｍ、より好ましくは約0.1から約4μｍ、さらに一層好ましくは約0.1から約2μｍ、そして最も好ましくは約1μｍの孔の大きさを有する。第１７図に表すように非水和脂質の量は、予め濾過されていない脂質懸濁液（第１７Ａ図）と比べて、脂質懸濁液が濾過された時（第１７Ｂ図）には少ない。非水和脂質は、非均一の大きさの不定形塊として現れ、そしてこれは望ましくない。

第二工程の滅菌は直ぐに患者に投与できる組成物を提供する。好ましくは、滅菌は加熱滅菌により、好ましくは少なくとも100℃の温度で溶液をオートクレーブ処理することにより、そしてより好ましくは約100℃から130℃の温度で、さらに一層好ましくは約110℃から130℃で、さらに一層好ましくは約120℃から約130℃の温度で、そして最も好ましくは約130℃でオートクレーブ処理することにより行われる。好ましくは加熱は少なくとも約１分間、好ましくは約１から約30分間、さらに一層好ましくは約10から約20分間、そして最も好ましくは約15分間行う。

滅菌が、ガス－充填リポソームの破壊を引き起こす温度の加熱滅菌以外の方法により行われる場合、滅菌をガス－充填リポソームの形成に続いて行うことができ、そしてそれが好ましい。例えばガンマ照射はガス－充填リポソーム形成の前および／または後に使用できる。

第１８図はオートクレーブ処理後のガス－充填リポソームの成功裏の形成を説明し、このオートクレーブ処理は130℃で15分間行われ、続いて10分間ボルテックス混合した。さらに押し出し、そして滅菌工程の後、振盪工程により残存する無水脂質相が極めて少ないか、または無いガス－充填リポソームを生じる。第１８Ａ図はオートクレーブ後、しかし濾過前に生成したガス－充填リポソームを表し、これは10μｍより大きいサイズの多数のガス－充填リポソームが形成されている。第１８Ｂ図は10μｍの“NUCLEPORE”フィルターを通して濾過した後のガス－充填リポソームを表し、約10μｍの均一サイズを形成している。

本発明の特定の態様は、吸引乾燥ガス封入法により調製されたガス－充填リポソームを含んで成り、そしてその中に治療物質（すなわち薬物を含む）がカプセル化されている薬物

送達システムを対象とし、本明細書においてそのようなリポソームをしばしば、薬物含有真空乾燥ガス封入リポソームと呼ぶ。さらに本発明は、実質的に内部に液体が無い薬物含有ガス－充填リポソームを含んで成る薬物送達システムを対象とする。

主題の発明のリポソームの調製法は、（ｉ）負の圧力下に薬物をカプセル化しているリポソームを置き、（ii）実質的にすべての液体をリポソームから除去するために十分な時間、負の圧力下でリポソームをインキューベーションし、そして（iii）選択したガスをリポソームに、大気圧に達するまで封入する、ことを含んで成る。本明細書では前述の工程を利用する方法を、薬物含有リポソームを調製するための吸引乾燥ガス封入法と呼ぶ。

吸引乾燥ガス封入法を使用して本発明のリポソームを調製するための装置も提供し、該装置は（ｉ）中に薬物をカプセル化しているリポソームを含む槽、（ii）リポソームの中に含まれる液体をリポソームから引き出すために負の圧力を槽に適用する手段、（iii）負の圧力化手段を槽と連結させる導管、その導管は該液体流を支配し、そして（iv）ガスを槽中のリポソームに導入する手段を含んで成る。

吸引乾燥ガス封入法により調製された主題のガス－充填リポソーム、および実質的にリポソームの内部に液体が無いガス－充填リポソームの両方を調製するために使用する吸引乾燥ガス封入法は、以下の工程を企図する。第一にこの工程では、薬物含有リポソームが負の圧力下に置かれる（すなわち、減圧または吸引条件）。次にリポソームをその負の圧力下で、実質的にすべての液体がリポソームから除去されるに十分な時間インキューベーションし、それにより実質的に乾燥したリポソームを生成する。本明細書において使用される、実質的にすべての液体を除去すること、および実質的に乾燥したリポソームという句は、リポソームには少なくとも約90％の液体が無く、好ましくは少なくとも約95％の液体が無く、最も好ましくは少なくとも約100％の液体が無い。液体は除去されるが、より高分子量の薬物はそのまま残り、リポソーム中にカプセル化されている。最後に大気圧に達するまで、選択したガスをリポソームに適用することによりリポソームにガスを導入し、これにより実質的に内部に液体が無い本発明の主題の薬物含有吸引乾燥ガス封入リポソーム、および本発明の薬物含有ガス充填リポソームが生成する。本明細書において、その中に実質的にすべての液体が無いとは、少なくとも約90％の液体が無い、好ましくは少なくとも約95％の液体が無い、最も好ましくは少なくとも約100％の液体が無いリポソームを意味する。

予期せずに、本発明の方法により調製された薬物含有リポソームは、数多くの驚くべき高度に有益な特性を有する。超音波に対して強いエコジェニシティを表し、ピーク周波数超音波の適用時（ならびに十分強く、かつ十分な期間の他の共鳴周波数で）に崩壊する本発明のリポソームは、圧力に対しても高度に安定であり、かつ／または乾燥または液体媒質中に懸濁して保存したときに、一般的に使用期限が長い。ガス－充填リポソームは例えば、安定な粒子サイズ、低毒性および扱い易い膜という利点も持つ。ガス－充填リポソームの柔軟な膜は、これらのリポソームを腫瘍のような組織に蓄積または標的するために有用でありうる。また吸引乾燥ガス導入工程中にリポソームのガスを封入する能力、および不可逆的なカップ形に潰れずに元の形を留める能力は予期しないものである。

超音波を使用した、ピーク微共鳴周波数でのリポソームのエコジェニシティおよびリポソームを破壊する能力は、患者にリポソームのを投与した後にリポソームが所望の部位に存在することを測定するために監視を行い、そして超音波を使用してリポソームを破壊し、その領域に治療物質を破壊することより、患者の部位への治療物質の送達を制御することを可能にする。本発明のリポソームは好ましくは2dBよりも大きい、より好ましくは約4dBから約20dBの間の反射能を有する。これらの範囲内で、より大きいリポソームにより、より高濃度の微小球により、かつ／またはより高い超音波周波数を使用した時に、本発明のリポソームに関して最高の反射能が表される。第１３図を見ると、これはリポソームの中に薬物がカプセル化されていない、吸引乾燥ガス封入法により調製された実質的に内部に液体が無いガス－充填リポソームのdB反射能をグラフで表したものである。好ましくは本発明のリポソームは約0.5mHzから約10mHzの間のピーク共鳴周波数を有する。もちろん、本発明のガス－充填リポソームのピーク共鳴周波数は直径の大きさ、そしてある程度は微

小球の弾性に依存して変化するだろう。より大きく、かつより弾性があるリポソームは、小さく、かつ弾性がある微小球よりも低い共鳴周波数を有する。
本発明のリポソームの安定性も実際に大変重要である。主題のリポソームは加圧化または他の方法のような周知方法で作成された他のガス－充填リポソームよりも、保存中により大きな安定性を有する傾向がある。例えば形成72時間後、従来法で調製されたガス含有リポソームは本質的にガスが無く、ガスはリポソームから拡散し、そして／またはリポソームは崩壊し、かつ／または融合して同時に反射能を失うことが多い。これとは対照的に本発明の薬物含有ガス－充填リポソームは、一般的に約3週間より長い使用期限安定性、好ましくは約4週間より長い使用期限安定性、より好ましくは約5週間より長い使用期限安定性、さらに一層好ましくは約3ケ月間より長い使用期限安定性、そしてしばしば6ケ月、12ケ月または2年以上のようなかなり長い使用期限安定性を有する。
また吸引乾燥ガス封入工程中にリポソームのガス封入能力、および従来技術で予期されるような不可逆的なカップ形に潰れずに、元の形を留める能力は予期しないものである。例えばCroweら、Archives of Biochemistry and Biophysics、第242巻、第240-247頁、(1985)；Croweら、Archives of Biochemistry and Biophysics、第220巻、第477-484頁、(1983)；フクダら、J.Am.Chem.Soc.、第102巻、第2321-2327頁(1986)；Reganら、J.Am.Chem.Soc.、第102巻、第6638-6640頁(1980)を参照にされたい。
本発明の吸引乾燥ガス封入法に供することができる薬物含有リポソームは、当業者には明らかである任意の様々な従来のリポソーム調製法を使用して調製することができる。多くの様々な方法を使用することができるが、好ましくは薬物含有リポソームは微乳化法により調製される。本発明の薬物含有リポソームを作成するために、様々な従来技術で調製されたリポソームを、次に本発明の吸引乾燥ガス封入法に使用できる。
本発明の吸引乾燥ガス封入法に使用するリポソーム調製において使用できる材料には、リポソームの構築に適すると当該技術分野で周知の任意の材料およびその組み合わせを含む。
リポソームは吸引乾燥ガス導入法前に、当業者には明らかである様々な任意の従来のリポソーム調製法を使用して調製できる。これらの技術には、凍結－解凍ならびに超音波、キレート透析、均一化、溶媒注入法、微乳化法、自然形成、溶媒蒸発法、フレンチプレッシャー細胞法(French pressure cell technique)、界面活性剤透析調節法および他の技法を含み、それぞれが所望の治療物質を中にカプセル化するか、中の網目にからませるか、または生成したリポソームに結合するように、治療物質を含有する溶液でリポソームを調製することが関与する。あるいは治療物質はpH勾配法（これは当業者は特定のpHでタンパク質化化合物であるか脱タンパク質化合物であるかのいずれかの治療物質に応用できると認識するだろう）を使用して付加することができる。例えば、Maddenら、Chemistry and Physics of Lipids,1990 53,37-46を参照にされたい（この開示は引用により全部、本明細書に編入される）。
吸引乾燥化ガス導入用に薬物含有リポソームを調製するために、そして一般的なガイダンスにより、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン リポソームを、ジパルミトイルホスファチジルコリン脂質をカプセル化される薬物を含むリン酸緩衝液中または水に懸濁し、そして脂質を約50℃に加熱し（この温度は、ジパルミトイルホスファチジルコリンがゲル状態から液体結晶状態へ転移するのに必要な温度よりわずかに高い）、薬物含有リポソームを形成することにより調製できる。
約2ミクロンのやや不均一サイズの多重膜気泡を調製するために、次にリポソーム溶液温度を約50℃に維持しながら、リポソームを手でゆっくりと混合することができる。次に温度を室温に下げ、そしてリポソームが完全になるようにする。所定のサイズのポリカーボネートフィルターを通すジパルミトイルホスファチジルコリン リポソームの押し出しは、所望によりより均一サイズのリポソーム分布を作成するために採用することができる。この手法に有用なデバイスは、押し出しを好都合にも脂質のゲル状態から液体結晶状態への相転移温度より高い温度で行うことができるような熱バレルを備えた押し出しデバイスである（Extruder Device:商標、リペックス バイオメンブラン：Lipex Biomembranes、

バンクーバー、カナダ）。
水性媒質にわずかしか溶けない油親性薬物ために、そのような薬物をリポソームを形成する前の脂質自体と混合させることができる。例えば、アンフォテリシンは乾燥脂質（例えば8:2のモル比のクロロホルム中の卵ホスファチジルコリンおよびコレステロール、そして脂質と混合）。クロロホルムは次に蒸発し（エタノールまたはエーテルのような他の有機溶媒も使用できることに注目されたい）、そして次に油親性薬物の混合物を含む乾燥脂質を水性媒質（例えば滅菌水または生理塩溶液）に再懸濁する。この工程はコルチコステロイドのような様々な油親性薬物に使用して、油親性薬物をリポソーム膜中に取り込むことができる。生成したリポソームを次に乾燥し、そして上記のような吸引ガス封入法に供することができる。
あるいは、そして再度一般的なガイダンスのように、従来の凍結－解凍法を使用してオリゴラメラまたはユニラメラのジパルミトイルホスファチジルコリンリポソームを作成することができる。凍結－解凍法の後、上記のような押し出し法をリポソームに行うことができる。
このように調製された薬物含有リポソームを、次に本発明の吸引乾燥ガス封入法に供して、薬物含有吸引乾燥ガス封入リポソームを形成することができ、そして本発明の薬物含有ガス封入リポソームは実質的にその内部に液体を欠いている。本発明の方法により、薬物含有リポソームはリポソームを負の圧力（すなわち、減圧または吸引条件）に供するに適する槽中に置かれる。負の圧力は、実質的にすべての液体がリポソームから除去されるに十分な時間リポソームに適用され、それにより実質的に乾燥したリポソームが生成する。当業者はいったん本開示から準備すれば、様々な負の圧力を使用でき、重要なパラメーターは実質的にすべての液体がリポソームから除去されることであると認識するだろう。一般的に、少なくとも約700mm Hg、そして好ましくは約700mmHgから760mm Hg（ゲイジ圧）の間の圧力を、約24時間から72時間適用することが、リポソームから実質的にすべての液体を除去するために十分である。他の適当な圧力および期間は、本明細書の開示の観点において当業者には明らかであろう。
最後に選択したガスが大気圧に到達するまでリポソームに適用され、これによって本発明の薬物含有吸引乾燥ガス封入リポソームが生成し、そして薬物含有ガス－充填リポソームはその内部に実質的に液体が無い。好ましくはガスの封入はゆっくり行い、すなわち少なくとも約4時間、最も好ましくは約4時間から8時間の間の時間にわたって行う。
様々な生物適合性ガスを使用できる。そのようなガスには空気、窒素、二酸化炭素、酸素、アルゴン、キセノン、ネオン、ヘリウムまたはそれらの任意の混合を含む。他の適当なガスは当業者には明らかであり、ガスの選択は意図するリポソームの応用によって制限されるだけである。
リポソームを生成する上記の方法は、今後、吸引乾燥ガス封入法と呼ぶ。
所望により、リポソームを負の圧力に供する前にリポソームを冷却し、そのような冷却が好ましい。好ましくはリポソームは0℃未満に冷却され、より好ましくは約-10℃から約-20℃の間、最も好ましくは-10℃に、リポソームを負の圧力に供する前に冷却される。所望の負の圧力に到達したとき、リポソームの温度を好ましくは約0℃に上昇させ、より好ましくは約10℃から約20℃の間、そして最も好ましくは10℃に上昇させ、実質的にすべての液体がリポソームから除去され、そして負の圧力が解除された時、次に温度を室温に戻すことができる。
リポソームが0℃未満の温度に冷却されるならば、吸引乾燥ガス封入法は、はじめから凍結防止剤の存在下で調製されたリポソームで行うか、あるいは本発明の吸引乾燥ガス封入法を行う前に凍結防止剤を加えたリポソームのいずれかで行うことが好ましい。そのような凍結防止剤は必須として加えられるものではないが、リポソーム膜の完全性を低温で維持するのを補助し、そして膜に最終的な安定性を加える。好適な凍結防止剤は、トレハロース、グリセロール、ポリエチレングリコール（特に分子量400のポリエチレングリコール）、ラフィノース、シュクロースおよびソルビトールであり、トレハロースが特に好ましい。

驚くべきことには、本発明のリポソームは圧力変化に対しても高度に安定であることが見いだされた。この特性により、乾燥およびガス封入後にフィイルターを通す押し出し法を行うことができ、所望により、比較的均一な、そして所定の孔サイズのリポソームを作成することができる。

本発明の別の観点では、本発明の実質的に内部に液体が無い薬物含有吸引乾燥ガス封入リポソーム、および薬物含有ガス－封入リポソーム調製のための有用な装置も提供する。特に第１４図に、リポソームを吸引乾燥するための、および乾燥リポソームにガスを封入するための好適な装置が表されている。この装置は薬物含有リポソームの19を含むための槽8を含んで成る。所望により、この装置は槽の回りにドライアイス17を含む氷浴5を含むことができる。氷浴5およびドライアイス17はリポソームを0℃未満に冷却できる。真空ポンプ1は導管15を通じて槽8に連結され、槽に連続的に負の圧力を適用する。好適な態様では、ポンプ1は少なくとも約700mmHg、そして好ましくは約700mmHgから760mmHg（ゲイジ圧）の間の負の圧力を適用できる。マノメーター6は導管15に連結し、槽8に適用された負の圧力を監視することを可能にする。

リポソームから除去された液体がポンプ1に入るのを防ぐために、一連のトラップが導管15に連結され、リポソームから引き出された液体（および液体蒸気、すべてを集合的に本明細書では液体と呼ぶ）を集めることを補助する。好適な態様では、2つのトラップが使用される。第一トラップは好ましくは、ドライアイス17とともに氷浴4中に配置されたフラスコ7を含んで成る。第二トラップは好ましくは、回りにチューブ16が螺旋状に配置されたカラム3を含んで成る。カラム3はその上部末端で導管15に連結され、そしてチューブ16の１つの末端に下部末端で連結されている。もう１つのチューブ16の末端は、導管15に連結されている。第１４図に示すように、氷浴2およびドライアイス17はカラム3およびチューブ16の囲りにある。所望により、ドライアイス17を液体窒素、液体空気または他の低温物質に交換できる。氷浴2および4はトラップでの回収のために、リポソームのから引き出される任意の液体を集め、そして任意の液体蒸気を凝集するのを補助する。本発明の好適な態様では、氷トラップ2および4は、それぞれ少なくとも-70℃の温度に維持されている。

ストップコック14は槽8の上流の導管15中に配置され、ガスボトル18から槽8およびリポソーム19に選択したガスを導入することを可能にする。

本発明の装置は薬物含有リポソーム19を槽8中に入れることに使用される。好ましい態様では、氷浴5およびドライアイス17はリポソームの温度を0℃未満、より好ましくは約-10℃から-20℃の間、そして最も好ましくは-10℃に下げるために使用される。ストップコック14および9を閉じて、真空ポンプ1のスイッチを入れる。次にストップコック10、11、12および13を注意深く開いて、真空ポンプ1により槽8に真空状態を作成する。圧力はマノメーター6により、少なくとも700mmHg、そして好ましくは約700mmHgから約760mmHgの間（ゲイジ圧）が達成されるまで調整される。本発明の好適な態様では、液体および液体蒸気が真空ポンプ1に入るのを防ぐように、氷浴4およびドライアイス17で冷却された槽7、ならびに氷浴2およびドライアイス17で冷却されたカラム3およびコイル16は別個に、または一緒に液体蒸気を凝集し、そしてリポソームからの液体をトラップする。本発明の好適な態様では、アイストラップ2および4の温度はそれぞれ少なくとも約-70℃に維持される。液体および液体蒸気が槽8のリポソーム19から除去され、そして槽3および7で凍結されるように、所望の負の圧力は、一般的に少なくとも24時間維持される。この系内の圧力はマノメーター6を使用して維持され、そして一般的に約24時間から約72時間維持され、その時間で実質的にすべての液体がリポソームから除去される。この時点で、ストップコック10はゆっくりと閉じられ、そして真空ポンプ1が切られる。槽8中の薬物含有リポソーム19にガスを封入するため、ストップコック14が次に次第に開けられ、そしてガスがゆっくりとガスボトル18から導管15を介してストップコック14を通って入れられる。好ましくはガス封入は少なくとも約4時間、最も好ましくは約4から8時間の間の時間にわたって、系が大気圧に達するまで行う。

本発明の乾燥ガス封入リポソームおよび薬物含有ガス－充填リポソームは、その内部に実

質的に液体が無く、薬物送達ビークルとして卓越した特性を有する。
本発明の方法により調製されたガス－充填リポソームは、物理的および機能的特性の両方で、多くの観点において従来のリポソームとは異なると考えられる。例えば、本発明のリポソームは実質的にその内部に液体が無い。定義では従来技術のリポソームは水性媒質の存在が特徴である。例えばDorland's Illustrated Medical Dicitionary、第946頁、第27版を参照にされたい（W.B.サンダースカンパニー:Saunders Company、フィラデルフィア、1988）。さらに驚くことには、本発明のリポソームは超音波に対して強いエコジェニシティーを表し、リポソームのピーク共鳴周波で超音波を適用すると崩壊すると考えられ、そして長い保存期間を有し、リポソームを薬物送達システムとして使用するための大きな利点を有する。
したがって、本発明は患者の部位に薬物を制御して送達する方法を意図し、その方法は（ｉ）患者に、吸引乾燥ガス封入法により調製し、そしてその中に薬物をカプセル化したリボソーム、および/または実質的に内部に液体が無いガス－充填リポソームで、その中に薬物をカプセル化したリボソームを投与し、（ii）リポソームがその部位に存在することを測定するために超音波を使用してリポソームを監視し、そして（iii）超音波を使用してリポソームを破壊し、その部位に薬物を放出させる、ことを含んで成る。
本明細書に詳細に記載した以上の、様々な本発明のリポソームの応用がある。そのようなさらなる使用には、例えば超音波用の高体温増強剤および超音波画像化用のコントラスト剤のような応用を含む。そのようなさらなる使用および他の関連する主題は、双方とも1991年6月18日に出願された出願人の特許出願である米国特許第716,793号および同717,084号明細書の特許請求の範囲に記載および請求されており、その開示内容は全部、引用により本明細書に編入される。
本発明はさらに以下の実施例に記載されている。実施例１は治療物質を含有するガス－充填微小球の調製、試験および使用を記載する実際的な例である。実施例２－１０は治療物質を含有するガス－充填微小球の調製、試験および使用を記載する予想例であり。実施例１１－２０は、薬物－含有吸引乾燥、ガス－充填リポソームの調製、試験および使用を記載する予想例であり、ガス－充填リポソームは実質的に内部にいかなる液体も含まない。実施例２１－２８は、ガスの存在下で脂質を含んで成る水溶液を振盪することにより調製したガス－充填リポソームの調製および試験を説明する実際的な例である。実施例２９－３６は、脂質懸濁液を濾過およびオートクレーブ処理し、続いて脂質溶液を振盪することにより調製したガス－充填リポソームの調製および大きさの分別を説明する実際的な例である。以下の実施例は添付の特許請求の範囲を制限することを意味するものではない。
実施例　１
以下に記載の方法は、DNAような治療薬がガス充填微小球中に封入されることができ、超音波を使用してガス充填微小球から治療薬を放出することができることを示す。下記のように、水とＤＮＡを封入しているリポソームは同一量の超音波エネルギーに暴露された後も遺伝物質を放出することはなかった。微小球内部にガスが存在すると、超音波エネルギーのより効率的な捕捉が起こり、このことが遺伝物質のような治療薬の送達に利用される。
ガス充填リポソームは次のように合成された。純粋のジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）（アバンチ ポーラー リピッド：Avanti Polar Lipids、アラバスター、アラバマ州）を標準食塩水中に懸濁し、次いでExtruder Device（リペックス バイオメンハデラン、バンクーバー、カナダ）を800p.s.i.で使用して2ミクロンのポリカーボネート フィルター（ヌクレポア、コースター、カリフォルニア州）を通して５回押出した。次いで、得られたリポソームを、1991年6月18日に出願された米国特許第716,899号明細書（引用により全部、本明細書に編入される）の記載の通り、減圧下で乾燥した。完全に乾燥した後、米国特許第716,899号明細書の記載の通り、窒素ガスで徐々に充填した。周囲圧力で平衡した後、得られたリポソームを食塩水（0.9%NaCl）中に懸濁し、激しく振盪した。次いで、得られたガス充填リポソームをCoulter Counter（ベッドフォードシャー、英国）によって粒径について試験した。機器をCoulter Counterから供給された操作説明書の

記載の較正方法を使用して較正した。ガス充填リポソーム溶液をIsoton IIで希釈し、ガラス容器中に入れ、Coulter Sampling Standの第３位置で撹拌した。
最初、100μmのアパーチュア・チューブを使用した。このアパーチュア・チューブを使用して、一回に500マイクロリットルの溶液を選択された粒径の範囲について試験した。使用した次の粒径のアパーチュア・チューブは30μmのアパーチュア・チューブであった。このチューブを使用して、微小球を約1μmまで粒度測定することができ、その中でガス充填微小球の平均直径を検出した。
一回に50マイクロリットルの溶液を試験し、微小球を選択された範囲の各粒径について計数した。データをCoulter Counter Model ZMとCoulter Counter Channelyzer 256の両方に収集した。準弾性光線散乱法（QEL）と光学顕微鏡法を使用した。予め定めた粒径をもつラテックスビーズを使用して、接眼レンズ中のグリッドを較正した。これらのグリッドは各10X、40X、100X、400X、1000Xの倍率について較正した。ガス充填微小球をガラススライド上に置き、種々の倍率で観察した。この方法によって、ガス充填リポソームだけではなく、脂質粒子も粒度計測ができた。
ガス充填リポソームをAcoustic Imaging Model 5200臨床用超音波機器（アコースフィックいイメージング テクノロジー社:Acoustic Imaging Technologies Corp.,フェニックス、アリゾナ州）と特注卓上機器の両方を使用して超音波エネルギーで走査した。卓上音響ラボは、Lecroy 9410 Digital Oscilloscope（レクロイコーポレーション本社：Lecroy Corporation Coporate Headquarters、チェスナット　リッジ、ニューヨーク州）、Panametrics Model 5052PR Pulser/Receiver（パナメトリックス社：Panametrics,Inc.,ウォルタム、マサチューセッツ州）、2.25、3.5、5.0、7.5、10.0MHzの周波数をもつPanametrics侵漬トランジューサ（パナメトリックス社、ウォルタム、マサチューセッツ州）、およびテステック社（Testech,Inc.、テキストン、ペンシルバニア州）による直列システムから構成されている。参考標準、組織模造の疑似模型、を使用して時間－ゲイン補償（TGC）を設定し、この様に平均振幅を設定する。組織模倣の疑似模型はラディエーション　メジャーメント社（Radiation Measurements,Inc.、ミドレトン、ウィスコンシン州）で制作されたものである。
表IIIに示すように、ガス充填リポソームの反射能は、試験した周波数の全範囲に亙って、これら実験で使用したパルス音響の最高エネルギーにおいて、一定である。詳しくは、4.5-8.4mVに設定した出力で、3.25mV/cm^2の音響強度（Acoustic Imaging Model AI5200臨床用超音波機器により発生させることができるパルス音響の最高パワー設定値）で60分間連続走査したが、ガス充填リポソームの反射能は一定である。

表Ⅲ

ガス充填微小球の反射能

時間（分）	平均振幅（ｄＢ反射能）
0	－３４．１
１５	－３６．０
３０	－３６．２
４５	－３６．８
６０	－３７．１

ガス充填リポソームの溶液も、Rich-Therapeutic超音波装置モデルRM-25（リッチーマー社：Rich-Mar Corp.、アイノラ、オクラホマ州）で適用される連続波超音波エネルギー処理を行った（表４）。表IVは連続波超音波を使用して生産された出力を示す。超音波の連続波エネルギーによってガス充填リポソーム内部のガスがリポソームから脱出し、それ故リポソームを破裂させることが分かる。食塩溶液中のガス充填リポソームを5ワットの出力と1MHzで完全に破壊するのに約20－30分を要した。10ワットの出力と1MHzではガス充填リポソームを完全に破壊するのに約5分を要した。ガス充填リポソームを高エネルギー超音波の適用前と後で光学顕微鏡で検討した時、暴露の後はガス充填リポソームの球形は消滅していた。

表Ⅳ

連続波超音波の出力と強度

	超音波の総出力 P（mW）	トランスデューサー面での平均強度 I_{TD}（W／m^2）
連続波	５０００	９８６７
連続波	１０００００	１９７３

次いで、一連の実験で、ガス充填微小球のDNAを送達する能力について試験した。1ccの標準食塩水中の7000bpプラスミド（pCH110：ファルマシア-LKBバイオテクノロー：Phrmacia LKB Biotechnology、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）上の2μgのDNAを乾燥DPPCの再懸濁中に添加したことを除いて、リポソームをDPPCから上記の通り調製した。次いで、ガス充填リポソームを上記の通り調製した。ガス充填リポソームの再懸濁の後、外部の非封入DNAをアフィティークロマトグラフィによって除去した。ガス充填リポソームとＤＮＡの懸濁液を蠕動型ポンプ（Econopump、バイオラッドーラボラトリーズ：Bio-Rad Laboratories、ヘリキュレス、カリフォルニア州）を使用してカラム（DNA特異的Sephadex（商標））に通した。DNA親和性基質は非封入ＤＮＡに結合し、そこに留まる。ガス充填微小球は溶出する。

乾燥ガス導入工程を省略したことを除いて、水を充填したリポソームを上記の方法の通り調製し、DNAを封入した。非封入DNAをクロマトグラフィで除去した。次いで、ガス充填リポソームを上記の通り超音波で走査した。DNA含有するガス充填リポソームは上記のようにパルス超音波に対して同様にエコジェニック（echogenic）であった。上記のように連続波超音波で走査した後は、微小球はそのエコジェニシティーを失った。

連続波超音波での処理の後、遊離DNA（即ち、ガス充填リポソームの外部にあるDNA）についてプロピオジウムヨージドダイマー検査を行い、対照DNA含有ガス充填リポソーム（即ち、連続波超音波に暴露していない）と比較した。

最初、２mlアリコートのガス充填微小球を試験管に添加した。2mlのPBS（リン酸緩衝食塩水）を添加し、試験管をパラフィルムで密封した。試験管を数回逆転させて、約5分間静置し、微小球を分離させた。底部の水層をパスツールピペットで試験管から取出した。この操作を全部で3回反復して、微小球を洗浄した。

次に、0.05μg/mlのDNAの2mlアリコートを微小球に添加し、試験管を密封し逆転させて混合した。約5分間静置した後、底部の水層をパスツールピペットで試験管から抽出した。別の2mlアリコートのPBSを添加し、この操作を反復してすべての非結合DNAを洗い出した。この操作を全部で5回反復し、水層を分析のために取って置いた。

次いで、微小球を2mlのPBSで希釈し、ガス充填微小球が視覚されなくなるまで超音波を適用した。

超音波を適用した後、放出DNAを検出するためにDMSO中2×10^{-5}Mの濃度のプロピオジウムヨージドダイマー（POPO-3ヨージド、モレキュラープローブズ社：Molecular Probe,Inc.、オージーン、オレゴン州）の14μmを各2mlの試料に添加した。対照として、14μlのプロピオジウムヨージドをPBS単独のものとPBS中の0.025μg/ml DNAに添加した。
試料の蛍光をSpex Fluorog 2 Spectrophotometerで534nmの励起周波数を使用して測定した。発光は以下の表Vに示すように558nmで記録した。各試料中の実測されたDNAの相対量は、PBS中のプロピジウムヨージドダイマーよりなる対照PBS試料に基づく外挿によって決定した。

表　V

試　　料	蛍光　（% DNA）
第１回洗浄	５８８８５（４５%）
第２回洗浄	４０３１４（１７%）
第３回洗浄	３３１９５（７%）
第４回洗浄	３００６２（８%）
第５回洗浄	３４３３６（２１%）
超音波に暴露された試料	４３０５１（２１%）
対象－ＰＢＳ単独	２８８７８
対象－ＰＢＳ＋ＤＮＡ	５０５６３

洗浄サイクルは非結合DNAを除去するのに役立った。上記の表Vに示すように、5回の洗浄サイクルの後、ガス充填微小球はまだ約21%のプラスミドDNAを含有した。
高エネルギー超音波に暴露されていないDNA含有ガス充填リポソームは内部に大量のDNAを保持し、そのことはプロピジウムヨージドダイマーからの蛍光の顕著な増加がないことによって示された。しかし、連続波超音波に暴露された後は、プロピジウムヨージドからの蛍光は顕著に増加し、このことはガス充填微小球からのDNAの高程度の放出が連続波超音波エネルギーが原因であることを示した。従って、DNAは超音波が適用されるまで微小球に保持されていた。超音波を適用されると、封入DNAは放出された。
実施例　2
DOTMAのようなカチオン性脂質をDPPCと1:3モル比で混合した。混合物をクロロフォルム中に溶解し、ロータリー濃縮器でクロロフォルムを除去した。乾燥材料に水を添加し、混合物をExtruder Device（リペックス　バイオメンブラン社、バンクーバー、カナダ、ブリティッシュコロンビア州）を使用して2μmのフィルターを通して押出した。1991年6月18日に出願された米国特許第717,084号明細書（引用により全部、本明細書中に編入される）に記載の方法に従って陽電荷の発泡性先駆物質充填リポソームを調製した。
得られた乾燥した陽電荷のガス-充填リポソームをPBS、食塩水または他の適切な緩衝液（HEPESのような）を添加して再水和した。均質混合を確保するために渦巻撹伴器を使用した。DNAを添加し、混合物を再び振盪した。DNAはカチオン性ガス充填リポソームの表面に付着されるので、非付着DNAをフィルターもしくは選択クロマトグラフィで除去することができる。カチオン性脂質が飽和する点まで実質的にすべてのDNAは結合する。あるいは

、押出し工程の前にDNAを添加することができ、上記の操作が続く。
得られたDNA被覆リポソームを乾燥し、そしてガスを封入して、DNA含有ガス-充填リポソームを作成した。得られたリポソームに連続波超音波を暴露し、その破裂を超音波の反射能と吸収度によって試験した。
DNAがガス-充填微小球の内部または外側上のいずれに封入されていても、超音波を使用して遺伝子物質を放出することができる。ガス-充填微小球の外側上へDNAが取り込まれるので、微小球内にガスを包含するスペースが増える。直径をさらに効果的に大きくすると、微小球は一般的に遺伝物質を放出するために超音波エネルギーを利用するのにさらに効果的なものになる。
DNAを結合するカチオン性脂質は、例えば超音波エネルギーがいったんリポソームの膜を破裂させると、疎水性基はDNAが細胞中に統合するのを助け、細胞膜および核室（subcellular compartment）への通過を援助するので、利点を提供すると考えられる。
上記のカチオン性脂質は、DNAの陰電荷を中性化する利点および両親媒性を有する。これらのカチオン性脂質がリポソームから放出された場合、脂質は両親媒性であり細胞膜は可溶性であるから、細胞ならびに核室への通過を促進する。
実施例　3
1:2モル比のDOTMAとDPPCを含むガス－充填リポソームを調製し、HLA（主要組織適合性抗原）遺伝子、HLA-7をコードするDNAで被覆した。DNA被覆リポソームを、軟質組織関与の転移性メラノーマを持つ患者に静脈注射する。HLA-B7 DNAが腫瘍中に蓄積するように、連続波1.0メガヘルツ超音波エネルギーを軟質組織に適用する。腫瘍細胞のいくつかはHLA-B7遺伝子によってトランスフェクトされ、その結果免疫反応がおこり、患者のＴ細胞を刺激して腫瘍を拒絶すると考えられる。
実施例　4
ras癌遺伝子に対するアンチ－センスオリゴヌクレオチドはポリエチレングリコール－ジパルミトイルホスファアチジルエタノールアミンから成るリポソーム内に封入される。これらのリポソームを転移性結腸癌をもつ患者に静脈注射する。連続波1.0メガヘルツ超音波エネルギーを転移部に適用する。
実施例　5
卵ホスファチジルコリンとDOTMA、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を使用して上記のようガス－充填微小球を調製し、ジストロフィン遺伝子を持つYAC発現ベクターを結合させた。微小球をデュシェーム筋肉ジストロフィー（またはBecker＇s MD）をもつ患者に静脈注射する。連続波1.0メガヘルツ超音波エネルギーを患者の筋肉組織に適用すると、筋肉の強度と質量が増加させることができる。
実施例　6
DPPCと1:1モル組成で脂質を持ちアルゴンガスを封入する微小球のミセル形成物内にYAC発現ベクター上のCFTR（膵嚢胞性繊維症膜内外伝導度調節因子）を封入する。微小球を膵嚢胞性繊維症の患者に静脈注射し、超音波エネルギーを感染組織（例えば、肺臓、膵臓など）に適用する。患者は肺臓中の粘液蓄積の減少を示し、他の感染器官の作用を改善することができた。
実施例　7
インターロイキン-2（IL-2）遺伝子をコードするDNAを含有するカチオン性微小球を転移性腎臓癌の患者に注射する。患者の腹部中の癌の増殖を超音波で走査する。微小球が腫瘍中に蓄積するにしたがって、腫瘍からの後方散乱および超音波エコーのスペクトル同調サインは増加する。ガス充填微小球のスペクトル超音波サインが腫瘍から消失する点まで、超音波出力、パルス持続時間およびパルス反復は増加する。ハイドロホンで検出しながら注意深く出力を調節することによって、空洞形成が調節される。この処置によって、腫瘍のいくつかはIL-2遺伝子でトランスフェクションされる。次いで、Ｔ細胞リンパ球がサイトカインに応答し、腫瘍に浸潤し破壊する。
実施例　8

腫瘍壊死因子（TNF）の遺伝子をコードするDNAを送達するカチオン性微小球を転移性腎臓癌の患者に注射する。患者の腹部中の癌の増殖を超音波で走査する。微小球が腫瘍中に蓄積するにしたがって、腫瘍からの後方散乱および超音波エコーのスペクトル同調サインは増加する。ガス充填微小球のスペクトル超音波サインが腫瘍から消失する点まで、超音波出力、パルス持続時間およびパルス反復を増加する。ハイドロホンで検出しながら注意深く出力を調節することによって、空洞形成が調節される。この処置によって、腫瘍のいくつかはTNF遺伝子でトランスフェクションされる。腫瘍はTNFを局所的に生産し始めることができ、塊状凝固性壊死が生じる。

実施例　９

ジパルミトイルホスホチジルコリンおよびDNAを結合するカチオン性脂質を含む微小球を、抗腫瘍モノクローナル抗体のアルキル誘導体と共に構築する。抗メラノーマ抗原モノクローナル抗体で被覆し、かつインターロイキン-2を含有する微小球を転移性メラノーマ患者に静脈注射する。患者を診断用超音波によって走査する。軟質組織内の腫瘍沈着物は反射性のガス－充填微小球によって強調される。これらの結節が診断用超音波で検出されたとき、超音波の出力を5ワットまで増加し、腫瘍を含有する転移性沈着物上に焦点を合わせる。出力を送達しながら、腫瘍を超音波検査的に監視する。腫瘍に位置する微小球を映す高周波数スペクトルサインのすべてが腫瘍の一定領域内で消えたとき、超音波エネルギーを腫瘍の新しい区域上に焦点を合わせると、超音波検査のスペクトルサインは微小球を示す。

実施例　１０

3種の表面結合アンチセンスDNAをもつカチオン性ガス－充填リポソームを上記の通り合成する。アンチセンスDNAはc-myc、c-myb、平滑筋成長因子および内皮細胞成長因子をコードする遺伝子を標的にする。ガス－充填リポソームを血管形成部位に動脈内投与する。5メガヘルツの連続波超音波を血管形成部位に適用する。微小球の破裂の際のアンチセンスRNAの放出によって、内皮形成（endothelialization）が改善され、血液凝塊の性向が減少する。

実施例　１１

ジパルミトイルホスホチジルコリン（1グラム）を薬物アドリアマイシンを含有する10mlのリン酸緩衝食塩水中に懸濁し、懸濁液を約50℃に加熱し、丸底フラスコ中で約30分間手動で渦巻撹拌する。熱源を取去り、懸濁液をさらに2時間渦巻撹拌し、その間室温にまで冷却して、薬物含有リポソームを生成する。

このように調製したリポソームを第１４図に示したものと同様の装置の槽中に入れ、約-10℃に冷却し、次いで高い負圧にかける。リポソームの温度を10℃に上げる。高い吸引負圧を約48時間維持する。約48時間後、窒素ガスが4時間に亙って徐々にチャンバー中に添加され、その後大気圧に戻される。得られた薬物含有の吸引乾燥ガス封入リポソーム（このガス－充填リポソームは内部に実質的に水が無い）を10ccのリン酸緩衝食塩水中に懸濁させ10分間ボルテックス処理し、その後約4℃で約3か月間貯蔵する。

実施例　１２

実施例　１１のリポソームを超音波検査的に試験するために、これらリポソームの250ml試料を300ccの非脱気リン酸緩衝食塩水中に懸濁する。Acoustic Imaging Model 5299スキャナー（アコースティック　イメージング、フェニックス、アリゾナ州）を使用し、7.5MHzのトランスデューサで種々の時間間隔でリポソームを生体外で走査し、システム試験ソフトウェアを使用してdB反射能を測定する。リポソームの試験の前に、既知の音響インピーダンスをもつ疑似模型でシステムを標準化する。リポソームの良好な反射能が示される。

実施例　１３

ジパルミトイルホスホチジルコリン（1グラム）と凍結保護剤トレハロース（1グラム）を薬物アドリアマイシン-Bを含有する10mlのリン酸緩衝食塩水中に懸濁し、懸濁液を約50℃に加熱し、丸底フラスコ中で約30分間手動で渦巻撹拌する。熱源を取去り、懸濁液をさらに2時間渦巻撹拌し、その間室温にまで冷却して、薬物含有リポソームを生成する。

このように調製したリポソームを第１１図に示した操作に実質的に従って真空乾燥しガスを封入して、薬物含有の吸引乾燥ガス封入リポソーム（ガス充填リポソームはその内部に実質的に水が無い）得た。リポソームを10ccのリン酸緩衝食塩水中に懸濁させ10分間ボルテックス処理し、その後約4℃で約数週間貯蔵する。使用の前、ガス-充填リポソームを、10μｍのポリカーボネートフィルター（ヌクレポア、コースター、プレサントン、カリフォルニア州）を通して、フィルターがハブに付いたシリンジを通した注入によって押出す。

実施例　１４

実施例１３のリポソームを超音波的に試験するために、実施例１２の操作法に実質的に従った。リポソームについて良好なdB反射能が示される。

実施例　１５

ジパルミトイルホスホチジルコリン（1グラム）を薬物シトシンアラビノシドを含有する10mlのリン酸緩衝食塩水中に懸濁し、懸濁液を約50℃に加熱し、丸底フラスコ中で約30分間手動で渦巻撹拌する。加熱バレルのジャケット付き押出器（Extruder Device（商標）、リペックス　バイオメンブラン、バンクーバー、カナダ）で、押出しの前に通常の凍結－融解処理する場合としない場合の両方で懸濁液の5回の押出しを行い、その間温度を約50℃に維持する。熱源を取去り、懸濁液をさらに約2時間渦巻撹拌し、その間懸濁液は室温まで放冷して、リポソームを生成する。

このように調製したリポソームを吸引乾燥し、ガスを封入し、実施例１１に示す操作法に実質的に従って、薬物含有の吸引乾燥ガス封入リポソーム（ガス充填リポソームはその内部に実質的に水が無い）を得る。リポソームを10mlのリン酸緩衝食塩水中の懸濁し、約4℃で数週間貯蔵する。

実施例　１６

実施例１５のリポソームを超音波検査的に試験するために、実施例１２の操作法に実質的に従った。リポソームについて良好なdB反射能が示される。

実施例　１７

本発明の薬物含有リポソームの安定性を試験するために、実施例１１のリポソーム懸濁液を第１０図に示すシリンジ中の10ミクロンのポリカーボネートフィルターに手動で通す。押出し処理の後、リポソームを実施例１２に記載のように超音波検査的に研究する。驚くべきことに、押出し後、本発明のリポソームは実質的にそのエコジェニシティを保持している。

実施例　１８

実施例１１のリポソームを3から7.5mHzの範囲のトランスデューサ周波数を使用して超音波により走査する。その結果から、高周波数の超音波では、エコジェニシティは急速に減衰し、そのことは相対的に高い共鳴振動数と高い振動数に伴う高いエネルギーを反映することが示される。

実施例　１９

癌の患者に静脈用薬物含有吸引乾燥ガス封入リポソーム（ガス充填－リポソームはその内部に実質的に水が無い）を投与する。リポソーム中に含有される薬物はアドリアマイシンである。静脈注射で投与されたとき、腫瘍を超音波検査的に走査し、自動化ソフトウェアプログラムを介して、リポソームの共鳴振動数を測定する。超音波エネルギーをリポソームのピーク共鳴振動数で腫瘍中に焦点を合わせる。超音波エネルギー量は明らかに組織の加熱を起こさせるには不十分（即ち、2度以上の温度変化はない）であるが、このエネルギーはリポソームを破裂させ、腫瘍部位にアドリアマイシンを放出するには十分である。このように行って、薬物の局所送達がリポソームを使用して超音波で達成される。

実施例　２０

重篤な局所真菌感染の患者に、薬物含有吸引乾燥ガス封入リポソーム（ガス充填リポソームはその内部に実質的に水が無い）を静脈注射し、超音波を実施例１９に記載のものと実質的に同様の方法で使用して、薬物の局所送達を達成する。リポソームが含有している薬物アンホテリシン-Bは感染部位に効果的に送達される。

実施例　２１

ガス充填リポソームを調製するために、50mgの1,2-ジパルミトイル－sn-グリセロ-3-ホスホコリン（MW:734.5、粉末、Lot No.160pc-183）（アバンチ-ポラット　リピッド、アラバスター、アリゾナ州）を秤量し、遠心分離管中で5.0mlの食塩水（0.9%NaCl）またはリン酸緩衝食塩水（0.8%塩化ナトリウム、0.02%塩化カリウム、0.115%二塩基性リン酸ナトリウムおよび0.02%一塩基性リン酸カリウム、pH7.4に調節）で水和した。ボルテックス撹拌器（サイエンティフィック　インダストリー;Scientific Industries、ボヘミア、ニューヨーク州）で6.5の機器設定値で水和懸濁液を10分間振盪した。全12ml容量の懸濁液が記録された。食塩水は5.0mlから約4mlに減少した。

この新規方法によって製造されたガス-充填リポソームを光学顕微鏡によって粒径の計測した。リポソームの最大の粒径は約50から約60μmの範囲にあり、検出された最小の粒径は約8μmであるが分かる。平均の粒径は約15から約20μmの範囲であった。

Swin-Lok Filter Holder（“NUCLEPORE”フィルトレーション プロダクツ、コースター社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）および20cc、シリンジ（ベクトン　デッキンソン社：Beccton Dickinson & Co.、ラザフォード、ニュージャージー州）使用して、ガス充填リポソームを10または12μmの“NUCLEPORE”膜を通してフィルターした。膜は10または12μmの“NUCLEPORE”膜（ヌクレポア フィルトレーション プロダクツ、コースター社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）であった。10.0μmのフィルターをSwin-Lok Filter Holder中に入れ、キャップを堅く締めた。リポソーム溶液を振盪し、18ゲージの針を介して20ccのシリンジに移した。約12mlのリポソーム溶液をシリンジ中に入れ、シリンジをSwin-Lok Filter Holder中にねじ込んだ。ガス-充填リポソーム小胞の大きいものが頂部に上がるように、シリンジとフィルターホルダーアセンブリを逆転させる。シリンジを静かに押し上げて、ガス充填リポソームをこのように濾過した。

10.0μmのフィルターを通す押出しの後のガス充填リポソームの残存率（押出し後に残るガス充填リポソーム量）は約83-92%であった。手動一押出し前、泡の容量は約12mlであり、水溶液の容量は約4mlであった。手動押出し後、泡の容量は約10-11mlであり、水溶液の容量は約4mlであった。

押し出されたガス－充填リポソームの大きさの分布を測定するために、光学顕微鏡を再度使用した。リポソームの最大の粒径は約25から約30μmであり、検出されく最小の粒径は約5μmであることが測定された。平均サイズは約8から約15μmの範囲であった。

濾過の後は、ガス充填リポソームの90%より多くが15μm以下であることが分かった。

実施例　２２

50mgの1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（MW:734.5、粉末）（アバンチ－プロット　リピッド、アラバスター、アリゾナ州）を秤量し、遠心分離管中に入れた。脂質を5.0mlの食塩溶液（0.9%NaCl）で水和した。脂質を6.5の装置設定値で10分間ボルテックス処理した。ボルテックス処理後、全溶液を液体窒素で凍結した。試料を凍結乾燥用の凍結乾燥機上に置いた。試料を凍結乾燥機中で18時間保持した。乾燥脂質を凍結乾燥機から取り出し、5mlの食塩溶液中で再水和し、6.5の設定値で10分間ボルテックス処理した。この溶液の少量をスライド上にピペットで取り出し、溶液を顕微鏡で観察した。ガス－充填リポソームの粒径を測定した。リポソームの最大の粒径は約60μmであり、検出された最小の粒径は約20μmであることが測定された。平均の粒径は約30から約40μmの範囲であった。

実施例　２３

50mgの1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（MW:734.5、粉末）（アバンチ－プロット　リピッド、アラバスター、アリゾナ州）を秤量し、遠心分離管中に入れた。約2フィートのラッチクスチューブ（内径0.25in.）を円錐遠分管の周りにコイルの様に包む。ラテックスチューブを電気テープで遠沈管に繋いだ。ラテックスチューブを恒温循環浴（VWR Scientific Model 1131）に連結した。浴の温度を60℃に設定し、水の循環をチューブをと通って循環する高速に設定した。温度計を脂質溶液中に入れ、脂質の相転移温度以上である42℃と50℃の間にあることが分かった。

脂質溶液を6.5のボルテックス撹拌機器の設定値で10分間ボルテックス処理した。脂質（相転移温度＝41℃）の発泡が極度に少ないとガス充填リポソームが十分には生成しないことが認められた。光学顕微鏡から、溶液中に大きな脂質粒子があることが分かった。この温度で生成するガス充填リポソームの数は相転移温度以下の温度で生成する数の3％未満であった。溶液を温度が室温（25℃）に平衡するまで、溶液を15分間静置した。溶液を10分の持続時間の間ボルテックス処理した。10分後、ガス充填リポソームが生成したことが認められた。

実施例　２４

50mgの1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（MW:734.5、粉末）（アバンチ－プロット　リピッド、アラバスター、アリゾナ州）を秤量し、遠心分離管中に入れた。脂質を5.0mlの0.9％食塩溶液（0.9％NaCl）を加えて水和した。脂質を6.5の装置設定値で10分間ボルテックス処理した。ボルテックス処理後、全溶液を液体窒素で凍結した。全溶液を室温（25℃）の水浴中で解凍した。冷凍と解凍を8回反復した。水和した懸濁液を6.5の装置設定値で10分間ボルテックス処理した。ガス-充填リポソームを実施例２１に記載のように検出した。

実施例　２５

各50mgのDPPCを有する2本の遠沈管を用意する。一本目には1モル％（～0.2mgのDuponol C lot No.2832）のラウリル硫酸ナトリウム、乳化剤を添加し、他の一本には10モル％（2.0mgのDuponol C lot No.2832）を加えた。5mlの0.9％NaClを両遠沈管に添加した。両チューブを液体窒素で凍結し、１６時間で凍結乾燥した。両試料を凍結乾燥機から出し、両チューブに5mlの食塩水を添加した。両チューブを位置6.5で10分間ボルテックス処理した。1モル％のラウリル硫酸ナトリウムでのガス充填リポソームの最大の粒径は約75μmであり、最小の粒径は約6μmであることが測定された。平均の粒径は約15から約40μmの範囲であった。10モル％のラウリル硫酸ナトリウムでのガス充填リポソームの最大の粒径は約90μmであり、最小の粒径は約6μmであることが測定された。平均の粒径は約15から約30μmの範囲であった。

1モル％のラウリル硫酸ナトリウムでのガス充填リポソームを含有する溶液中の泡の容量は15mlであり、水溶液の容量は約3-4mlであった。10モル％のラウリル硫酸ナトリウムでのガス充填リポソームを含有する溶液中の泡の容量は15mlであり、水溶液の容量は約3-4mlであった。

実施例　２６

この実施例によって、超音波処理を使用してガス充填リポソームを作成することができるかどうかを測定した。50mgの1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（アバンチ－プロット　リピッド、アラバスター、アリゾナ州）を秤量し、5mlの0.9％NaClで水和した。ボルテックス処理の代わりに、Heat Systems Sonicator Ultrasonic Processor XL（ヒート　システムズ社、フラミングドール、ニューヨーク州）モデルXL 2020で水溶液を超音波処理した。20KHzの周波数をもつ超音波処理機をノブ上の位置4で連続波に設定した。マイクロチップを使用して10分間超音波処理した。超音波処理の後、溶液を光学顕微鏡下で観察した。ガス充填リポソームが製造されている証拠があった。

次に、超音波処理機のマイクロチップを取り除き、超音波処理機に備えてあるエンドキャップに置換えた。他の溶液（5mlの食塩水当たり50mgの脂質）を調製し、このチップで超音波処理した。10分後、溶液を光学顕微鏡下で観察した。ここでもガス充填リポソームが製造されている証拠があった。

実施例　２７

この実施例によって、低濃度限界の脂質がガス充填リポソームの生産を停止するかどうかが決定された。10mgの1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（アバンチ－プロット　リピッド、アラバスター、アリゾナ州）を10mlの食塩溶液（0.9％重量:容量NaCl）中に添加した。脂質／食塩溶液を位置6.5で10分間ボルテックス処理した。溶液を粒径について顕微鏡下で観察した。リポソームの最大の粒径は約30から45μmの範囲であり、検出された最小の粒径は約7μmであることが測定された。平均の粒径は約30から約45μm

の範囲であった。
ガス-充填リポソームは前のものより急激に破裂したから、より脆い物のようであった。それ故、脂質の濃度はガス充填リポソームの生成と安定性の要因であるようである。
実施例　２８
未濾過のガス充填リポソームを50mlのシリンジから引き出し、図１１と図１２に示すような“NUCLEPORE”10μmフィルターと8μmフィルター（最小150μm離れている）のカスードを通過させた。あるいは、例えば、試料ををを互いに直接隣接している10μmフィルターと10μmフィルターのスタックを通過させることができる。ガス－充填リポソームを流速が毎分2.0mlとなる圧力で通過させた。引続いて濾過したガス充填リポソームをガス充填微小球の収率について測定し、未濾過のものの容量の80-90%であった。
得られたガス充填リポソームを４つの異なった方法で計測してその粒径と分布を決定した。粒径計測はParticle Sizing System Model 770 Optical Sizing Unit、ユニバーサルイメージング（Universal Imaging）によって製造された画像処理ソフトウェアに接続したZeiss Axiplan光学顕微鏡、およびCoulter Counter（コールター　エレクトロニックス社：Coulter Electronics Limited、ロートンベッズ、英国）で行った。図１５と図１６に見られるように、ガス充填リポソームの粒径は8-10μmに分布して、未濾過ガス充填リポソームと比較して均一であった。従って、濾過ガス充填リポソームはさらに均一の粒径を持っていると理解することができる。
実施例　２９
250mgのDPPC（ジパルミトイルホスホチジルコリン）と10mlの0.9%NaClを50mlのFalcon遠沈管（ベクトン－デッキンソン、リンカンパーク、ニュージャージー州）に添加し、周囲温度（約20℃）に維持した。懸濁液を窒素圧力下で1μm“NULEPORE”（コースター、プレサントン、カリフォルニア州）ポリカーボネート膜を通して押出した。得られた懸濁液の粒径をParticle Sizing Systems（サンタバーバラ、カリフォルニア州）モデル370レーザ光線散乱サイザーで測定した。平均外径において脂質粒子のすべては1μm以下であった。さらに、同量のDPPC懸濁液をMicrofluidics（商標）（マイクロフルイデックス社：Microfluidics Corporation, ニュートン、マサチューセッツ州）マイクロフラッダイザーに18,000p.s.i.で5回通過させた。濁りがうすくなった懸濁液の粒径をParticle Sizing Systems（サンタバーバラ、カリフォルニア州）Sub Micron Particle Sizerモデル370レーザ光線散乱サイザーで測定し、粒径は均一に1μm以下であった。マイクロフラッド化懸濁液の粒径は6か月まで安定であることが分かった。
実施例　３０
100mgのDSPC（ジステアロイルホスファチジルコリン）と10mlの0.9%NaClを50mlのFalcon遠沈管（ベクトン－デッキンソン、リンカンパーク、ニュージャージー州）に添加した。懸濁液を300-800p.s.i.の窒素圧力下で1μm“NULEPORE”（コースター、プレサントン、カリフォルニア州）ポリカーボネート膜を通して押出した。得られた懸濁液の粒径をParticle Sizing Systems（サンタバーバラ、カリフォルニア州）Sub Micron Particle Sizer Model 370レーザ光線散乱サイザーで測定した。粒子はすべて1μm以下の粒径であった。さらに、同量のDPPC懸濁液をMicrofluidics（商標）（マイクロフルイデックス社：Microfluidics Corporation, ニュートン、マサチューセッツ州）マイクロフラッダイザーに18,000p.s.i.で5回通過させた。得られた懸濁液は濁りがうすくなってたが、粒径をSub Micron Particle Sizer Model 370レーザ光線散乱サイザーで測定し，粒径は均一に1μm以下であることが分かった。
実施例　３１
実施例２９と実施例３０で示された夫々DPPCとDSPCの懸濁液（既に粒径が測定された）をBarnstead Model C57835オートクレーブ（バーンステッド／サーモライン：Barnstead/Thermolyne、ダバーク、アイオワ州）で10分間オートクレーブ処理した。室温（約20℃）への平衡後、無菌懸濁液をガス封入に使用した。
実施例　３２
0.9%NaCl中の25g/mlの1,2-ジパルミトイルホスホチジルコリンの溶液（既に1μmフィル

ターを通して押出し、20分間オートクレーブ処理した）の10mlをFalcon50ml遠沈管（ベクトン－デッキンソン、リンカンパークパーク、ニュージャージー州）に添加した。脂質懸濁液を室温（約20℃）に平衡させた後、液体をVWR Genie-2（120V、0.5amp、60Hz.）（サイエンティフィックインダストリーズ社、ボヘミア、ニューターク州）で10分間、またはガス－充填リポソームの全量が少なくとも元の水性脂質溶液の容量の２倍もしくは３倍になる時までボルテックス処理した。チューブの底の溶液は殆ど全体的に水性粒状脂質が無く、大量の泡含有ガス－充填リポソームが生成した。従って、前オートクレーブ処理は脂質懸濁液がガス充填リポソームを生成する能力に影響しない。オートクレーブ処理はリポソームの粒径を変化せず、脂質懸濁液がガス充填リポソームを生成する能力を減少させない。

実施例３３

0.9%NaCl中の25g/mlの1,2-ジパルミトイルホスホチジルコリンの溶液（既に1μmフィルターを通して押出し、20分間オートクレーブ処理した）の10mlをFalcon50ml遠沈管（ベクトン－デッキンソン、リンカンパークパーク、ニュージャージー州）に添加した。脂質懸濁液を室温（約20℃）に平衡させた後、チューブをVWR Scientific Orbital Shaker（VWRサイエンティフィック、セリトス、カリフォルニア州）上に直立して置き、300r.p.m.で30分間振盪した。その振盪器台上での撹拌の結果、ガス充填リポソームが生産した。

実施例　３４

0.9%NaCl中の25g/mlの1,2-ジパルミトイルホスホチジルコリンの溶液（既に1μmフィルターを通して押出し、20分間オートクレーブ処理した）の10mlをFalcon50ml遠沈管（ベクトン－デッキンソン、リンカンパークパーク、ニュージャージー州）に添加した。脂質懸濁液を室温（約20℃）に平衡した後、チューブを１ガロンの空の家庭用ペンキ容器の内部に固定し、旋回運動を使用するペンキ機械的混合機中に15分間入れた。激しく混合した後、遠沈管を取出し、ガス充填リポソームが生成したことを認めた。

実施例　３５

0.9%NaCl中の25g/mlの1,2-ジパルミトイルホスホチジルコリンの溶液（既に1μmフィルターを通して押出し、20分間オートクレーブ処理した）の10mlをFalcon50ml遠沈管（ベクトン－デッキンソン、リンカンパークパーク、ニュージャージー州）に添加した。脂質懸濁液を室温（約20℃）に平衡させた後、チューブを手で力強く振盪した。振盪を停止した時には、ガス充填リポソームが生成していた。

実施例　３６

実施例３２の記載の通りDPPCからガス充填リポソームを製造した。得られた未濾過のリポソームを50mlのシリンジ中に入れて、“NULEPORE”（コースター、プレサントン、カリフォルニア州）10μmフィルターと最小150μm離れた8μmフィルターからなるカスケードフィルターシステムを通過させた。さらに、別の試料では、10μmと8μmのスタックフィルターアセンブリ（2つのフィルターは互いに隣接している）を使用した。ガス充填リポソームが2.0ml/minの速度で濾過するような圧力でフィルターを通過させた。濾過ガス充填リポソームの容量は未濾過の容量の80-90%であった。

得られたガス充填リポソームの粒径をその粒度分布を決定するために４つの異なった方法で測定した。粒度計測はParticle Sizing System（サンタバーバラ、カリフォルニア州）Model 770 Optical Sizing Unit、画像処理ソフトウエア（ユニバーサル　イメージング、ウエストチャスター、ペンシルバニア州）に接続されたZeiss（オーバーコッヘン、独国）Axiplan光学顕微鏡、およびCoulter Counter（コールター　エレクトロニックス社、ロートンベッズ、英国）で行った。図１８に見られるように、ガス充填リポソームの粒径は8-10μmに分布して、未濾過ガス充填リポソームと比較して均一であった。

本明細書に記載された以外の様々な改変は、当業者には本明細書の前述の記載から自明のことである。この種の改変は添付の請求の範囲内にあるものとする。

【図１】

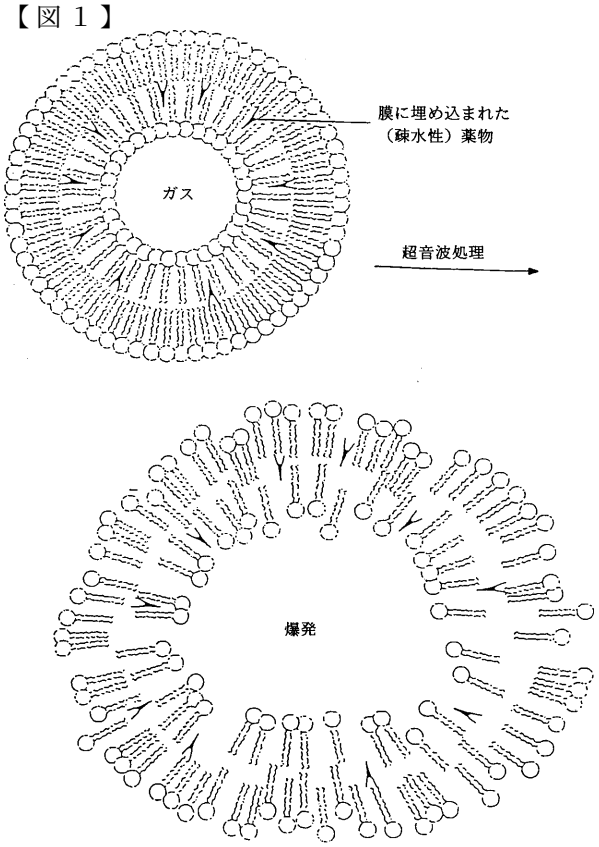


Fig. 1

【図２】

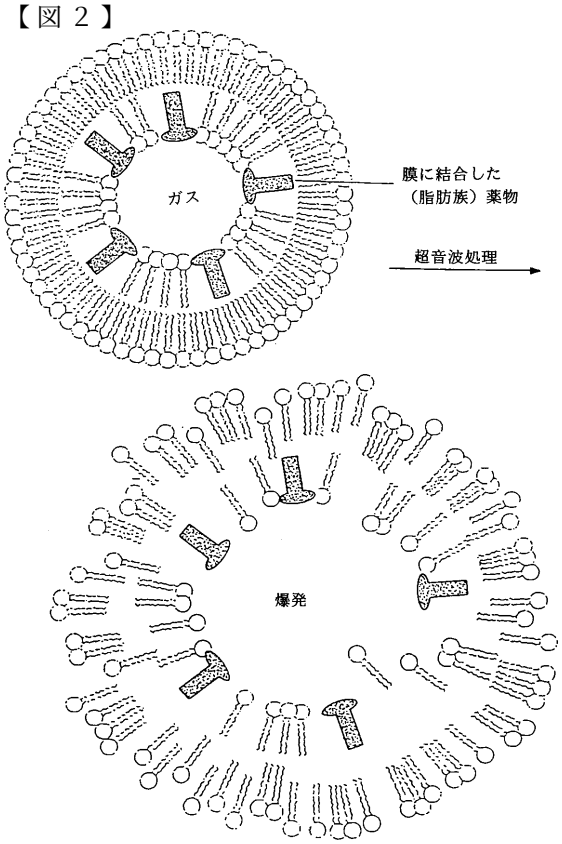


Fig. 2

【図３】

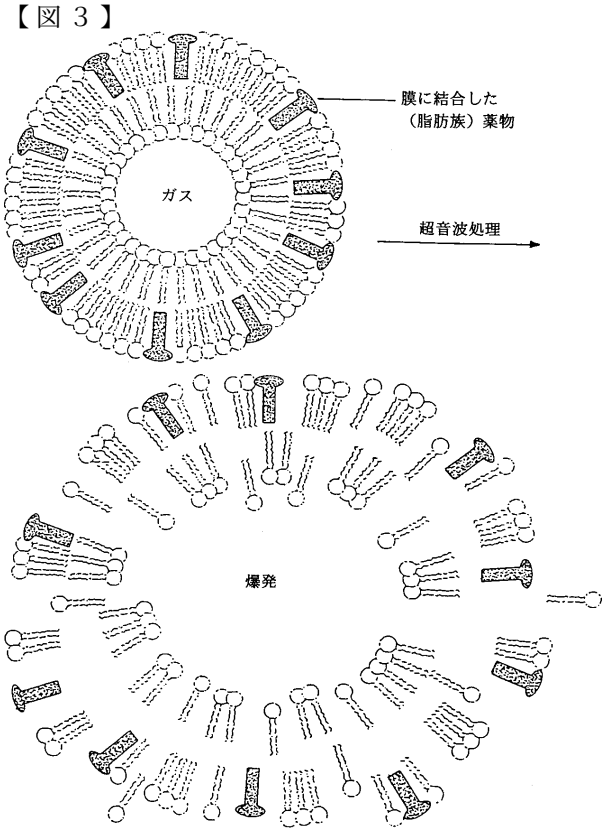


Fig. 3

【図４】

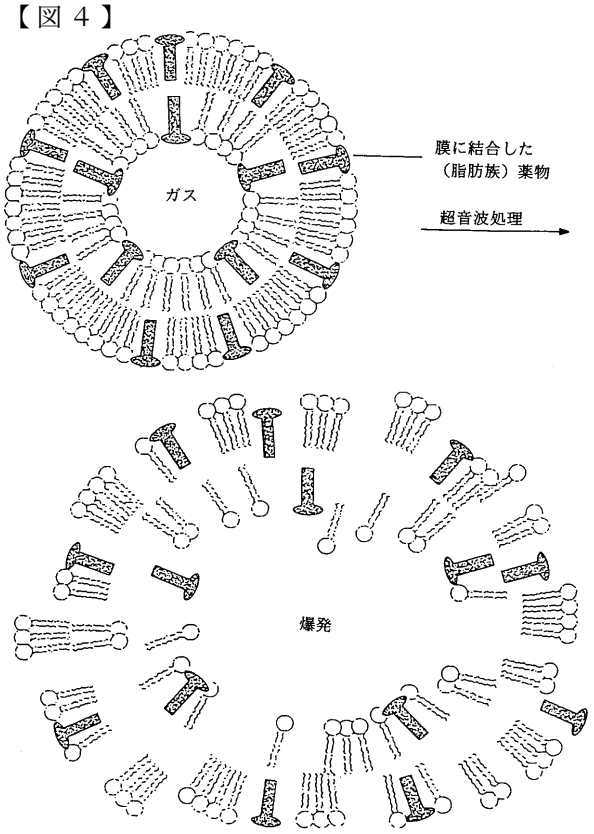


Fig. 4

【図５】

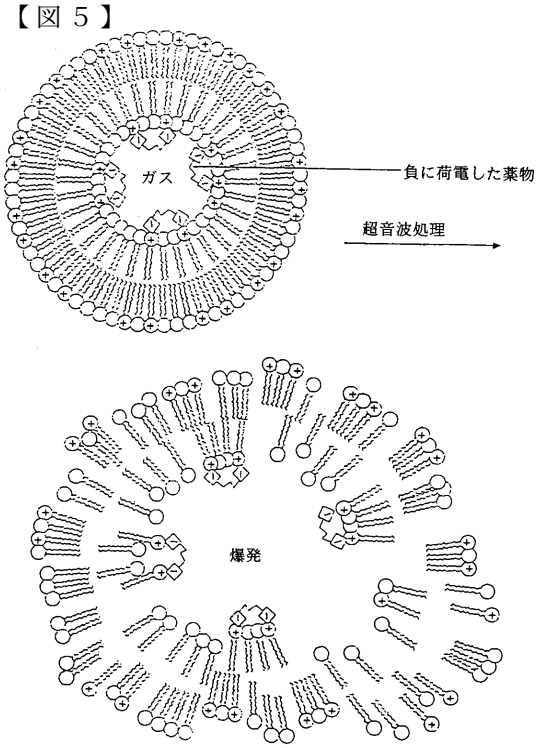


FIGURE 5

【図６】

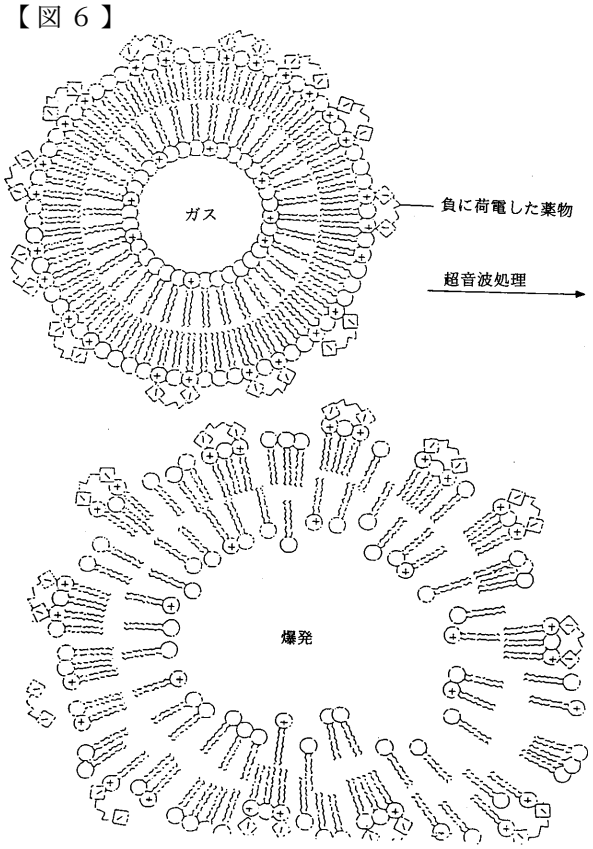


Fig. 6

【図７Ａ】

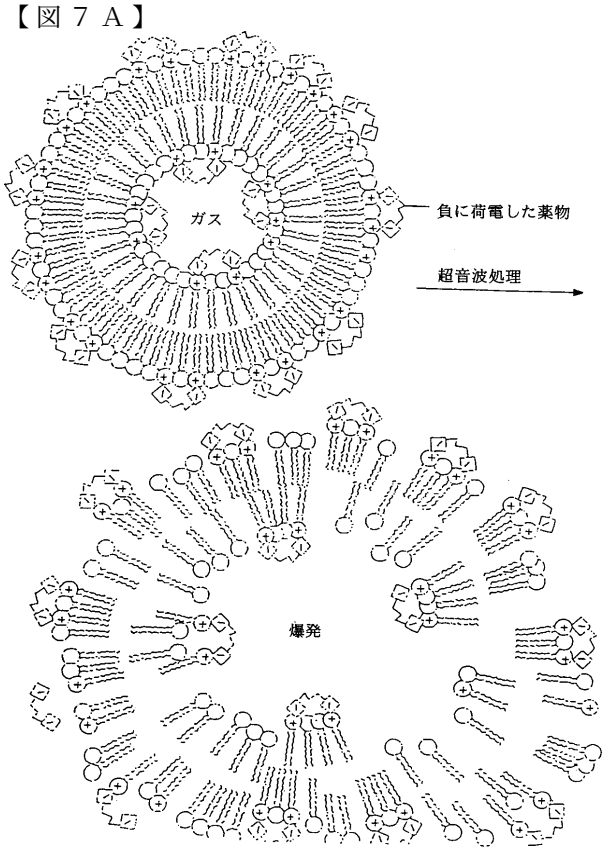


Fig. 7A

【図７Ｂ】

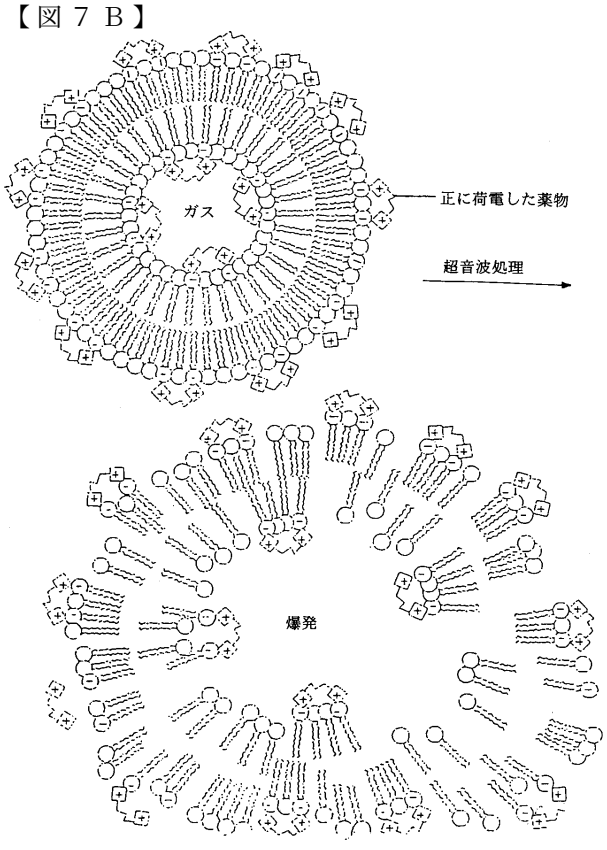


Fig. 7B

【図８】

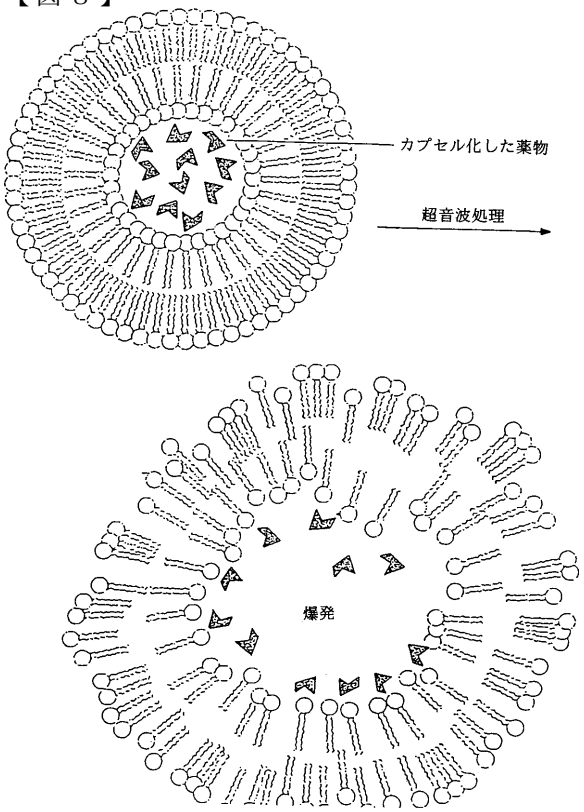


Fig. 8

【図９】

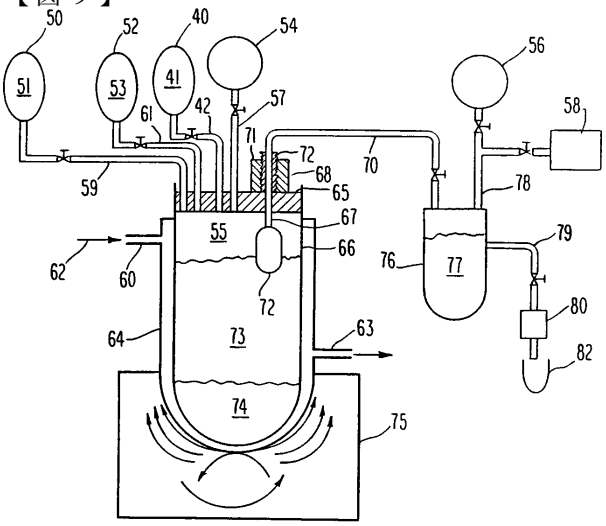


Fig. 9

【図１０】

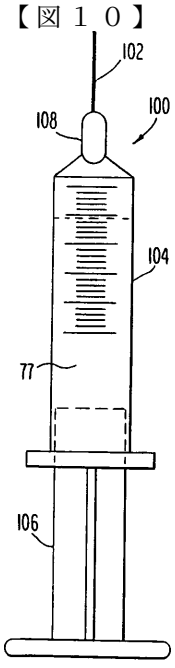


Fig. 10

【図１１】

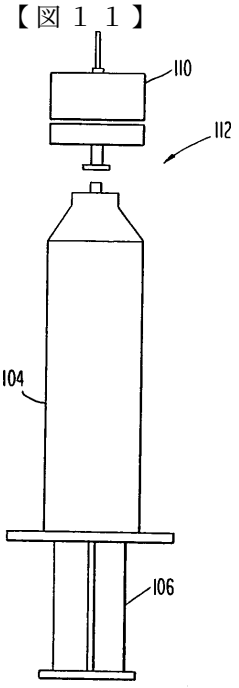


Fig. 11

【図１２】

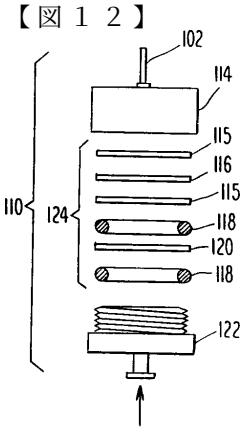


Fig. 12

【図１３】

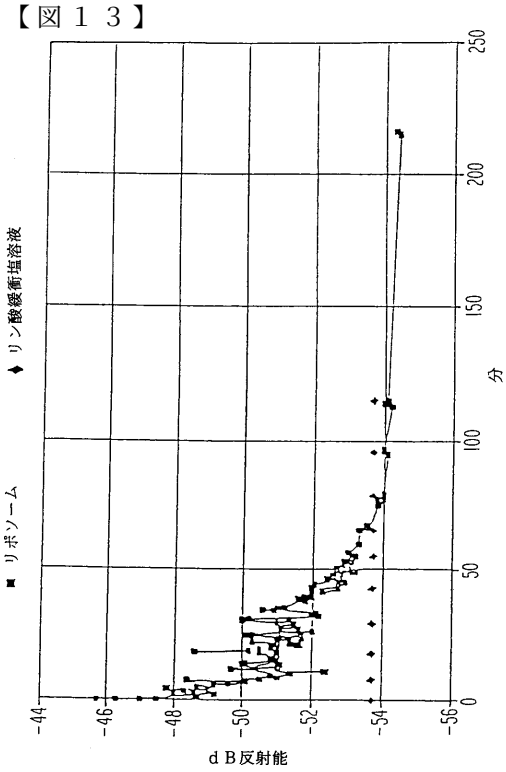


Fig. 13

【図１４】

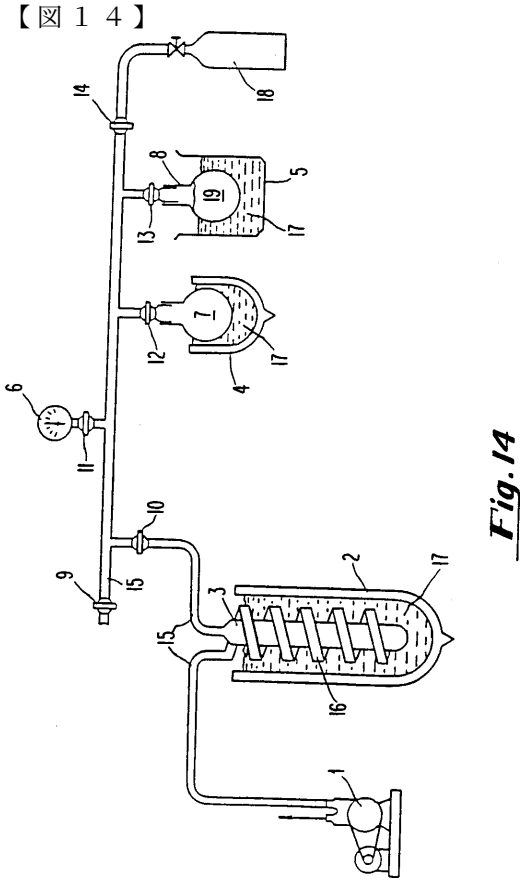


Fig. 14

【図１５Ａ】

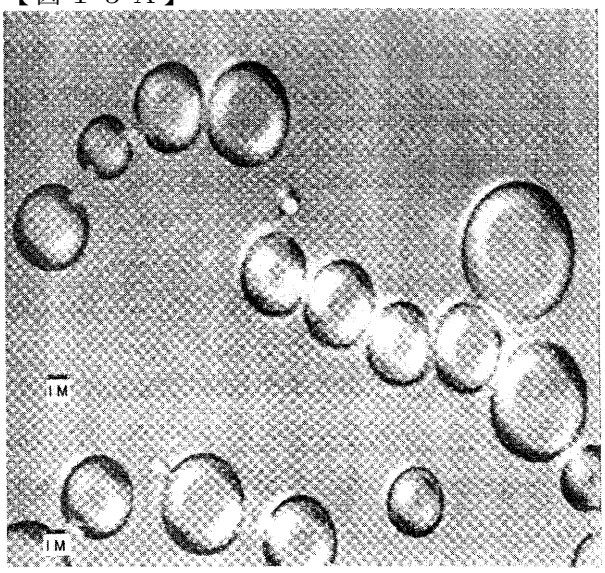


FIG. 15A

【図１５Ｂ】

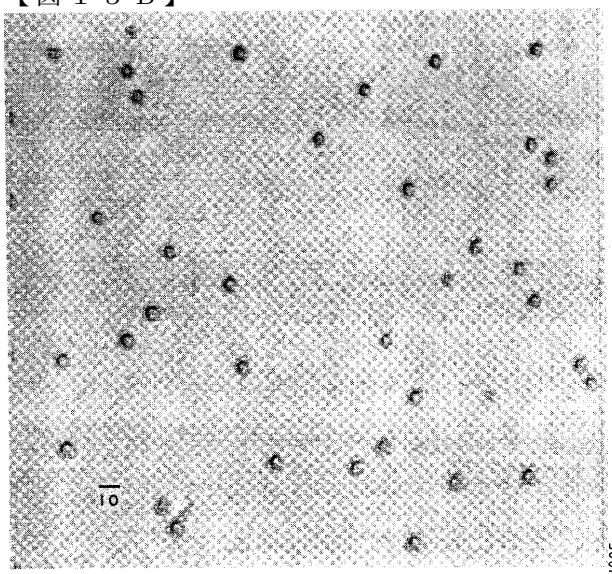


FIG. 15B

【図１６Ａ】

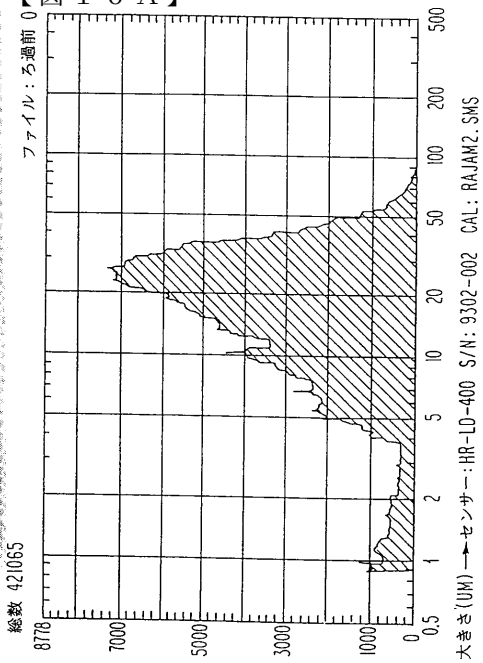


Fig. 16A

【図１６Ｂ】

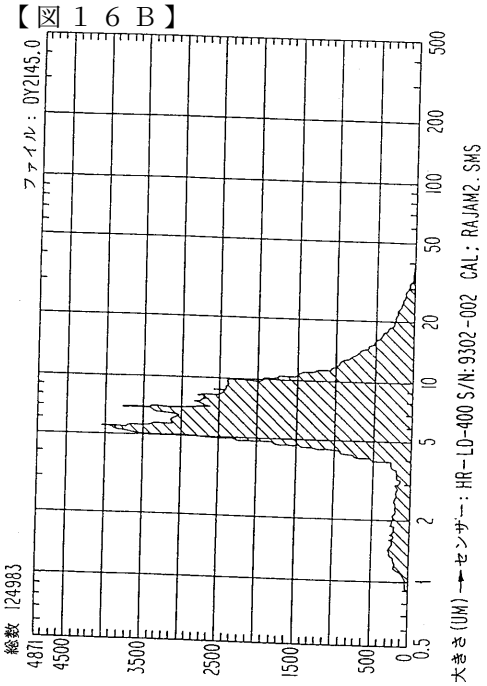


Fig. 16B

【図１７Ａ】



FIG. 17A

【図１７Ｂ】

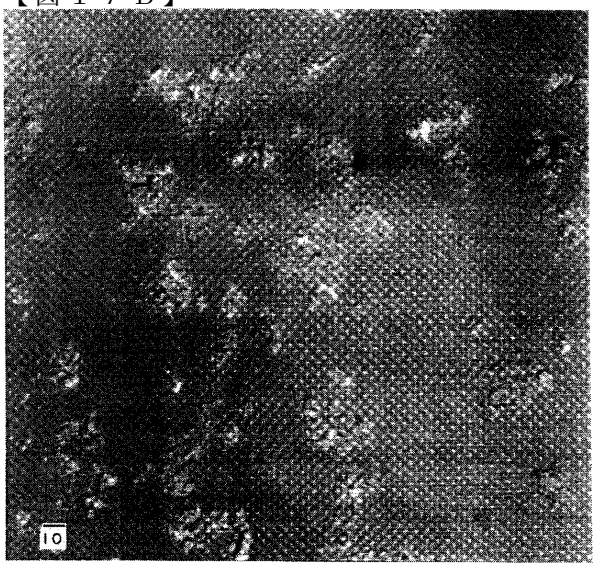


FIG. 17B

【図１８Ａ】

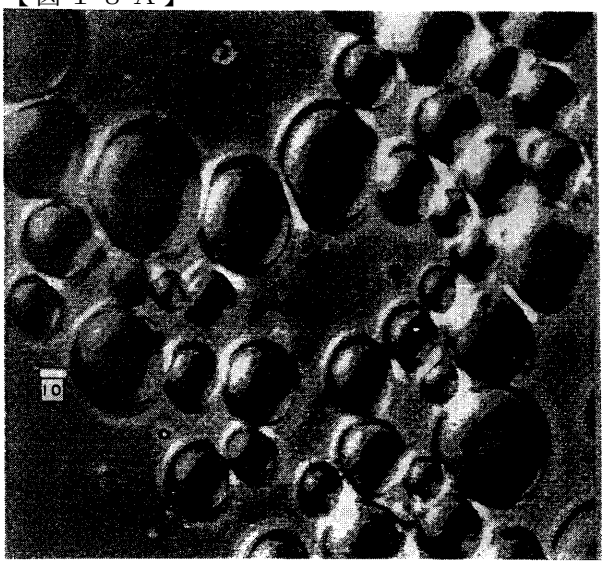


FIG. 18A

【図１８Ｂ】

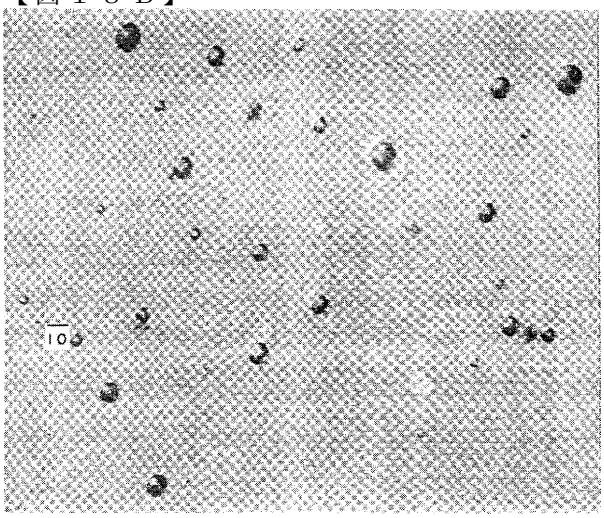


FIG. 18B

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
A61P 31/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 31/00

(72)発明者 フリツツ, トーマス・エイ
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７１１トウーソン・イーストエイトスストリート５４４２
(72)発明者 マツナガ, テリー
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
(72)発明者 ラマスワミ, バラダラジヤン
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７１９トウーソン・イーストロジヤーロードナンバーアイ－５９２０００
(72)発明者 イエロウヘア, デイビツド
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７１９トウーソン・ノースフアーストアベニユーナンバー１４ ２０４０
(72)発明者 ウ, グアンリ
アメリカ合衆国アリゾナ州８５７４５トウーソン・ウエストエイデンストリート２６０２

審査官 伊藤 幸司

(56)参考文献 国際公開第９２／０２２２９８（WO，Ａ１）
米国特許第０４９００５４０（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K