

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4139440号  
(P4139440)

(45) 発行日 平成20年8月27日(2008.8.27)

(24) 登録日 平成20年6月13日(2008.6.13)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 C
A 6 1 K 45/08 (2006.01)	A 6 1 K 45/08

請求項の数 14 (全 62 頁)

(21) 出願番号	特願平10-513669	(73) 特許権者	イマアーレクス・フアーマシユーチカル・コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成9年8月26日(1997.8.26)		アメリカ合衆国アリゾナ州85719トウーソン・イーストエイティーンズストリート1635
(65) 公表番号	特表2001-501189(P2001-501189A)	(74) 代理人	弁理士 小田島 平吉
(43) 公表日	平成13年1月30日(2001.1.30)		
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/014957	(74) 代理人	弁理士 小田嶋 平吾
(87) 国際公開番号	W01998/010798	(72) 発明者	アンガー, エバン・シー
(87) 国際公開日	平成10年3月19日(1998.3.19)		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
審査請求日	平成16年8月24日(2004.8.24)		
(31) 優先権主張番号	08/712, 173		
(32) 優先日	平成8年9月11日(1996.9.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	08/790, 550		
(32) 優先日	平成9年1月30日(1997.1.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造影剤及び血管拡張薬を用いる画像診断のための改良された方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

DPPA、DPPC及びDPPE-PEG5000よりなる群から選ばれるリン脂質ならびにペルフルオロカーボンガスを、腎血管拡張薬と組み合わせて含んでなる、患者を走査して腎臓部位の可視画像を得ることにより患者の腎臓部位の画像を与えるための組成物。

## 【請求項 2】

該リン脂質組成物が小胞組成物をさらに含んでなる請求の範囲第1項に記載の組成物。

## 【請求項 3】

該ペルフルオロカーボンガスがペルフルオロプロパンを含んでなる請求の範囲第1項に記載の組成物。

## 【請求項 4】

可視画像がコンピューター連動断層撮影画像を含んでなる請求の範囲第1項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

該小胞組成物が追加の生物活性薬をさらに含んでなる請求の範囲第2項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

腎動脈の血管拡張を誘発する血管拡張剤を、DPPA、DPPC及びDPPE-PEG5000であるリン脂質ならびにペルフルオロカーボンガスを含んでなる造影剤と組み合わせて含んでなる、患者の腎臓部位の診断画像における診断的アーチファクトを実質的に除去するための組成物。

## 【請求項 7】

診断画像がコンピューター連動断層撮影画像を含んでなる請求の範囲第 6 項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

診断画像が超音波画像を含んでなる請求の範囲第 6 項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

腎動脈の血管拡張を誘発する該血管拡張剤がアンギオテンシン転換酵素阻害剤である請求の範囲第 6 項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

該アンギオテンシン転換酵素阻害剤がフォシノプリルである請求の範囲第 9 項に記載の組成物。

10

## 【請求項 11】

DPPA、DPPC 及び DPPC-PEG5000 よりなる群から選ばれるリン脂質ならびにベルフルオロカーボンガスを、腎血管拡張薬と組み合わせて含んでなる、患者の腎臓部位における腎疾患の可視画像を得るための組成物。

## 【請求項 12】

腎疾患が腎動脈性高血圧である請求の範囲第 11 項に記載の組成物。

## 【請求項 13】

DPPA、DPPC 及び DPPC-PEG5000 よりなる群から選ばれるリン脂質ならびにベルフルオロカーボンガスを、腎血管拡張薬と組み合わせて含んでなる画像診断のための造影剤。

20

## 【請求項 14】

DPPA、DPPC 及び DPPC-PEG5000 よりなる群から選ばれるリン脂質ならびにベルフルオロカーボンガスを、腎血管拡張薬と組み合わせて含んでなる、ビデオ濃度対時間の関係を用いる、患者の腎臓部位における血流を測定するための可視画像を得るための組成物。

## 【発明の詳細な説明】

関連出願

本出願は、その開示の全体が引用することにより本明細書の内容となる 1996 年 9 月 1 日出願の同時係属出願米国出願番号第 08/712,173 号の一部継続出願である。

30

発明の分野

本発明は画像診断 (diagnostic imaging) のための改良された方法に関する。さらに特定の発明は、腎血管拡張薬及び造影剤を患者に投与することを含む画像診断のための改良された方法に関する。

発明の背景

超音波は、例えば組織微小血管系などの血管系を含む体の種々の領域の研究のための価値のある画像診断法である。超音波は他の診断法を越えるある種の利点を与える。例えば核医学及び X-線を含む診断法は一般に、結果として電離電子線 (ionizing electron radiation) への患者の暴露を招く。そのような放射線はデオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA) 及びタンパク質を含む細胞下材料への損傷を引き起こし得る。超音波はそのようなおそろく損傷を与えるような放射線を含んでいない。さらに超音波は念入りで高価な装置を必要とし得る磁気共鳴画像法 (MRI) などの他の診断法より比較的安価である。

40

超音波は、患者を音波に暴露することを含む。一般に音波は体組織による吸収のために散逸し、組織を透過するか又は組織から反射する。組織からの音波の反射は一般に後方散乱又は反射能と呼ばれ、超音波画像を発生させるための基礎を形成する。これは音波が種々の体組織から異なって反射するからである。この示差的反射 (differential reflection) は、観察されている特定の組織の成分及び濃度を含む種々の因子の故である。示差的に反射した波は次いで、通常 1 メガヘルツ (MHz) ~ 10 MHz の周波数を有する音波を検出できる変換器を用いて検出される。検出された波は積算され

50

、定量化され、研究されている組織の画像に変換される。

血管系化された組織の造影は一般に血液と組織の間の音響的性質における差の分析を含む。従って血液と回りの組織の間の音響的差を増すように働く造影剤の開発の試みが成されてきた。これは血流の測定も可能にし、それにより血流の変化を伴う疾患の検出を向上させることができる。造影剤は超音波を用いて得られる画像の質及び有用性を向上させるように働くことができる。ある種の代表的造影剤には、例えば固体粒子の懸濁液及び乳化された液滴が含まれる。

液 - 気界面からの音の反射は非常に有効である。従ってある種の気体が満たされた泡を含むある種の泡は造影剤として非常に有用であり得る。本明細書で用いられる「泡」という用語は、一般に気体又はそれへの前駆体で満たされた内腔を囲む1つ又はそれ以上の膜もしくはは壁の存在を特徴とする小胞を言う。代表的泡には、例えば単層及び/又は二重層により囲まれて例えば単ラメラ、オリゴラメラ及び/又は多重ラメラ小胞を形成している小胞、例えばリポソーム、ミセルなどが含まれる。下記においてさらに十分に議論する通り、造影剤としての泡の有効性は、例えば泡の寸法及び/又は弾性を含む種々の因子に依存する。

造影剤としての泡の有効性は例えば泡の寸法を含む種々の因子に依存する。熟練者が既知の通り、診断用超音波周波数の範囲内であり、反射され得る泡の信号は、泡の半径の関数( $r^6$ )である(Rayleigh Scatterer)。かくして約4マイクロメートル( $\mu\text{m}$ )の直径を有する泡は約2  $\mu\text{m}$ の直径を有する泡の約64倍の散乱能を有する。かくして一般に、泡が大きい程反射信号は大きい。

しかし泡の寸法は泡が通過しなければならない毛管の直径により制限される。一般に約10  $\mu\text{m}$ より大きい直径を有する泡を含む造影剤は危険であり得、それは微小血管が閉塞され得るからである。従って造影剤中の泡の約90%より多くが約10  $\mu\text{m}$ 未満の直径を有するのが好ましく、約95%より多いのがより好ましく、約98%より多いのがさらにもっと好ましい。泡の平均直径も重要であり、約1  $\mu\text{m}$ より大きくなければならず、約2  $\mu\text{m}$ より大きいのが好ましい。泡の体積加重平均直径(volume weighted mean diameter)は約7~約20  $\mu\text{m}$ でなければならない。

現在利用できる超音波造影剤及びその利用を含む方法の存在力(viability)は、造影されている特定の部位を含む多様な因子に非常に依存している。ある状況下では、診断的アーチファクトが診断画像を実質的に利用できないものとし得る。

超音波の他に、コンピューター連動断層撮影(CT)は体の種々の領域の研究のために価値のある画像診断法である。CTの場合、物質の放射線濃度(電子密度)が測定され、Hounsfield単位(HU)を用いて表される。最初のCTスキャナーの発明者にちなんで命名されたHounsfield単位は、物質によるCT X-線の相対的吸収量の指標であり、吸収量はその物質の電子密度に直列比例する。例えば水は0 HUの値を有し、空気は-1000 HUの値及び密度の高い皮質は1000 HUの値を有する。しかし体中の種々の組織の密度が類似であるために、種々の組織の相対的密度を変えるために用いることができる造影剤を開発することが必要であった。これはCTの診断効率における全体的改良を生じた。

CTのための造影剤を求める研究において、研修者は一般に体のある部位のある区域における電子密度を増加させるであろう造影剤の開発を追及してきた(ポジティブ造影剤(positive contrast agents))。例えばバリウム及びヨウ素化合物がこの目的のために開発された。胃腸管のためには硫酸バリウムがCTスキャンの際の腸の内腔の放射線濃度を向上させるために広く用いられる。胃腸管内の濃度を向上させるためにヨウ化水溶性造影剤も用いられるが、バリウム化合物ほど普通には用いられず、それは主にヨウ素調剤がバリウムより高価であり、一般に体のこの部位内で放射線濃度を向上させるのに効果が低いからである。CT造影剤としての低密度微小球の使用も報告されている。例えばUnger, 米国特許第5,205,290号を参照されたい。超音波に関する診断法と関連して上記で議論した通り、心臓部位の造影のための現在利用できるCT造影剤及びその利用を含む方法の存在力は、心臓組織自身の血管内の血液の流れに対す

10

20

30

40

50

る心室を通る血液の流れに非常に依存している。

磁気共鳴画像法 (MRI) は別の画像診断法であり、例えば軸状 (axial)、冠状、矢状 (sagittal) 又は直交状 (orthogonal) などの多様な走査面における体の断面画像を得るために用いることができる。MRI は体の画像を作るために磁場、高周波エネルギー及び磁場勾配を用いる。組織間のコントラスト又は信号密度差は主に T1 (縦) 及び T2 (横) 緩和値及びプロトン密度を反映し、それは一般に組織の自由水含有量に対応する。造影剤の使用により患者のある部位における信号密度を変えるために、いくつかの可能な方法を利用できる。例えば T1、T2 又はプロトン密度を変えるように造影剤を設計することができる。

一般に、MRI は造影剤の使用を必要とする。造影剤を用いずに MRI を行くと、得られる画像において問題の組織を回りの組織から区別するのが困難であり得る。過去においては、MRI のための常磁性造影剤に最初に注意が集中した。常磁性造影剤は不対電子を含有する材料を含む。不対電子は主磁場内で小さい磁石として作用し、縦 (T1) 及び横 (T2) 緩和の速度を増加させる。常磁性造影剤は典型的に金属イオン、例えば遷移金属イオンを含み、それは不対電子の供給源となる。しかしこれらの金属イオンは一般に非常に毒性でもある。毒性を低下させる試みにおいて、金属イオンは典型的にリガンドを用いてキレート化される。

金属酸化物、最も顕著には酸化鉄も MRI 造影剤として用いられてきた。酸化鉄の小粒子、例えば約 20 nm 未満の直径を有する粒子は所望の常磁性緩和性を有し得るが、その主な効果はバルク磁化率 (bulk susceptibility) を介してである。やはり常磁性であるニトロキシドは別の種類の MRI 造影剤である。これらは比較的低い緩和性を有し、一般に常磁性イオンより効率が低い。

現存の MRI 造影剤は複数の制限に悩まされている。例えばキレート化金属を含有する造影剤を含むある種の造影剤に画像ノイズの増加が伴い得る。このノイズは一般に固有の蠕動運動及び呼吸又は心臓血管作用からの動きから生ずる。さらに造影剤に関する信号強度は一般に造影剤の濃度ならびに用いられるパルス配列 (pulse sequence) に依存する。十分に高い濃度の常磁性化学種が用いられないと、造影剤の吸収は特に小腸の遠位部分において画像の解釈を複雑にし得る。例えば Kornmesser et al., Magnetic Resonance Imaging, 6: 124 (1988) を参照されたい。

他の造影剤はパルス配列の変動にあまり敏感でないかもしれず、より一貫したコントラストを与え得る。しかしフェライトなどの高濃度の粒子は磁化率アーチファクト (magnetic susceptibility artifacts) の原因となり得、それは特に例えば腸液の吸収が起こり、超常磁性材料が濃縮され得る結腸において明確である。

毒性は MRI のための現在利用できる造影剤に一般に伴う他の問題である。例えばフェライトは多くの場合、経口的投与の後の吐気症状ならびに鼓腸及び血清鉄における一時的上昇を引き起こす。Gd-DTPA として錯体化されるガドリニウムイオンは遊離の形態では毒性が高い。胃における高められた酸性度 (低い pH) 及び腸における高められたアルカリ度 (高い pH) を含む胃腸管の種々の環境は、錯体からの遊離のイオンのデカップリング (decoupling) 及び分離の傾向を増し得る。

血流は MRI で得られる画像の質に影響し得る。例えば核医学で生存心筋組織の視覚化を向上させる試みにおいて、冠動脈血管拡張薬がタリウム 201 ( $^{201}\text{Tl}$ ) と組み合わせられてきた。血管拡張薬は心筋層への血流を増加させることにより視覚化を向上させることができ、それは  $^{201}\text{Tl}$  がより有効に生存心筋細胞中に吸収されるようにする。

冠動脈血管拡張薬は、MRI 画像法において心筋組織造影を向上させるために Gd-DTPA と組み合わせても用いられてきた。Gd-DTPA は血流の指示薬として用いることができるが、緩和測定 (T1 及び T2) は流れの定量的測定を助けるのに必要な感度がないことがあり得る。さらに先行技術の MRI 造影剤は一般に比較的低い分子量を有しており、それは血管系を介したその拡散を許す。これは薬物動態学に基づく血管系を通る血流の定量を困難にし得る。

10

20

30

40

50

腎血管性高血圧を有する患者は通常、腎動脈狭窄症として既知の腎臓への動脈の1つの狭窄を有する。腎血管性高血圧の検出及びもっと普通の本態性高血圧との区別は重要であり、それは腎動脈性高血圧が高血圧の場合に施される標準的内科療法にตอบสนองしないからである。腎動脈性高血圧はアンギオテンシン転換酵素阻害剤又は外科手術により処置することができる。対照的に本態性高血圧は通常、利尿降圧薬、ベータもしくはアルファ遮断薬、アフターロード降圧薬 (afterload reducers)、プレロード降圧薬 (pre-load reducers) 及び時々は節遮断薬 (ganglionic blockers) を用いて処置される。

画像診断法は腎性高血圧を伴う腎性狭窄の検出に用いることができる。腎臓部位の造影に用いられる造影法は、放射性核種シンチグラフィ法及び放射性核種核医学法を含む。ACE阻害剤であるカプトプリルは、腎動脈における狭窄の検出のために放射線学的方法及び放射線シンチグラフィ法と組み合わせて用いられてきた。例えば Nally et al., Sem. Nucl. Med. XXII; 85-97 (1992), Itoh, et al., Clin. Nucl. Med. 18; 463-471 (1993) 及び Dondi, et al., J. Nucl. Med. 33; 2040-2044 (1992) を参照されたい。しかし核医学は悪い空間解像度、高価なことならびに下記に議論する通り放射性材料を用いる望ましくない必要性に悩まされる。腎性高血圧の検出のための核医学法に血管造影法が好ましいが、それも高価であり、侵襲性である。腎性高血圧に関する診断手段として超音波を用いる試みは、これまで一般に悪い結果を与えてきた。例えば Postma, et al., Br. J. Radiol. 65; 857-860 (1992) 及び Kliwer, et al., Radiol. 189; 779-787 (1993) を参照されたい。

従って、特に腎臓部位の造影のための新規な及び/又は改良された画像診断法が必要である。腎臓部位における血流の定量を可能にする新規な及び/又はより良い画像診断法も必要である。本発明はこれらならびに他の重要な目的に向かっている。

#### 発明の概略

本発明は、部分的に、画像診断のための新規な及び/又は改良された方法に関する。特定的には、1つの実施態様において、脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小胞組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与することを含む患者の腎臓部位の画像を与えるための方法が提供される。次いで画像診断法を用いて患者を走査し、患者の腎臓部位の可視画像を作成する。

本発明の他の実施態様は、また、患者の腎臓部位の画像を与えるための方法に関する。該方法は脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含む組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与することを含む。次いで画像診断法を用いて患者を走査し、腎臓部位の可視画像を作成する。

本発明のさらなる実施態様は、患者の腎臓部位における疾患組織の存在を診断するための方法であって、(i) 脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小胞組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与し、(ii) 画像診断法を用いて患者を走査して患者の疾患組織の可視画像を得ることを含む方法を提供する。

本発明のさらに別の実施態様は、患者の腎臓部位における疾患組織の存在を診断するための方法であって、(i) 脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含む組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与し、(ii) 画像診断法を用いて患者を走査して患者の疾患組織の可視画像を得ることを含む方法を提供する。

さらに別の実施態様は、腎動脈の血管拡張を誘導する薬剤を造影剤と組み合わせて患者に投与することを含む患者の腎臓部位の診断画像における診断的アーチファクトを実質的に除去するための方法を提供する。

本発明のさらに別の実施態様において、脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小胞組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて含む画像診断法のための造影剤が提供される。

本発明のさらに別の実施態様において、脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは

気体前駆体を腎血管拡張薬と組み合わせて含む画像診断法のための造影剤が提供される。本発明のさらに別の実施態様において、患者の腎臓部位における血流の測定のための方法を提供する。該方法は、(i)脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小胞組成物を患者に投与し、(ii)画像診断法を用いて患者を走査して腎臓部位の可視画像を得、(iii)腎血管拡張薬を患者に投与し、(iv)該走査を続け、(v)段階(ii)から(iv)で得られた画像におけるビデオ濃度対時間の関係から血流を決定することを含む。

本発明のさらに別の実施態様において、(i)脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含む組成物を患者に投与し、(ii)画像診断法を用いて患者を走査して腎臓部位の可視画像を得、(iii)腎血管拡張薬を患者に投与し、(iv)該走査を続け、(v)段階(ii)から(iv)で得られた画像におけるビデオ濃度対時間の関係から血流を決定することを含む患者の腎臓部位における血流の測定のための方法が提供される。

本発明のこれら及び他の側面は、本明細書中の残る議論からもっと明らかになるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、実施例3に記載する腎臓について行われたパルス超音波造影法から得たデータのプロットである。ビデオ濃度信号の再出現対ピークビデオ濃度信号の比率に対する標準化されたビデオ濃度値(y)がy軸上にある。各プロットは超音波造影剤として用いられる気体充填小胞を破裂させるために適用される超音波パルスの間の1～5秒の異なる時間間隔(t)を示す。データはパルス超音波造影法及び腎血管拡張薬の連続的投与を用いて血流を定量的に測定できることを示す。

#### 発明の詳細な記述

上記及び本開示全体で用いられる場合、以下の用語は他に指示されない限り以下の意味を有すると理解されるべきである。

「脂質」は、一般に両親媒性の天然、合成又は半-合成(「修飾天然」(modified natural)とも言われる)化合物を言う。脂質は典型的に親水性成分及び疎水性成分を含む。代表的脂質には例えば脂肪酸、天然の脂肪、ホスファチド類、油、糖脂質、界面活性剤(surface-active agents (surfactants))、脂肪族アルコール、ワックス類、テルペン類及びステロイド類が含まれる。

本明細書で用いられる場合、「ポリマー」又は「ポリマー性」は2つ又はそれ以上の繰り返し単位の化学的結合から生成する分子を言う。従って「ポリマー」という用語内に含まれるのは、例えば2量体、3量体及びオリゴマーであることができる。ポリマーは合成、天然又は半合成であることができる。好ましい形態では、「ポリマー」という用語は10個又はそれより多い繰り返し単位を含む分子を言う。

本明細書で用いられる場合、「タンパク質」はペプチド結合における-アミノ酸を含むそして好ましくは本質的にそれから成る分子を言う。「タンパク質」という用語内に含まれるのは球状タンパク質、例えばアルブミン、グロブリン及びヒストンならびに繊維状タンパク質、例えばコラーゲン、エラスチン及びケラチンである。タンパク質分子が非タンパク質分子と結合している「複合タンパク質」、例えばヌクレタンパク質(nucleoproteins)、ムコタンパク質、リポタンパク質及びメタロタンパク質も含まれる。

「脂質組成物」、「ポリマー組成物」及び「タンパク質組成物」はそれぞれ脂質、ポリマー又はタンパク質化合物を典型的に水性媒体中に含む組成物を言う。代表的組成物には懸濁液、乳液及び小胞組成物が含まれる。本明細書に記載する組成物は生物活性薬も含むことができる。

「小胞」は一般に1つ又はそれ以上の内腔を形成する1つ又はそれ以上の壁又は膜の存在により特徴付けられる実体(entity)を言う。小胞は例えば本明細書に記載する種々の脂質を含む脂質又は本明細書に挙げる種々のポリマー性材料を含むポリマー性材料又は本明細書に挙げる種々のタンパク質を含むタンパク質から調製されていることができる。脂質、ポリマー及び/又はタンパク質は天然、合成又は半-合成であることができる。好まし

10

20

30

40

50

い小胞は、脂質から調製される壁又は膜を含む小胞である。壁又は膜は同心的又は他であることができる。好ましい小胞の場合、脂質は単層又は二重層の形態であることができ、単層 - もしくは二重層脂質を用いて1つ又はそれより多い単層もしくは二重層を形成することができる。1つより多い単層又は二重層の場合、単層又は二重層は望ましいなら同心的であることができる。脂質を用いて単ラメラ小胞(1つの単層又は二重層から成る)、オリゴラメラ小胞(約2又は約3つの単層もしくは二重層から成る)あるいは多重ラメラ小胞(約3つより多い単層もしくは二重層から成る)を形成することができる。同様に、ポリマー又はタンパク質から調製される小胞は1つ又はそれより多い壁又は膜を含むことができ、それは同心的又は他であることができる。脂質、ポリマー又はタンパク質から調製される小胞の壁又は膜は実質的に充実体(均一)であることができるかあるいはそれらは多孔質もしくは半 - 多孔質であることができる。本明細書に記載する小胞は通常例えばリポソーム、ミセル、泡、微泡、微小球、脂質 - 、タンパク質 - 及び/又はポリマー - コーティングされた泡、微泡及び/又は微小球、マイクロバルーン、マイクロカプセル、エーロゲル、クラスレート結合小胞、六方H II相構造などと言われる実体を含む。小胞の内腔は液体(例えば水性液を含む)、気体、気体前駆体及び/又は例えば血管拡張薬及び/又は生物活性薬を含む固体もしくは溶質材料で所望通り満たされていることができる。小胞は望ましいなら標的化リガンドを含むこともできる。望ましいなら、生体内で小胞を破裂させ、それにより捕獲されている気体及び/又は気体前駆体ならびに生物活性薬の放出を促進するために、高エネルギー超音波、高周波、光学的エネルギー、例えばレーザー光及び/又は熱の適用を用いることができる。かくして小胞調剤は腎血管拡張薬などの生物活性薬の生体内における制御された放出を可能にする。小胞を破裂させてそれにより生物活性薬を放出させることに超音波エネルギーを用いることは、米国特許第5,558,092号にて議論されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

10

20

「小胞組成物」は小胞を含む典型的に水性媒体中の組成物を言う。

「小胞調剤」は生物活性薬も含む小胞組成物を言う。小胞調剤において用いるのに適した小胞又は小胞種には例えば気体充填小胞及び気体前駆体充填小胞が含まれる。

「リポソーム」は、典型的に1つ又はそれより多い同心的層、例えば二重層の形態の脂質化合物を含む両親媒性化合物の一般に球状又は回転長円体状のクラスター又は凝集物を言う。それは本明細書で脂質小胞とも言われる。リポソームは例えばイオン性脂質及び/又は非 - イオン性脂質から調製することができる。非 - イオン性脂質から調製されるリポソームは「ニオソーム」とも言われる。

30

「ミセル」は脂質から調製されるコロイド性実体を言う。ある好ましい実施態様の場合、ミセルは単層又は六方H II相立体配置を含む。他の好ましい実施態様の場合、ミセルは二重層立体配置を含むことができる。

「エーロゲル」は複数の小さい内腔により特徴付けられる一般に球状又は回転長円体状の実体を言う。エーロゲルは合成材料(例えばレゾルシノール及びホルムアルデヒドを焼くことから調製される泡)ならびに天然材料、例えば多糖類もしくはタンパク質から調製することができる。

「クラスレート」は小胞を伴うことができる充実体、半 - 多孔質又は多孔質粒子を言う。好ましい形態の場合、クラスレートは小胞を含む空洞を含有する籠 - 様構造を形成することができる。1つ又はそれより多い小胞がクラスレートに結合していることができる。必要なら安定化材料がクラスレートに伴い、小胞とクラスレートの会合を助長することができる。それからクラスレートを調製することができる適した材料には、例えば多孔質アパタイト、例えばカルシウムヒドロキシアパタイト及びポリマーと金属イオンの沈澱物、例えばカルシウム塩とのアルギン酸沈澱物が含まれる。

40

「乳液」は2つ又はそれより多い一般に非混和性の液体の混合物を言い、一般にコロイドの形態にある。混合物は脂質の混合物であることができ、それは乳液全体に不均一又は均一に分散していることができる。別の場合、脂質は例えばクラスター又は単層もしくは二重層を含む層の形態で凝集していることができる。

50

「懸濁液」又は「分散液」は、好ましくは微細に分割された２つ又はそれより多い相（固体、液体又は気体）の、例えば液体中の液体、液体中の固体、液体中の気体などの混合物を言い、それは好ましくは長時間安定なままであることができる。

「六方Ｈ　ＩＩ相構造」は液体媒体、例えば水性媒体中における脂質の一般に管状の凝集物を言い、そこにおいては脂質の親水性部分が一般に管の内部の水性液体環境と会合して内側に向いている。脂質の疎水性部分は一般に外側に発散し、複合体は六角管の形をとっている。一般に複数の管が六方相構造中に一緒に充填されている。

本発明の方法で用いられる小胞は好ましくは気体又は気体前駆体を含む。「気体充填小胞」は気体が封入されている小胞を言う。「気体前駆体充填小胞」は気体前駆体が封入されている小胞を言う。ある好ましい実施態様の場合、小胞は実質的に（完全にを含む）気体及び／又は気体前駆体で満たされていることができる。気体及び／又は気体前駆体充填小胞への言及において用いられる場合、「実質的に」という用語は小胞の内腔体積の約５０％より多くが気体及び／又は気体前駆体から成ることを意味する。好ましくは実質的に充填された小胞の内腔の約６０％より多くが気体及び／又は気体前駆体から成り、約７０％より多いのがより好ましい。さらにもっと好ましくは実質的に充填された小胞の内腔の約８０％より多くが気体及び／又は気体前駆体から成り、約９０％より多いのがさらにもっと好ましい。特に好ましい実施態様の場合、小胞の内腔の約９５％より多くが気体及び／又は気体前駆体から成る。必要なら、実質的に充填された小胞は完全に満たされていることができる（すなわち約１００％、気体及び／又は気体前駆体で満たされている）。本発明の好ましい実施態様とは考ないが、小胞は必要なら全くもしくは実質的に全く気体及び／又は気体前駆体を含むし、すなわち約５０％未満で含むこともできる。本発明の組成物及び／又は調剤は患者に投与することができる。本明細書で用いられる場合、「患者」は哺乳類、好ましくは人間を含む動物を言う。

「患者の内部位」及び「問題の部位」という句は患者全体あるいは患者の特定の区域もしくは部分を言う。患者の内部位及び問題の部位は例えば画像診断法を用いて造影されている区域ならびに／あるいは生物活性薬を用いて処置されている区域を含むことができる。

「患者の腎臓部位」という句は腎臓ならびに腎臓へ及び腎臓から直接つながっている血管系により限定される患者の部位を言い、腹部大動脈を含む。本明細書で用いられる場合、「血管系」という句は、体内あるいは体の臓器又は部分における血管（動脈、静脈などを含む）を示す。「循環系」という句は心臓血管部位及び血管系全体を言う。

「生物活性薬」は治療的又は診断的性質のものである用途と関連して、例えば患者における疾患の存在又は不在を診断するための方法において及び／又は患者における疾患の処置のための方法において用いることができる物質を言う。本明細書で用いられる場合、「生物活性薬」は試験管内及び／又は生体内で生物学的効果を及ぼすことができる物質も言う。生物活性薬は中性であるかあるいは正もしくは負に帯電していることができる。適した生物活性薬の例には診断的及び製薬学的薬剤（腎血管拡張薬を含む血管拡張薬を含む）、タンパク質、ペプチド、ビタミン、ステロイド、ステロイド類似体、抗腫瘍薬、ホルモン、抗炎症薬、化学療法薬を含む合成もしくは天然の有機もしくは無機分子ならびにヌクレオシド、ヌクレオチド及びポリヌクレオチドを含む遺伝物質が含まれる。好ましくは生物活性薬は製薬学的薬剤を含む。

「製薬学的薬剤」又は「薬物」は患者における疾病、苦痛、疾患又は外傷の処置（予防、診断、軽減又は治療を含む）に用いることができる治療的もしくは予防的薬剤を言う。治療的に有用なペプチド、ポリペプチド及びポリヌクレオチドも製薬学的薬剤又は薬物という用語の意味内に含まれ得る。好ましい製薬学的薬剤及び／又は薬物は腎血管拡張薬である。

「診断薬」は、腎臓部位を含む患者の内部位を造影するための方法と関連してならびに／あるいは患者における疾患、特に例えば心筋虚血及び心筋梗塞を含む心臓疾患の存在又は不在を診断するための方法において用いることができる薬剤を言う。代表的診断薬には例えば本明細書に記載する脂質及び／又は小胞組成物を含む、患者の超音波、磁気共鳴画像法又はコンピューター連動断層撮影と関連して用いるための造影剤が含まれる。



「遺伝材料」は一般に、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）を含むヌクレオチド及びポリヌクレオチドを言う。遺伝材料は当該技術分野における通常の熟練者に既知の合成化学的方法によるかあるいは組み換え法を用いることによるかあるいはその２つの組み合わせにより作ることができる。DNA及びRNAは場合により非天然ヌクレオチドを含むことができ、１本鎖又は２本鎖であることができる。「遺伝材料」はセンス及びアンチ・センスDNA及びRNA、すなわちDNA及び／又はRNA中のヌクレオチドの特定の配列に相補的なヌクレオチド配列も言う。

「増粘剤」は、本明細書に記載の脂質及び／又は小胞組成物中に導入されると粘度調整剤、乳化剤及び／又は可溶化剤、懸濁剤ならびに張度上昇剤として働くことができる多様な一般に親水性の材料のいずれかを言う。増粘剤はそのような性質のために組成物の安定性の維持を助けることができ得ると思われる。

10

「分散剤」は例えば本明細書に記載するある脂質及び／又は小胞組成物を含むコロイド粒子の懸濁媒体に加えられると、粒子の均一な分離を促進することができる界面活性剤を言う。ある好ましい実施態様の場合、分散剤はポリマー性シロキサン化合物を含むことができる。

「診断的アーチファクト」は一般に、例えば超音波、コンピューター連動断層撮影及び磁気共鳴画像を含む診断画像における不完全性、欠陥及び／又は欠点を言い、それは問題の部位の視覚化を邪魔するか及び／又は妨げ得る。診断的アーチファクトは診断画像における望ましくない暗化及び／又は陰影として現れ得る。

「超音波アーチファクト」、「コンピューター連動断層撮影アーチファクト」及び「MRIアーチファクト」はそれぞれ超音波、コンピューター連動断層撮影及びMRIに伴う診断的アーチファクトを言う。

20

「エコー発生小胞（echogenic vesicle）」は例えば超音波を含む音波を反射でき得る小胞を言う。エコー発生小胞は、例えば患者の内部位の音響性を変え、それによって超音波、コンピューター連動断層撮影及び磁気共鳴画像法などの画像診断法においてコントラストを向上させるための造影剤として特に有用であり得る。好ましい形態の場合、エコー発生小胞は気体充填小胞を含むことができる。別の場合、エコー発生小胞は全くもしくは実質的に全く気体もしくは気体前駆体を含有せず、気体もしくは気体前駆体の泡もしくは小球と一緒に分割された形態で液体媒体中に懸濁されている小胞を含むことができる。これらの後者の実施態様の場合、エコー発生性及び／又は患者の内部位の音響性における変更は少なくとも部分的に、分割された気体もしくは気体前駆体の存在から生ずると思われる。

30

「ビデオ濃度」又は「ビデオデンストメトリー」は超音波画像の後方散乱強度を言い、腎組織を例とする組織における造影剤、特に小胞に基づく造影剤の濃度を概算するために用いることができる。一般にビデオデンストメトリー分析は、アナログビデオデータの全領域を $512 \times 512$ 画素（画像要素）を有するデジタル画像に数値化することができるコンピューターシステムの使用を含む。各画素は $0 \sim$ 約 $255$ の数値を有し、 $0$ が白（コントラストなし）であり、 $255$ が黒（完全なコントラスト）である合計約 $256$ 個のグレーレベルの１つにより示すことができる。これらのグレーレベルは本明細書においてビデオデンストメトリー単位（VDUs）とも呼ばれ得る。

40

「輝度」は問題の部位の例えば超音波、コンピューター連動断層撮影及び磁気共鳴画像を含む診断画像におけるコントラストのレベルを言う。かくして腎臓部位の画像診断法と関連して、「輝度」という用語は腎組織及びそれに伴う血管系を含む腎臓部位の診断画像のコントラストのレベルを言う。

「強化された診断画像」は、先行技術の１つ又はそれより多い方法を用いて得られる診断画像に対して改良されていることができる診断画像を言い、それは本発明の方法を用いて得ることができる。強化された診断画像は診断画像における輝度の上昇、診断画像における診断的アーチファクトの実質的除去などにより現れ得る。かくして腎組織及びそれに伴う血管系を含む腎臓部位の画像診断法と関連して、強化された診断画像は例えば腎臓部位の診断画像における輝度の上昇及び／又は腎臓部位の診断画像における診断的アーチファ

50

クトの発生の実質的除去により現れ得る。

「輝度の上昇」は、本発明の方法を用いて得ることができる診断画像の輝度における上昇を言う。好ましくは本発明の方法により与えられる輝度の上昇は少なくとも裸眼で認識し得る。上記で限定したグレースケール（約0～約255 V D U s又はグレーレベル）に特に言及すると、好ましくは少なくとも約10 V D U s（グレーレベル）という輝度のレベルにおける上昇が本発明の方法を用いて与えられる。さらに好ましくは、本明細書に記載する実施態様に従うと、本発明の方法は約10 V D U sより大きい、例えば約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95又は100 V D U sという輝度における上昇を与える。ある他の実施態様では、本方法は約100 V D U sより大きい、例えば約105、110、115、120、125、130、135、140、145又は150 V D U sという輝度の上昇を与えることができる。さらに別の実施態様の場合、本発明の方法は約150 V D U sより大きい、例えば約155、160、165、170、175、180、185、190、195又は200 V D U sという輝度の上昇を与えることができる。さらに他の実施態様では、本方法は約200 V D U sより大きい、例えば約205、210、215、220、225、230、235、240、245、250又は255 V D U sという輝度の上昇を与えることができる。

10

「実質的除去」は診断画像における診断的アーチファクトの発生の防止もしくは実質的防止を言う。「実質的防止」という用語は、少なくとも1つの先行技術の診断法と比較して本発明の方法により、アーチファクトの少なくとも約50%を除去できることを意味する。好ましくは少なくとも1つの先行技術の診断法と比較して本発明の方法により、アーチファクトの少なくとも約60%を除去でき、アーチファクトの少なくとも70%の除去がより好ましい。さらに好ましくは、少なくとも1つの先行技術の診断法と比較して本発明の方法により、アーチファクトの少なくとも約80%を除去でき、アーチファクトの少なくとも約90%の除去がさらにもっと好ましい。さらにもっと好ましくは少なくとも1つの先行技術の診断法と比較して本発明の方法により、アーチファクトの少なくとも約95%を除去でき、少なくとも約100%の除去がさらにずっと好ましい。

20

「投与される」又は「投与」という用語は一般に、例えば本明細書に記載する脂質、ポリマー又はタンパク質及び/又は小胞組成物及び/又は調剤を含む生物適合性材料の患者への投与を言う。

30

「生物適合性」という用語は一般に生物学的機能に有害でなく、アレルギー性応答及び疾患状態を含んで、いずれの程度の許容され得ない毒性も生じない材料を言う。本発明で用いられる組成物及びその成分（例えば脂質、タンパク質、ポリマー、気体、気体前駆体、血管拡張薬など）は典型的に生物適合性である。

「組み合わせる」は腎血管拡張薬などの生物活性薬を脂質、ポリマー又はタンパク質ならびに/あるいは小胞組成物と共投与することを言う。「共投与」という用語は、生物活性薬を組成物の投与の前、その間又は後に投与できることを意味する。調剤における場合のように、生物活性薬が組成物中に含まれている実施態様の場合、生物活性薬を多様な種々の方法のいずれかで小胞組成物と組み合わせることができる。例えば小胞組成物の場合、生物活性薬を小胞の内腔内に捕獲することができる。さらに生物活性薬を、例えば小胞の層又は壁を構成する脂質、タンパク質又はポリマー中に散在させることにより、小胞の層又は壁内に組み込むことができる。非小胞性脂質、ポリマー及び/又はタンパク質組成物の場合、生物活性薬を脂質、ポリマー及び/又はタンパク質成分の間又はその中に捕獲することができる。生物活性薬を小胞あるいは非小胞性脂質、ポリマー及び/又はタンパク質の表面上に置くことができると思われる。この場合、生物活性薬は小胞あるいは非小胞性脂質、ポリマー及び/又はタンパク質の内面もしくは外面と化学的に相互作用し、そこに実質的に付着したままとなることができる。そのような相互作用は例えば静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、共有結合又は他の相互作用の形態をとることができる。又、生物活性薬は限られたやり方で小胞あるいは非小胞性脂質、ポリマー又はタンパク質の内面もしくは外面と相互作用することもできる。そのような限られた相互作用

40

50

は例えば第1の小胞の表面から第2の小胞の表面へかあるいは第1の非小胞性脂質、ポリマー又はタンパク質の表面から第2の非小胞性脂質、ポリマー又はタンパク質の表面への生物活性薬の移動を可能にする。

「腎血管拡張薬」は、患者に投与されると腎臓部位の血管系の拡張を引き起こすか又は維持する生物活性薬を言う。腎血管系に直接働く薬剤ならびに腎臓部位における血管系の拡張を引き起こすか又は維持するように働く他の薬剤を生体内で活性化又は生産するかあるいは活性化又は生産されるように強制することにより間接的に働く薬剤を含むことが意味されている。

「虚血性」は血管の機能性収縮又は実際の閉塞の故の血液の不足を示す。

本発明は部分的に、例えば患者の内部位、特に患者の腎臓部位の画像を得るための改良された方法を含む画像診断のための改良された方法を目的とする。本発明の改良された方法は、例えば診断画像における輝度の上昇及び/又は診断画像における診断的アーチファクトの実質的除去により証明される通り、強化された診断画像を与えることができる。本発明の実施態様は脂質、ポリマー又はタンパク質及び気体もしくは気体前駆体を含む脂質、ポリマー又はタンパク質組成物の形態の造影剤を患者に投与することを含む。本発明の実施態様は、小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小胞組成物の形態の造影剤を患者に投与することを含む。患者を画像診断法、好ましくは超音波を用いて走査し、部位の可視画像を得る。本発明の方法の重要な特徴は、造影剤に加えて腎血管拡張薬を患者に投与することである。腎血管拡張薬は画像診断法、特に超音波のための方法と関連して、これまで利用できた画像診断のための方法に対して独特の利点を与えると思われる。これに関し、腎血管拡張薬は患者の腎臓部位の血管を拡張することができる。これが今度は腎臓部位における患者の血流の変化を与えることができる。驚くべく且つ予期に反して、腎臓部位の血流におけるこの変化は腎臓部位の診断画像の質における顕著な変化を与え得ることが見いだされた。本発明は少なくとも部分的に、この驚くべき且つ予期に反する発見を利用して腎臓部位の画像診断のための改良された方法を提供することを目的としている。本発明は患者の腎臓部位の改良された画像を得るための簡単で有効な手段を与える。

腎臓部位の超音波画像法などの画像診断法は、静脈内に投与される造影剤、例えば気体充填小胞を含む造影剤の利用を含み得る。注射の後、造影剤は血流中で腎臓部位まで運ばれることができる。もちろん循環系全体に及ぶ血液の循環の正常な経路において、造影剤を含有する血液が腎臓及びそれに伴う血管系を介して流れるであろうことが理解される。エネルギー、例えば超音波を適用し、腎臓部位の診断画像を形成することができる。超音波を用いて腎臓における疾患を検出するための基礎は、血液と組織の間の音響性の差である。造影剤は血液と回りの組織の間の音響的差を増加させ、それにより血流の検出可能性及び結果として血流における変化を含む疾患の検出を向上させることが予想される。放射性核種が腎臓機能の評価を助ける核医学と対照的に、超音波は血流及び腎血管系の構造を評価する。

驚くべく且つ予期に反して、脂質、ポリマー又はタンパク質及び気体もしくは気体前駆体を含む造影剤ならびに特に脂質、ポリマー又はタンパク質小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む造影剤を患者に投与することを含む腎臓部位の画像診断のための方法と関連して、さらに腎血管拡張薬を投与することは望ましいことに、得られる診断画像を強化することが見いだされた。発明者等は作用の理論に縛られることは望まないが、強化された診断画像は腎血管拡張薬により引き起こされる腎臓の血流における変化の故であり得ると思われる。血流におけるこの変化は強化された診断画像を与えることができ、それは例えば輝度の上昇及び/又は診断画像における診断的アーチファクトの実質的除去により現れ得る。患者への腎血管拡張薬の投与は血流及び従って腎組織における造影剤の濃度を増加させることができると思われる。腎組織における造影剤のこの増加は腎臓部位及び腎組織の診断画像における輝度の上昇を与えることができ、それが組織の視覚化の向上を生ずることができる。腎血管拡張薬の投与は、関連する血管系における血流（及び造影剤の濃度）に対して腎組織における血流（及び造影剤の濃度）を増加させることができると思われる。これは腎臓部位の画像における診断的アーチファクトの減少又は実質的除去を生ずるこ

10

20

30

40

50

とができる。

腎動脈を通る血流の測定可能な物理的発現 ( p h y s i c a l m a n i f e s t a t i o n s ) は、動脈を拡張又は収縮させる因子により影響される。さらに、何人かの患者において起こる動脈の小動脈への分枝は動脈容積の減少及びそれに伴う血圧の上昇を生ずると思われる。腎血管拡張薬はこの影響を逆転させ、それにより血液容積を増加させると思われる。腎動脈が分枝すると、1つ又はそれより多い枝が狭窄性であり得、腎臓のある区画が虚血性であり得る。本発明の方法はそのような状態の診断において用いることができる。

腎血管拡張薬の他の効果は、虚血性腎臓と非 - 虚血性腎臓の間の血流の差 ( d i f f e r e n t i a l b l o o d f l o w ) を増加させることである。これは今度は画像診断法において虚血性腎臓と非 - 虚血性腎臓の間のビデオデンストメトリーにおける差を増加させる。下記で議論するとおり、腎血管拡張薬の投薬量レベルは患者の体重を含む複数の因子により決定されるが、それは好ましくは非 - 虚血性腎臓における血流を増加させるのに十分なレベルである。

本発明の好ましい実施態様の場合、造影剤を患者に投与し、腎臓部位の超音波画像法を行い、腎血管拡張薬を投与し、超音波画像法を繰り返す。非 - 虚血性腎臓は腎血管拡張薬のために、虚血性腎臓が示すであろうより顕著な血流の増加を示すであろうと予想される。実際に、腎血管拡張薬により引き起こされる血流の増加は、虚血性腎臓と非 - 虚血性腎臓の間のビデオデンストメトリーにおける差を強化する。そのために、造影剤の効果は腎血管拡張薬の使用によって強化される。得られるレノグラムを、腎臓及び腎臓部位の造影信号の強度を腎血管拡張薬の投与の前と後で比較することにより、分析することができる。本発明の方法を用いて得られる腎臓の血流の増加の程度は変化し、例えば患者に投与される特定の脂質及び/又は小胞組成物、患者に投与される特定の腎血管拡張薬、患者に投与される脂質/小胞組成物及び腎血管拡張薬のそれぞれの投薬量などに依存する。一般に本発明の方法を用いて得られる血流におけるいずれの増加も、強化された診断画像を与えることができる。本発明の好ましい実施態様に従うと、約10%より大きい、例えば約20、30、40又は50%の血流の増加により強化された診断画像を得ることができる。好ましくは約50%より大きい、例えば約60、70、80、90又は100%の血流の増加により強化された診断画像を得ることができ、約100%より大きい、例えば約110、120、130、140又は150%の血流の増加がより好ましい。さらにもっと好ましくは、約150%より大きい、例えば約160、170、180又は190%の血流の増加により強化された診断画像を得ることができ、約200%の増加がさらにもっと好ましい。ある特に好ましい実施態様の場合、約200%より大きい血流の増加により強化された診断画像を得ることができる。

本発明に従うと、前記の血流の変化は腎血管拡張薬を患者に投与することにより達成することができる。かくして好ましい形態の場合、本発明の方法は造影剤を腎血管拡張薬と組み合わせる患者に投与することを含む。一般に本発明の方法で用いられる腎血管拡張薬は、造影剤の投与の前、その間及び/又は後に投与することができる。当該技術分野における通常の熟練者に明らかな通り、本開示を動員したら、造影剤及び腎血管拡張薬の投与の順序ならびにそれらを投与する方法は、得られる診断画像を調整する手段として所望通りに変えることができる。かくして本方法は、例えば造影されている組織、特に腎組織の状態及び腎臓部位における血流の速度を含む患者についての所望の情報を、熟練者が得ることを可能にし、それは患者の全身的健康及び安寧に関する情報を与えることができる。例えば本方法は最初に患者への造影剤の連続的投与又は輸液を含むことができると思われる。この方法で患者の腎臓部位において造影剤の実質的に一定な流れ又は濃度を得ることができる。腎血管拡張薬の投与は患者の腎臓部位における血流を増加させ、それが今度は腎組織の診断画像の輝度を上昇させることができる。

造影剤の一定の投与又は輸液を用いる実施態様の場合、腎血管拡張薬への患者の応答の速度は、患者における腎疾患を含む疾患の存在もしくは不在に関する情報も与えることができる。特に、例えば腎臓の血流の増加の速度により証明される患者が腎血管拡張薬に応答

10

20

30

40

50

するのに必要な時間は、患者の腎動脈の完全性に関する情報を与えることができる。かくして実質的に腎動脈狭窄のない患者は腎血管拡張薬に実質的に迅速に応答できることが、腎臓の血流の増加により測定される。逆に重症の腎動脈狭窄を有する患者は、狭窄のない患者が応答する速度より遅い速度で腎血管拡張薬に応答し得る。

本発明の実施態様において、造影剤は脂質及び気体もしくは気体前駆体を含む脂質組成物を含んでいることができる。脂質組成物、特に小胞組成物の形態の脂質組成物と関連し、含まれる脂質のゲルから液晶への相転移温度より低い温度で脂質組成物を調製するのが有利である。この相転移温度は、脂質二重層がゲル状態から液晶状態に転換するであろう温度である。例えば Chapman et al., J. Biol. Chem. 1974 249, 2512 - 2521 を参照されたい。

10

一般に、ゲル状態から液晶状態への相転移温度が高い脂質から調製される小胞は、与えられた温度において比較的強い不透過性を有する傾向があると思われる。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する Derek Matsh, CRC Handbook of Lipid Bilayers (CRC Press, Boca Raton, FL 1990), p. 139 を参照されたい。種々の脂質のゲル状態から液晶状態への相転移温度は当該技術分野における熟練者に容易に明らかになり、例えば Gregoriadis, ed., Liposome Technology, Vol. I, 1 - 18 (CRC Press, 1982) に記載されている。以下の表は代表的脂質のいくつか及びそれらの相転移温度を挙げるものである。

表 1

飽和ジアシルー s n - グリセロー 3 - ホスホコリン :

主鎖融解転移温度

アシル鎖中の炭素の数	主相転移温度 (° C)
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

例えば Derek Matsh, CRC Handbook of Lipid Bilayers, p. 139 (CRC Press, Boca Raton, FL 1990) を参照されたい。

10

20

30

40

50

脂質組成物に少なくとも少量の、例えば用いられる脂質の合計量に基づいて約 1 ~ 約 10 モルパーセントの負に帯電した脂質を導入することにより、脂質から調製される小胞の安定性を強化することができる。適した負に帯電した脂質には、例えばホスファチジルセリン、ホスファチジン酸及び脂肪酸が含まれる。いずれの作用の理論により縛られることも意図しないが、そのような負に帯電した脂質は、小胞と一緒に融合することにより破裂する傾向に逆らうことにより安定性を増すことができると思われる。かくして負に帯電した脂質は小胞の外面上に均一な負に帯電した層を確立するように働くことができ、それはその近くにあり得る他の小胞上の同様に帯電した外層により反発されるであろう。この方法で、それぞれの小胞の膜又は皮を破裂させ得、接触小胞を合併又は融合させて 1 つのもっと大きな小胞にし得るような、小胞が互いに接触する程近くなる傾向を低くすることができる。

10

もちろん合併のこの過程が連続すると、小胞の有意な分解を生ずるであろう。本明細書に記載するある組成物において、特に脂質に基づく小胞組成物と関連して用いられる脂質材料は好ましくは柔軟性でもある。これは、例えば脂質に基づく小胞組成物の場合、小胞がその形を変えて、例えば小胞の直径より小さい直径を有する開口部を通過できることを意味する。

多様な脂質が脂質及び / 又は小胞組成物に導入するために適していると思われる。小胞組成物、例えばミセル及び / 又はリボソームに特に言及すると、当該技術分野における熟練者にその調製に適していることが知られているいずれの材料又はその組み合わせも用いることができる。用いられる脂質は天然、合成又は半 - 合成起源のものであることができる。上記の通り、適した脂質には一般に例えば脂肪酸、天然の脂肪、ホスファチド類、糖脂質、脂肪族アルコール及びワックス類、テルペン類及びステロイド類が含まれる。

20

脂質組成物の調製に用いることができる代表的脂質には例えば脂肪酸；リゾ脂質；ホスホコリン類；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（DPPC）；ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）；及びジアラキドニルホスフィチジルコリン（DAPC）を含む飽和及び不飽和脂質の両方を有する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類、例えばジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）及びジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）；ホスファチジルセリン；ジステアロイルホスファチジルグリセロール（DSPG）を含むホスファチジルグリセロール類；ホスファチジリンイノシトール；スフィンゴリピド類、例えばスフィンゴミエリン；糖脂質、例えばガングリオシド GM1 及び GM2；グルコリピド類；スルファチド類；グリコスフィンゴリピド類；ホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）及びジステアロイルホスファチジン酸（DSPA）；パルミチン酸；ステアリン酸；アラキドン酸；オレイン酸；生物適合性ポリマー、例えばキチン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドン又はポリエチレングリコール（PEG）を含む脂質であり、後者は本明細書で「ペギル化脂質（pegylated lipids）」とも呼ばれ、ポリマーを含む好ましい脂質には DPPE - PEG が含まれ、これは PEG ポリマーが結合した脂質 DPPE を言い、それには例えば約 5000 の平均分子量を有する PEG ポリマーが結合した DPPE を言う DPPE - PEG 5000 が含まれる脂質；スルホン化モノ - 、ジ - 、オリゴ - もしくは多糖類を有する脂質；コレステロール、コレステロールサルフェート及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；エーテル及びエステル - 結合脂肪酸を有する脂質；重合脂質（多様な重合脂質が当該技術分野において周知である）；ジアセチルホスフェート；ジセチルホスフェート；ステアリンアミン；カルジオリピン；長さが約 6 ~ 約 8 炭素の短鎖脂肪酸を有するリン脂質；非対称アシル鎖、例えば約 6 炭素の 1 つのアシル鎖及び約 12 炭素の他のアシル鎖を有する合成リン脂質；セラミド類；ニオソームを含む非 - イオン性リボソーム、例えば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族アルコール、ポリオキシエチレン脂肪族アルコールエーテル、ポリオキシエチル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

30

40

50

エチレングリコールリシノレート、エトキシ化大豆ステロール、エトキシ化ヒマシ油、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンポリマー及びポリオキシエチレン脂肪酸ステアレート；コレステロールサルフェート、コレステロールブチレート、コレステロールイソ-ブチレート、コレステロールパルミテート、コレステロールステアレート、ラノステロールアセテート、エルゴステロールパルミテート及びフィトステロールn-ブチレートを含むステロール脂肪酸エステル；コレステロールグルクロニド、ラノステロールグルクロニド、7-デヒドロコレステロールグルクロニド、エルゴステロールグルクロニド、コレステロールグルコネート、ラノステロールグルコネート及びエルゴステロールグルコネートを含む糖酸のステロールエステル；ラウリルグルクロニド、ステアロイルグルクロニド、ミリスチルグルクロニド、ラウリルグルコネート、ミリスチルグルコネート及びステアロイルグルコネートを含む糖酸とアルコールのエステル；スクロースラウレート、フルクトースラウレート、スクロースパルミテート、スクロースステアレート、グルクロン酸、グルコン酸及びポリウロン酸を含む糖と脂肪酸のエステル；サルササポゲニン、スミラゲニン、ヘデラゲニン、オレアノール酸及びジギトキシゲニンを含むサポニン類；グリセロールジラウレート、グリセロールトリラウレート、グリセロールジパルミテート、グリセロール及びグリセロールエステル類、例えばグリセロールトリパルミテート、グリセロールジステアレート、グリセロールトリステアレート、グリセロールジミリステート及びグリセロールトリミリステートを含むグリセロール類；n-デシルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール及びn-オクタデシルアルコールを含む長鎖アルコール類；6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)-1-チオ-  
 -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-コレステレン-3-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-  
 -D-ガラクトピラノシド；6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-  
 -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-アンモニオ)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-アミン；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及びパルミトイルホモシステインならびに/あるいはそれらの組み合わせが含まれる。

必要ならカチオン性脂質、例えば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リド(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)；及び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(DOTB)を用いることができる。脂質組成物においてカチオン性脂質を用いる場合、カチオン性脂質対非-カチオン性脂質のモル比は、例えば約1:1000~約1:100であることができる。好ましくはカチオン性脂質対非-カチオン性脂質のモル比は約1:2~約1:10であることができ、約1:1~約1:2.5の比率が好ましい。さらにもっと好ましくはカチオン性脂質対非-カチオン性脂質のモル比は約1:1であることができる。カチオン性及び非-カチオン性脂質の両方を含有する脂質組成物の場合、非-カチオン性脂質として多様な脂質を用いることができる。好ましくは、この非-カチオン性脂質はDPPC、DPPE及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミンの1つ又はそれ以上を含む。上記のカチオン性脂質の代わりに、カチオン性ポリマー、例えばポリリシン又はポリアルギニンならびにホスホン酸アルキル、ホスフィン酸アルキル及び亜リン酸アルキルを含む脂質を脂質組成物において用いることもできる。

好ましい実施態様の場合、脂質組成物はリン脂質、特にDPPC、DPPE、DPPA、DSPC、DSPE及びDAPC(20炭素)の1つ又はそれ以上を含み、DPPC、DPPE及び/又はDPPAが特に好ましい。

10

20

30

40

50



本明細書に記載の脂質組成物において飽和及び不飽和脂肪酸を用いることもでき、それには好ましくは直鎖状もしくは分枝鎖状形態で約12個の炭素～約22個の炭素を含有する分子が含まれ得る。イソプレノイド単位及び/又はプレニル基を含む炭化水素群(hydrocarbon groups)を同様に用いることができる。適した飽和脂肪酸の例には例えばラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸及びステアリン酸が含まれる。用いることができる適した不飽和脂肪酸には例えばラウロール酸、フィセチリン酸(phytanic acid)、ミリストール酸、リノール酸、リノレン酸、パルミトレイン酸、ペトロセリン酸及びオレイン酸が含まれる。用いることができる分枝鎖状脂肪酸の例には例えばイソラウリン酸、イソミリスチン酸、イソパルミチン酸及びイソステアリン酸が含まれる。

10

本発明の方法はタンパク質又はその誘導体から調製される組成物及び小胞も含むことができる。タンパク質から調製され、本発明の方法で用いるために適した小胞は、例えばFeinstein, 米国特許第4,572,203、4,718,433及び4,774,958号ならびにCerny et al., 米国特許第4,957,656号に記載されており、そのすべての記載事項は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。前記の特許に記載されているものに加え、他のタンパク質に基づく小胞は、本開示を動員したら、当該技術分野における通常の熟練者には明らかであろう。

脂質組成物ならびに/又は脂質及び/又はタンパク質から調製される小胞の他に、本発明の方法はポリマーから調製される組成物及び/又は小胞を含むこともでき、それは天然、半-合成(修飾天然)又は合成起源のものであり、半-合成及び合成ポリマーが好ましい。本明細書で用いられる場合、ポリマーという用語は2つ又はそれより多い繰り返しモノマー単位、好ましくは10個又はそれより多い繰り返しモノマー単位を含む化合物を示す。本明細書で用いられる場合、半-合成ポリマー(又は修飾天然ポリマー)という句は、何らかの様式で化学的に修飾されている天然ポリマーを示す。本発明で用いるのに適した代表的天然ポリマーには天然に存在する多糖類が含まれる。そのような多糖類には例えばアラビナン、フルクタン、フカン、ガラクトン、ガラクトツロナン、グルカン、マンナン、キシラン(例えばイヌリン)、レバン、フコイダン、カラゲナン、ガラトカロロース、ペクチン酸、アミロースを含むペクチン類、プルラン、グリコゲン、アミロペクチン、セルロース、デキストラン、デキストリン、デキストロース、ポリデキストロース、プスツラン、キチン、アガロース、ケラタン、コンドロイタン、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンタンゴム、澱粉ならびに種々の他の天然のホモポリマーもしくはヘテロポリマー、例えば1つもしくはそれ以上の以下のアルドース、ケトース、酸又はアミン: エリトロース、トレオース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、エリツルロース、リブロース、キシルロース、プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、マルトース、セロピオース、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクトツロン酸、マヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン及びノイラミン酸ならびに天然に存在するそれらの誘導体を含むものが含まれる。代表的半-合成ポリマーにはカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース及びメトキシセルロースが含まれる。本発明において用いるのに適した代表的合成ポリマーにはポリエチレン類(例えばポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン及びポリエチレンテレフタレート)、ポリプロピレン類(例えばポリプロピレングリコール)、ポリウレタン類(例えばポリビニルアルコール(PVA)、ポリ塩化ビニル及びポリビニルピロリドン)、ナイロンを含むポリアミド類、ポリスチレン、ポリ乳酸、フッ化炭化水素、フッ化炭素(例えばポリテトラフルオロエチレン)及びポリメチルメタクリレートならびにそれらの誘導体が含まれる。好ましいのは、組み合わせを含んでアクリル酸、メタクリル酸、エチレンイミン、クロトン酸、アクリルアミド、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEM)、乳酸、グリコール酸、 $\epsilon$ -カプロラクトン、アクロレイン、シアノアクリレート、シアノ

20

30

40

50

メタクリレート、ビスフェノールA、エピクロロヒドリン、ヒドロキシアルキル - アクリレート、シロキサン、ジメチルシロキサン、エチレンオキシド、エチレングリコール、ヒドロキシアルキル - メタクリレート、N - 置換アクリルアミド、N - 置換メタクリルアミド、N - ビニル - 2 - ピロリドン、2, 4 - ペンタジエン - 1 - オール、酢酸ビニル、アクリロニトリル、スチレン、p - アミノスチレン、p - アミノ - ベンジル - スチレン、スチレンスルホン酸ナトリウム、2 - スルホキシエチルメタクリル酸ナトリウム、ビニルピリジン、アミノエチルメタクリレート、2 - メタクリロイルオキシ - トリメチルアンモニウムクロリド及びポリビニリデンなどのモノマーならびに多官能基性架橋性モノマー、例えばN, N' - メチレンビスアクリルアミド、エチレングリコールジメタクリレート、2, 2' - (p - フェニレンジオキシ) - ジエチルジメタクリレート、ジビニルベンゼン、トリアリルアミン及びメチレンビス - (4 - フェニル - イソシアナート) から製造される生物適合性合成ポリマーもしくはコポリマーである。好ましいポリマーにはポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリシロキサン、ポリジメチルシロキサン、ポリ乳酸、ポリ( - カプロラクトン)、エポキシ樹脂、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレングリコール)及びポリアミド(ナイロン)ポリマーが含まれる。好ましいコポリマーにはポリビニリデン - ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン - ポリアクリロニトリル - ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン - ポリアクリロニトリル及びポリ d, l - ラクチド - コグリコリドポリマーが含まれる。好ましいコポリマーはポリビニリデン - ポリアクリロニトリルである。他の適した生物適合性モノマー及びポリマーは、本開示を動員したら、当該技術分野における熟練者に容易に明らかになるであろう。ポリマーを含む小胞の調製のための方法は、本開示を動員したら、本開示を当該技術分野において既知の情報、例えばその開示全体が引用することにより本明細書の内容となるUnger, 米国特許第5, 205, 290号に記載されている及びそこで引用されている情報と一緒にすると、当該技術分野における熟練者に容易に明らかになるであろう。

10

20

本発明の方法で用いるために脂質、タンパク質又はポリマーから誘導される小胞は、好ましくは低密度である。「低密度」という用語は小胞の合計容積の少なくとも約75%である内腔(空洞)容積を有する小胞を言う。好ましくは小胞は、小胞の合計容積の少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、さらにもっと好ましくは少なくとも約90%、さらにはずっと好ましくは少なくとも約95%そしてもっと好ましくは約100%という腔容積を有する。

30

上記の通り、本方法で用いられる脂質、タンパク質及びポリマー組成物ならびに/あるいは小胞は不活性ガスなどの気体を含むこともできる。気体は脂質、タンパク質又はポリマー組成物ならびに/あるいは小胞に、特に小胞内に気体が捕獲されている小胞組成物と関連して、強化された造影能、例えば反射能又は超音波を与えることができる。これは造影剤としての小胞組成物の有効性を向上させることができる。

好ましい気体は不活性であり且つ生物適合性である気体、すなわち生物機能に有害でない気体である。好ましい気体には空気、希ガス、例えばヘリウム、ルビジウム、超分極キセノン、超分極アルゴン、超分極ヘリウム、ネオン、アルゴン、キセノン、二酸化炭素、窒素、フッ素、酸素、硫黄に基づく気体、例えば六フッ化硫黄及び四フッ化硫黄、例えば部分的にフッ化されたガス又は完全にフッ化されたガスを含むフッ化ガスから成る群より選ばれた気体が含まれる。代表的フッ化ガスにはフルオロカーボンガス、例えばペルフルオロカーボンガス及びそれらの混合物が含まれる。常磁性ガス、例えば $^{17}\text{O}_2$ も脂質及び/又は小胞組成物において用いることができる。

40

好ましい実施態様の場合、本明細書に記載する組成物で用いられる気体はフッ化ガスを含む。そのようなフッ化ガスには少なくとも1つ又は1つより多いフッ素原子を含有する材料が含まれる。好ましいのは1つより多いフッ素原子を含有する気体であり、ペルフルオロカーボン(すなわち対応する炭化水素中の水素原子のすべてがフッ素原子により置換されている完全にフッ化されたフルオロカーボン)がより好ましい。好ましくはペルフルオロカーボンガスはペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペ

50

ルフルオロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロシクロブタン及びそれらの混合物から成る群より選ばれる。さらに好ましくは、ペルフルオロカーボンガスはペルフルオロプロパン又はペルフルオロブタンであり、ペルフルオロプロパンが特に好ましい。他の好ましい気体は六フッ化硫黄である。さらに別の好ましい気体は、1, 1, 1, 2, 3, 3, 3 - ヘプタフルオロプロパン及びその異性体である1, 1, 2, 2, 3, 3, 3 - ヘプタフルオロプロパンを含むヘプタフルオロプロパンである。異なる型の気体の混合物、例えばペルフルオロカーボンガスと空気などの他の型の気体の混合物を本発明の方法で用いられる組成物において使用することもできると思われる。上記で例示した気体を含んで他の気体は、本開示に基づいて当該技術分野における熟練者に容易に明らかになるであろう。

10

ある好ましい実施態様の場合、気体、例えば空気又はペルフルオロカーボンガスを液体ペルフルオロカーボン、例えばペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロオクチルブロミド (PFOB)、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロドデカリン、ペルフルオロオクチルヨード、ペルフルオロトリプロピルアミン及びペルフルオロトリブチルアミンと組み合わせる。

脂質及び/又は小胞組成物中に気体状物質への前駆体を導入することが望ましいこともあり得る。そのような前駆体は生体内で気体に転換されることができる材料を含む。好ましくは気体前駆体は生物適合性であり、生体内で作られる気体も生物適合性である。

本明細書に記載する脂質及び/又は小胞組成物で用いるのに適した気体前駆体の中に、pHに感受性の薬剤がある。これらの薬剤には、例えば中性又は酸性であるpHに暴露されると気体を発生することができる材料が含まれる。そのようなpH感受性薬剤の例には、無機酸、有機酸及びそれらの混合物から成る群より選ばれる酸の塩が含まれる。炭酸 ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) は適した無機酸の例であり、アミノマロン酸は適した有機酸の例である。無機酸及び有機酸を含む他の酸は、本開示に基づいて当該技術分野における熟練者に容易に明らかになるであろう。

20

塩から誘導される気体前駆体は好ましくはアルカリ金属塩、アンモニウム塩及びそれらの混合物から成る群より選ばれる。さらに好ましくは、塩は炭酸塩、重炭酸塩、セスキ炭酸塩、アミノマロン酸塩及びそれらの混合物から成る群より選ばれる。

塩から誘導される適した気体前駆体材料の例には、例えば炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸リチウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム、重炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム、セスキ炭酸アンモニウム、セスキ炭酸ナトリウム、アミノマロン酸ナトリウム及びアミノマロン酸アンモニウムが含まれる。アミノマロン酸塩は当該技術分野において周知であり、その製造は例えばThanassi, Biochemistry, Vol. 9, no. 3, pp. 525 - 532 (1970); Fitzpatrick et al., Inorganic Chemistry, Vol. 13, no. 3 pp. 568 - 574 (1974); 及びStelmashok et al., Koordinatsionnaya Khimiya, Vol. 3, no. 4, pp. 524 - 527 (1977)に記載されている。これらの出版物の開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

30

40

pHの変化に感受性である他に又はその代わりに、気体前駆体材料は温度の変化に感受性である化合物を含んでいることもできる。温度の変化に感受性の適した気体前駆体の例はペルフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、炭化水素エーテル、ヒドロフルオロカーボンエーテル及びペルフルオロカーボンエーテルである。これらの後者の気体前駆体は例えばハロタン、エンフルラン、イソフルラン、デスフルラン及びセボフルランを含む麻酔薬又は麻酔薬 - 様ガスにより代表される。熟練者にはわかる通り、特定のペルフルオロカーボンは脂質及び/又は小胞組成物が最初に製造される時に液体状態で存在することができ、かくして気体前駆体として用いることができる。別の場合、ペルフルオロカーボンは脂質及び/又は小胞組成物が製造される時に気体状態で存在することができ、かくして直接気体として用いることができる。ペルフルオロカーボンが液体として用いられるか気

50

体として用いられるかは一般に、その液体／気体相転移温度あるいは沸点に依存する。例えば好ましいペルフルオロカーボンであるペルフルオロペンタンは29.5 という液体／気体相転移温度（沸点）を有する。これはペルフルオロペンタンが室温（約25）で一般に液体であるが、正常な温度がペルフルオロペンタンの転移温度より高い約37 である人間の体内で気体に転換されることを意味する。かくして正常な状況下でペルフルオロペンタンは気体前駆体である。さらなる例としてペルフルオロペンタンの同族体、すなわちペルフルオロブタン及びペルフルオロヘキサンがある。ペルフルオロブタンの液体／気体転移は4 であり、ペルフルオロヘキサンのそれは57 である。かくしてペルフルオロブタンは、気体前駆体として有用であり得るが気体としての方が好適であり、それに反してペルフルオロヘキサンはその比較的高い沸点の故に気体前駆体として有用であることができる。当該技術分野における通常の熟練者に既知の通り、ある物質の有効な沸点は、その物質がさらされている圧力に関係し得る。この関係は理想気体の法則  $P V = n R T$  により例示され、ここで  $P$  は圧力であり、 $V$  は体積であり、 $n$  は物質のモル数であり、 $R$  は気体定数であり、 $T$  は温度である。理想気体の法則は圧力が上昇すると共に有効な沸点も上昇することを示している。逆に圧力が低下すると共に有効な沸点は低下する。

多様な材料を本明細書に記載する組成物において温度 - 感受性気体前駆体として用いることができる。適した温度を通過すると材料が気相に相転移を行うことができることのみが必要である。適した気体前駆体には、例えば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、三フッ化ホウ素、1, 2 - ブタジエン、2, 3 - ブタジエン、1, 3 - ブタジエン、1, 2, 3 - トリクロロ - 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、ペルフルオロブタン、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 - 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テン、3 - クロロシクロペンテン、ペルフルオロシクロペンタン、オクタフルオロシクロペンテン、シクロプロパン、ペルフルオロシクロプロパン、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、1, 2 - 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、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘブタン、ペルフルオロオクタン、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リド、1, 3 - ジオキソラン - 2 - オン、4 - メチル - 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, 1 - ジクロロ - 2 - 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、ペルフルオロエタン、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、ペルフルオロエチルアミン、エチルビニルエーテル、1, 1 - ジクロロエタン、1, 1 - ジクロロ - 1, 2 - ジフルオロエタン、1, 2 - ジフルオロエタン、メタン、トリフルオロメタンスルホニルクロリド、トリフルオロメタンスルホニルフルオリド、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、クロロジニトロメタン、クロロフルオロメタン、クロロトリフルオロメタン、クロ

10

20

30

40

50

ロジフルオロメタン、ジブロモジフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロフルオロメタン、ジフルオロメタン、ジフルオロヨードメタン、ジシラノメタン、フルオロメタン、ヨードメタン、ヨードトリフルオロメタン、ニトロトリフルオロメタン、ニトロソトリフルオロメタン、テトラフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、トリフルオロメタン、2 - メチルブタン、メチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、乳酸メチル、亜硝酸メチル、硫化メチル、メチルビニルエーテル、ネオペンタン、亜酸化窒素、1, 2, 3 - ノナデカントリカルボン酸 2 - ヒドロキシトリメチルエステル、1 - ノネン - 3 - イン、1, 4 - ペンタジエン、n - ペンタン、ペルフルオロペンタン、4 - アミノ - 4 - メチルペンタン - 2 - オン、1 - ペンテン、2 - ペンテン (シス及びトランス)、3 - ブロモペンタ - 1 - エン、ペルフルオロペンタ - 1 - エン、テトラクロロフタル酸、2, 3, 6 - トリメチル - ピペリジン、プロパン、1, 1, 1, 2, 2, 3 - ヘキサフルオロプロパン、1, 2 - エポキシプロパン、2, 2 - ジフルオロプロパン、2 - アミノプロパン、2 - クロロプロパン、ヘプタフルオロ - 1 - ニトロプロパン、ヘプタフルオロ - 1 - ニトロソプロパン、ペルフルオロプロパン、プロペン、ヘキサフルオロプロパン、1, 1, 1, 2, 3, 3 - ヘキサフルオロ - 2, 3 - ジクロロプロパン、1 - クロロプロパン、クロロプロパン - (トランス)、2 - クロロプロパン、3 - フルオロプロパン、プロピン、3, 3, 3 - トリフルオロプロピン、3 - フルオロスチレン、硫黄 (ジ) - デカフルオリド ( $S_2F_{10}$ )、2, 4 - ジアミノトルエン、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、六フッ化タンゲストン、ビニルアセチレン及びビニルエーテルが含まれる。

ペルフルオロカーボンは、本発明の方法で用いられる組成物と関連して用いるための好ましい気体及び好ましい気体前駆体の両方である。そのようなペルフルオロカーボンの中には飽和ペルフルオロカーボン、不飽和ペルフルオロカーボン及び環状ペルフルオロカーボンが含まれる。通常好ましい飽和ペルフルオロカーボンは式  $C_nF_{2n+2}$  を有し、ここで n は 1 ~ 約 12、好ましくは約 2 ~ 約 10、より好ましくは約 3 ~ 約 8 そしてさらにもっと好ましくは約 3 ~ 約 6 である。適したペルフルオロカーボンには、例えばペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、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、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロオクタン及びペルフルオロノナンが含まれる。好ましくはペルフルオロカーボンは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、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン及びペルフルオロオクタンから成る群より選ばれ、ペルフルオロプロパンが特に好ましい。式  $C_nF_{2n}$  を有し、ここで n が 3 ~ 8、好ましくは 3 ~ 6 である環状ペルフルオロカーボンも好ましく、それには例えばヘキサフルオロシクロプロパン、オクタフルオロシクロブタン及びデカフルオロシクロペンタンが含まれる。一般に、約 4 個又はそれ未満の炭素を含有するペルフルオロカーボンは室温で気体であるが、約 5 ~ 約 12 個の炭素を含有するペルフルオロカーボンは室温で液体である。いずれの場合も、液体及び / 又は気体ペルフルオロカーボンを本発明の組成物に導入することができる。

ペルフルオロカーボンの他に、完全にフッ化されていない安定なフルオロカーボンを用いるのが望ましいことがあり得る。そのようなフルオロカーボンにはヘプタフルオロプロパン、例えば 1, 1, 1, 2, 3, 3, 3 - ヘプタフルオロプロパン及びその異性体である 1, 1, 2, 2, 3, 3, 3 - ヘプタフルオロプロパンが含まれる。

気体前駆体材料は光活性化材料、例えばジアゾニウムイオン及びアミノマロネートであることもできる。ある種の脂質及び / 又は小胞組成物そして特に小胞組成物は、標的組織において又は組成物への音の作用によって気体が発生できるように調製することができる。気体前駆体の例は例えば米国特許第 5, 088, 499 及び 5, 149, 319 号に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。上記で例示したものに加え、他の気体前駆体は本開示に基づいて当該技術分野における熟練者に明らかになるであろう。

気体物質及び / 又は気体前駆体は好ましくは、組成物の物理的性質にかかわらず、脂質及

10

20

30

40

50

び／又は小胞組成物に導入される。かくして気体物質及び／又はそれへの前駆体は、例えば脂質が無作為に凝集している脂質組成物ならびにミセル及びリポソームなどの脂質から調製される小胞組成物を含む小胞組成物に導入できると思われる。気体物質及び／又はそれへの前駆体の脂質及び／又は小胞組成物中への導入は、複数の方法のいずれを用いて行うこともできる。例えば脂質に基づく小胞の場合、気体もしくは気体前駆体及び１種もしくはそれより多い脂質を含む水性混合物を震盪させるか又は他の方法で攪拌することにより、気体充填小胞を形成することができる。これは気体もしくは気体前駆体が封入された安定な小胞の形成を促進する。

さらに、脂質及び／又は小胞形成化合物の水性混合物中に気体を直接泡立てることができる。代わりに、例えば米国特許第 5,352,435 及び 5,228,446 号に開示されているような気体注入法を用いることができ、該特許の開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。カチオン性脂質組成物中に気体もしくは気体前駆体を導入するための適した方法も米国特許第 4,865,836 号に開示されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。他の方法は本開示に基づき、当該技術分野における熟練者に明らかとなるであろう。好ましくは安定化材料の添加の後又はその間ならびに／あるいは小胞の形成の間に気体を脂質及び／又は小胞組成物中に注入することができる。

好ましい実施態様の場合、気体物質及び／又は気体前駆体材料は小胞組成物中に導入され、ミセル及びリポソームが好ましい。下記で詳細に議論する通り、気体もしくは気体前駆体又は両方が封入されている小胞は、それらが生体内で反射能を向上させる点で有利である。

下記でさらに十分に議論する通り、脂質組成物及び特に小胞組成物は、脂質及び安定な小胞の形成を促進するための任意の安定化化合物から調製されるのが好ましい。さらに、脂質及び／又は小胞組成物が非常に安定な気体を同様に含むのも好ましい。「非常に安定な気体」という句は、水性媒体中における溶解度及び拡散性が限られている気体を言う。代表的な非常に安定な気体にはペルフルオロカーボンが含まれ、それはそれが一般に水性媒体中で拡散性が低く、比較的不溶性だからである。従ってそれらの使用は非常に安定な小胞の形成を促進することができる。

ある実施態様の場合、脂質及び／又は小胞組成物そして特に気体充填小胞の安定性を助けるか又は強化するために、例えば人間の体の生体内温度を含む脂質及び／又は小胞組成物の使用温度において液体状態であることができるフッ化化合物、特にペルフルオロカーボン化合物を用いるのが望ましいことがあり得る。適したフッ化化合物には、例えばフッ化界面活性剤、例えば ZONYL<sup>®</sup> 界面活性剤 (DuPont Company, Wilmington, DE) として商業的に入手可能なフッ化化合物ならびに液体ペルフルオロカーボン、例えばペルフルオロオクチルブロミド (PFOB)、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロドデカリン、ペルフルオロオクチルヨード、ペルフルオロトリプロピルアミン及びペルフルオロトリブチルアミンが含まれる。一般に約 6 個又はそれより多い炭素原子を含むペルフルオロカーボンは正常な人間の体温において液体である。これらのペルフルオロカーボンの中で、室温で液体であるペルフルオロオクチルブロミド及びペルフルオロヘキサンが好ましい。存在する気体は例えば窒素又はペルフルオロプロパンであることができるかあるいは気体前駆体から誘導されることができ、それもペルフルオロカーボン、例えばペルフルオロペンタンであることができる。後者の場合、脂質及び／又は小胞組成物をペルフルオロカーボンの混合物から調製することができ、それはある例の場合、ペルフルオロプロパン (気体) 又はペルフルオロペンタン (気体前駆体) 及びペルフルオロオクチルブロミド (液体) である。いずれの作用の理論に縛られるつもりもないが、小胞組成物の場合、液体フッ化化合物は気体と小胞の膜もしくは壁表面の間の界面に位置することができると思われる。かくして安定化化合物、例えば小胞の形成に用いられる生物適合性脂質の内面上に液体フッ化化合物のさらなる安定化層が形成され得、このペルフルオロカーボン層は気体が小胞の膜を介して拡散するのを妨げもする。本発明の意味内で、気体前駆体は製造及び／又は保存の温度において液体であるが、少なくとも使用時もし

10

20

30

40

50

くは使用の間に気体になる。

かくしてペルフルオロカーボンなどの液体フッ化化合物は、本明細書に記載する脂質及び／又は小胞組成物の製造に通常用いられる気体もしくは気体前駆体と組み合わせられると、安定性の程度を増すことができ、それはそうしないと気体もしくは気体前駆体のみからは得ることができないものであることが見いだされた。かくして気体もしくは気体前駆体、例えばペルフルオロペンタンを例とするペルフルオロカーボン気体前駆体を、患者への投与の後に液体のままである、すなわちその液体から気体への相転移温度が患者の体温より高いペルフルオロカーボン、例えばペルフルオロオクチルブロミドと一緒に用いることは、本発明の範囲内である。過フッ化界面活性剤、例えばZONYL<sup>®</sup>フッ化界面活性剤を用い、脂質及び／又は小胞組成物を安定化させ、例えば小胞のためのコーティングとして作用させることができる。好ましい過フッ化界面活性剤は部分的にフッ化されたホスホコリン界面活性剤である。これらの好ましいフッ化界面活性剤の場合、二元アルキル化合物(dual alkyl compounds)が末端アルキル鎖においてフッ化されていることができ、中心部の炭素は水素化されていることができる。これらのフッ化ホスホコリン界面活性剤は、本発明の方法で用いられる標的化脂質及び／又は小胞組成物の調製に用いることができる。

10

小胞組成物を含む実施態様と関連して、診断的及び／又は治療的用途を含む意図された特定の最終的用途のために小胞の寸法を調整することができる。小胞の寸法は好ましくは直径が約30ナノメートル(nm)～約100マイクロメートル(μm)の範囲及びそれに含まれる範囲のすべての組み合わせ及びサブコンビネーション(subcombination)である。さらに好ましくは、小胞は約100nm～約10μmの直径を有し、約200nm～約7μmの直径がもっと好ましい。特定の用途、例えば血管系の磁気共鳴画像法を含む血管内用途と関連し、小胞は直径が約30μm以下であるのが好ましいことがあり得、もっと小さい小胞、例えば直径が約12μm以下の小胞が好ましい。ある好ましい実施態様の場合、小胞の直径は約7μm又はそれ未満であることができ、約5μm又はそれ未満の平均直径を有する小胞がより好ましく、約3μm又はそれ未満の平均直径を有する小胞がもっと好ましい。これらの比較的小さい小胞は微小血管系などの小さい血管路を灌流することができ、同時に赤血球が小胞をすりぬけることを許すのに十分な空間又は余地を血管路内に与えると思われる。これらの比較的小さい小胞は血液と大体同じ流速で血管系全体を移動することができ、かくして正常な血流を妨げないか又は実質的に妨げないとも思われる。

20

30

気体充填小胞の寸法は必要なら、例えば震盪、微細乳化(microemulsification)、渦動押し出し(vortexing extrusion)、濾過、音波処理、ホモジナイゼーション、凍結及び解凍サイクルの繰り返し、限定された寸法の孔を介する加圧下の押し出し及び類似の方法を含む多様な方法により調整することができる。上記の通り、本明細書で用いられる組成物は、その調製、形成及び使用に関し、温度、pH、光及びエネルギー(例えば超音波)により活性化されて液体もしくは固体状態から気体に変化することができる気体前駆体を含むこともできる。気体前駆体は減圧で前駆体を保存することにより気体にすることができる。例えば減圧下で保存されるバイアルはペルフルオロペンタンもしくはペルフルオロヘキサンガスのヘッドスペースを生むことができ、それは注入前の予備生成気体を生むために有用である。好ましくは気体前駆体は温度により活性化される。下記に示すのは、正常な体温(37℃)に比較的近いか又はそれ未満の温度で液体から気体状態に相転移する1系列の気体前駆体ならびに10μmの最大寸法を有する小胞の形成に必要であろう乳化滴の寸法を挙げる表である。

40

表 2

気体前駆体の物理的性質及び

10  $\mu\text{m}$  小胞を形成するための乳化滴の直径<sup>a</sup>

化合物	分子量	沸点 (°C)	密度	10ミクロン小胞の 形成のための 乳化滴の直径( $\mu\text{m}$ )
ペルフル オロペンタン	288.04	29.5	1.7326	2.9
1- フルオロブタン	76.11	32.5	0.67789	1.2
2- メチルブタン (イソペンタン)	72.15	27.8	0.6201	2.6
2-メチル1 -ブテン	70.13	31.2	0.6504	2.5
2-メチル-2 -ブテン	70.13	38.6	0.6623	2.5
1-ブテン-3- イン-2-メチル	66.10	34.0	0.6801	2.4
3-メチル- 1-ブチン	68.12	29.5	0.6660	2.5
オクタフルオロ シクロブタン	200.04	-5.8	1.48	2.8
デカフルオロ ブタン	238.04	-2	1.517	3.0
ヘキサフルオロ エタン	138.01	-78.1	1.607	2.7

<sup>a</sup>資料: Chemical Rubber Company Hand book of Chemistry and Physics, Robert C. Weast and David R. Lide, eds., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida (1989 - 1990)。

すでに示した通り、ペルフルオロカーボンが気体もしくは気体前駆体としてならびに追加



の安定化成分として用いるために好ましい。

上記の通り、限られた溶解度の気体を用いることにより、脂質及び／又は小胞組成物、特に脂質から調製される小胞組成物の利用性を最適化するのが好ましい。「限られた溶解度」という句は、回りの水性媒体中におけるその溶解度の故に小胞から拡散する気体の能力を言う。水性媒体中における比較的高い溶解度は小胞中の気体に関する勾配を賦課し、気体が小胞から拡散する傾向を有し得る。他方、水性環境中における比較的低い溶解度は小胞と界面の間の勾配を低下させるか又は除去することができ、小胞からの気体の拡散を妨げることができる。好ましくは小胞中に捕獲される気体は酸素の溶解度、すなわち約32部の水中で約1部の気体という溶解度より低い溶解度を有する。Matheson Gas Data Book, 1996, Matheson Company Inc.を参照されたい。さらに好ましくは、小胞中に捕獲される気体は空気の溶解度より低い水中における溶解度を有し；もっと好ましくは小胞中に捕獲される気体は窒素の溶解度より低い水中における溶解度を有する。

10

ある実施態様の場合、実質的に不透過性のポリマー性材料から小胞を調製するのが望ましいことがあり得る。これらの実施態様の場合、やはり非常に不溶性である気体を用いるということは一般に不必要である。例えば実質的に不透過性のポリマー性材料を含む安定な小胞組成物を比較的高い溶解度を有する気体、例えば空気又は窒素を用いて調製することができる。

上記の脂質及び／又はポリマー性化合物に加えて及び／又はその代わりに、本明細書に記載する組成物は1種もしくはそれより多い安定化材料を含むことができる。そのような安定化材料の例は、例えば生物適合性ポリマーである。安定化材料を用い、小胞の形成を所望通りに助ける及び／又は気体もしくは気体前駆体の実質的封入を保証することができる。比較的不溶性で非-拡散性の気体、例えばペルフルオロプロパン又は六フッ化硫黄の場合でも、気体及び気体前駆体充填小胞の形成において1種もしくはそれより多い安定化材料を用いると、改良された小胞組成物を得ることができる。これらの化合物は小胞の安定性及び一体性をその寸法、形及び／又は他の属性に関して改良するのを助けることができる。

20

本明細書で用いられる場合、「安定な」又は「安定化された」という用語は、小胞が例えば小胞構造又は封入された気体もしくは気体前駆体の損失を含む分解に対し、有用な期間、実質的に抵抗性であり得ることを意味する。典型的に、本発明で用いられる小胞は所望の保存寿命を有し、多くの場合通常の周囲条件下で少なくとも約2～3週間、その最初の構造の少なくとも約90体積%を保持している。好ましい形態の場合、小胞は少なくとも約1カ月間、より好ましくは少なくとも約2カ月間、さらに好ましくは少なくとも約6カ月間、もっと好ましくは約18カ月間そしてさらにもっと好ましくは最高3年間、所望通りに安定である。気体及び気体前駆体充填小胞を含む本明細書に記載する小胞は、通常の周囲条件下で経験するものより高いか又は低い温度及び圧力などの悪条件下でさえ安定であることもできる。

30

本明細書に記載する小胞の安定性は、少なくとも部分的に、例えば上記の脂質、タンパク質及び／又はポリマーを含む小胞が作られている材料のためであることができ、多くの場合、追加の安定化材料を用いる必要がないが、そうすることは任意であり、好ましいこともあり得る。そのような追加の安定化材料及びその性質を下記にさらに十分に記載する。

40

小胞が構築される材料は好ましくは生物適合性脂質、タンパク質及び／又はポリマー材料であり、これらの中で生物適合性脂質が好ましい。さらに、投与の直前に小胞を調製できることを含む調製の容易さのために、これらの小胞を現場で簡単に作ることができる。

特に好ましい本発明の実施態様は3成分：(1)中性脂質、例えば非イオン性もしくは両性イオン性脂質、(2)負に帯電した脂質及び(3)安定化材料、例えば親水性ポリマーを含む脂質を含有する小胞を含む。好ましくは、負に帯電した脂質の量は存在する全脂質の約1モルパーセントより多く、親水性ポリマーを含む脂質の量は存在する全脂質の約1モルパーセントより多いであろう。代表的且つ好ましい負に帯電した脂質にはホスファチ

50

ジン酸が含まれる。親水性ポリマーを含む脂質は望ましくはポリマーに共有結合している脂質であり、ポリマーは好ましくは約400～約100,000の重量平均分子量を有する。適した親水性ポリマーは好ましくはポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンならびにそれらのコポリマーから成る群より選ばれ、PEGポリマーが好ましい。好ましくはPEGポリマーは約1000～約7500の分子量を有し、約2000～約5000の分子量がより好ましい。PEG又は他のポリマーは共有結合、例えばアミド、カルバメート又はアミン結合を介して例えばDPPPEなどの脂質に結合していることができる。さらに、PEGもしくは他のポリマーは標的リガンド又は他のリン脂質に、例えばアミド、エステル、エーテル、チオエステル、チオアミド又はジスルフィド結合を含む共有結合を用いて結合していることができる。親水性ポリマーがPEGの場合、そのようなポリマーを含む脂質は「ペギル化」(pegylated)されていると言われるであろう。好ましい形態の場合、親水性ポリマーを含む脂質はDPPPE-PEGであることができ、それには例えばDPPPE-PEG5000が含まれ、それは約5000の重量平均分子量のポリエチレングリコールポリマーがそれに結合しているDPPPEを言う(DPPPE-PEG5000)。他の適したペグ化脂質はジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-ポリエチレングリコール5000(DSPE-PEG5000)である。

本発明のある好ましい実施態様の場合、脂質組成物は約77.5モル%のDPPC、12.5モル%のDPPA及び10モル%のDPPPE-PEG5000を含むことができる。約80～約90モル%のDPPC、約5～約15モル%のDPPA及び約5～約15モル%のDPPPE-PEG5000を含む組成物も好ましい。特に好ましいのはDPPC、DPPA及びDPPPE-PEG5000をそれぞれ82:10:8のモル%比で含む組成物である。DPPCは、ホスファチジル部分が負に帯電し、コリン部分が正に帯電しているので、実質的に中性である。結局、負に帯電したDPPAを加え、上記の機構に従って安定化を強化することができる。DPPPE-PEGはDPPPE部分により小胞の脂質膜もしくは皮に結合したペグ化材料を与え、PEG部分は自由で小胞の膜もしくは皮を囲み、それにより、その機能がそのような異種材料を分解することである体内の種々の酵素及び他の内在性作用因子に対する物理的障壁を形成する。DPPPE-PEGは、示した比率でDPPC及びDPPAなどの他の脂質と組み合わせられると、安全で圧力に対して安定な比較的小さい寸法の小胞をより多く与えることができる。ペギル化材料は、その構造が水に似ているために、人間の免疫系のマクロファージの作用を無効にすることができると理論付けられ、そうでないとマクロファージは異種物体を囲み、除去する傾向がある。結果は、安定化された小胞が画像診断法の造影剤として機能することができる時間の延長である。小胞組成物は上記の材料に加え、他の材料から調製することができ、但しそのようにして調製される小胞は本明細書に示す安定性及び他の基準を満たさねばならない。これらの材料は基礎的且つ基本的であって安定化された気体及び気体前駆体充填小胞の形成又は確立のための主な基礎を形成することができる。他方、それらは補助的であって、基礎的安定化材料の働きを強化することができるかあるいは基礎的安定化材料により与えられる性質の他に何らかの所望の性質に寄与することができる副次的又は補足的薬剤として作用することができる。

しかし与えられた材料が基礎的薬剤であるか又は補助的薬剤であるかを決定するのは常に可能であるわけではなく、それは問題の材料の働きが、例えば安定化された小胞の形成に関して得られる結果により経験的に決定されるからである。これらの基礎的及び補助的材料がどのように働くことができるかの例として、生物適合性脂質及び水もしくは食塩水の簡単な組み合わせが震盪された場合に、滅菌のためにオートクレーブにかけられた後、濁った溶液をしばしば与えることが観察されている。そのような濁った溶液は造影剤として働くことができるが、美的に好ましくなく、非溶解又は非分散脂質粒子の形態で不安定性を与え得る。濁った溶液は、非溶解粒子状物質が約7µmより大きい、特に約10µmより大きい直径を有する場合にも望ましくないことがあり得る。無菌濾過などの製造段階も、非溶解粒子状物質を含有する溶液の場合に問題となり得る。かくしてプロピレングリコ

10

20

30

40

50

ールを加え、脂質粒子の分散又は溶解を助長することによりこの濁りを除去することができる。プロピレングリコールは湿潤剤としても働くことができ、それは小胞の膜もしくは皮上の表面張力を増すことにより、小胞形成及び安定化を促進することができる。プロピレングリコールが小胞の膜もしくは皮をコーティングし、かくして安定化を増すことができる追加の層として働くことも可能である。用いることができるそのようなさらなる基礎的又は補助的安定化材料の例として、通常の界面活性剤がある；D'Arrigo 米国特許第4,684,479及び5,215,680号を参照されたい。

さらに別の補助的及び基礎的安定化材料には、落花生油、カノーラ油、オリーブ油、紅花油、コーン油又は本明細書の記載に従って安定化化合物として用いるのに適している摂取可能であることが普通に既知の他の油などの薬剤が含まれる。種々の補助的及び基礎的安定化材料が例えば1995年5月19日出願の米国特許出願番号08/444,574に開示されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

さらに、混合ミセル系の形成に用いられる化合物は基礎的又は補助的安定化材料として用いるのに適していることができ、それらには例えば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-)、ミリ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リド(ここでアルキルはC<sub>12</sub>、C<sub>14</sub>又はC<sub>16</sub>である)、ベンジルジメチルドデシルアンモニウムブロミド/クロリド、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムブロミド/クロリド、ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムブロミド/クロリド、セチルジメチルエチルアンモニウムブロミド/クロリド又はセチルピリジニウムブロミド/クロリドが含まれる。

本明細書に記載する種々の追加的もしくは補助的安定化材料の中から選ぶことにより、本発明で用いられる気体及び気体前駆体充填小胞を寸法、溶解度及び熱安定性に従って制御することも見いだされた。これらの材料は小胞、特に脂質から調製される小胞のこれらのパラメーターに、膜とのその物理的相互作用のよってのみでなく、粘度ならびに気体及び気体前駆体充填小胞の表面の表面張力を変更するその能力によっても影響することができる。従って本発明で用いられる気体及び気体前駆体充填小胞を好ましくは、例えば1種もしくはそれ以上の多様な(a)例えば炭水化物ならびにそのホスホリル化及びスルホン化誘導体；好ましくは400~100,000の分子量範囲を有するポリエーテル；ならびに好ましくは200~50,000の分子量範囲を有するジ-及びトリヒドロキシアルカンならびにそのポリマーを含む粘度調整剤；(b)例えばアラビアゴム、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-及びジ-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(poloxamer)、例えばポロキサマー188、ポロキサマー184及びポロキサマー181、ポリオキシエチレン50ステアレート、ポリオキシシル35ヒマシ油、ポリオキシシル10オレイルエーテル、ポリオキシシル20セトステアリルエーテル、ポリオキシシル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、ソルピタンモノ-ラウレート、ソルピタンモノ-オレート、ソルピタンモノ-パルミテート、ソルピタンモノステアレート、ステアリン酸、トロールアミン及び乳化ワックスを含む乳化剤及び/又は可溶化剤；(c)例えばアラビアゴム、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934P、カルボキシメチルセルロース、カルシウム及びナトリウム及びナトリウム12、カラゲナン、セルロース、デキストラン、ゼラチン、グアゴム、いなご豆ゴム(locust bean gum)、ヴィーゴム(vie gum)、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、マグネシウム-アルミニウム-シリケート、Zeolites<sup>R</sup>、メチルセルロース、ペクチン、ポリエチレンオキシド、ポビドン、プロピレングリコールアルギネート、二酸化ケイ素、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、キサンタンゴム、d-グルコノラクトン、グリセロール及びマンニトールを含む懸濁剤及び/又は粘度上昇剤；(

d) ポリエチレングリコール ( P E G )、ポリビニルピロリドン ( P V P )、ポリビニルアルコール ( P V A )、ポリプロピレングリコール ( P P G ) 及びポリソルベートなどの合成懸濁剤；ならびに ( e ) 例えばソルビトール、マンニトール、トレハロース、スクロース、プロピレングリコール及びグリセロールを含む、安定化し且つ張度を増す張度上昇剤の添加により改質し、さらに安定化することができる。

上記で議論した通り、気体及び/又は気体前駆体充填小胞を含む本発明の組成物は、例えば超音波 ( U S ) 画像法、C T 血管造影 ( C T A ) 画像法を含むコンピューター連動断層撮影 ( C T ) 画像法、磁気共鳴 ( M R ) 画像法、磁気共鳴血管造影法 ( M R A )、核医学、光学的画像法及びエラストグラフィ ( e l a s t o g r a p h y ) を含む画像診断法のための造影剤として有用である。

本発明の磁気共鳴画像法を行う場合、造影剤を単独であるいは他の診断薬、治療薬又は他の薬剤と組み合わせて用いることができる。そのような他の薬剤には風味料又は着色材料などの賦形剤が含まれる。用いられる磁気共鳴画像法は通常行われており、例えば D . M . K e a n a n d M . A . S m i t h , M a g n e t i c R e s o n a n c e I m a g i n g : P r i n c i p l e s a n d A p p l i c a t i o n s , ( W i l l i a m a n d W i l k i n s , B a l t i m o r e 1 9 8 6 ) に記載されている。意図されている M R I 法には核磁気共鳴 ( N M R ) 及び電子スピン共鳴 ( E S R ) が含まれるがこれらに限られるわけではない。好ましい造影様式は N M R である。

本組成物において用いるのに適した代表的常磁性造影剤には例えば安定なラジカル、例えば安定なニトロキシド類ならびに遷移元素、ランタニド元素及びアクチニド元素を含有する化合物が含まれ、それらの元素は必要なら塩の形態であることができるかあるいは親油性誘導体を含む錯体化剤又はタンパク質性巨大分子に共有結合又は非共有結合していることができる。

好ましい遷移元素、ランタニド元素及びアクチニド元素には例えば G d ( I I I )、M n ( I I )、C u ( I I )、C r ( I I I )、F e ( I I )、F e ( I I I )、C o ( I I )、E r ( I I )、N i ( I I )、E u ( I I I ) 及び D y ( I I I ) が含まれる。より好ましくは元素は G d ( I I I )、M n ( I I )、C u ( I I )、F e ( I I )、F e ( I I I )、E u ( I I I ) 及び D y ( I I I )、特に M n ( I I ) 及び G d ( I I I ) であることができる。

前記の元素は、必要なら塩の形態であることができ、それには無機塩、例えばマンガン塩、例えば塩化マンガン、炭酸マンガン、酢酸マンガンならびに有機塩、例えばグルコン酸マンガン及びマンガンヒドロキシアパタイトが含まれる。他の代表的塩には鉄の塩、例えば硫化鉄及び塩化第 2 鉄などの第 2 鉄塩が含まれる。

これらの元素は必要なら共有的もしくは非共有的会合を介して、例えば親油性誘導体を含む錯体化剤又はタンパク質性巨大分子に結合していることもできる。好ましい錯体化剤には例えばジエチレントリアミン五酢酸 ( D T P A )、エチレンジアミン四酢酸 ( E D T A )、1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'', N''' - テトラ酢酸 ( D O T A )、1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'' - トリ酢酸 ( D O T A )、3, 6, 9 - トリアザ - 12 - オキサ - 3, 6, 9 - トリカルボニルメチレン - 10 - カルボキシ - 13 - フェニル - トリデカン酸 ( B - 19036 )、ヒドロキシベンジルエチレンジアミン二酢酸 ( H B E D )、N, N' - ビス ( ピリドキシル - 5 - ホスフェート ) エチレンジアミン、N, N' - ジアセテート ( D P D P )、1, 4, 7 - トリアザシクロノナン - N, N', N'' - 三酢酸 ( N O T A )、1, 4, 8, 11 - テトラアザシクロテトラデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸 ( T E T A )、クリプタンド ( 大環状錯体 ) 及びデスフェリオキサミンが含まれる。さらに好ましくは、錯体化剤は E D T A、D T P A、D O T A、D O 3 A 及びクリプタンドであり、最も好ましくは D T P A である。好ましい親油性錯体には錯体化剤 E D T A、D O T A のアルキル化誘導体、例えば N, N' - ビス - ( カルボキシデシルアミドメチル - N - 2, 3 - ジヒドロキシプロピル ) - エチレンジアミン - N, N' - ジアセテート ( E D T A - D D P ) ; N, N' - ビス - ( カルボキシオクタデシルアミド - メチル - N - 2, 3 - ジヒドロキシプロ

10

20

30

40

50

ピル) - エチレンジアミン - N, N' - ジアセテート (EDTA - ODP) ; N, N' -  
 ビス (カルボキシ - ラウリルアミドメチル - N - 2, 3 - ジヒドロキシプロピル) エチレ  
 ンジアミン - N, N' - ジアセテート (EDTA - LDP) ; などが含まれ、米国特許第  
 5, 312, 617号に記載されているものを含み、その開示は引用することによりその  
 全体が本明細書の内容となる。好ましいタンパク質性巨大分子には例えばアルブミン、コ  
 ラーゲン、ポリアルギニン、ポリリシン、ポリヒスチジン、  
 - グロブリン及び - グロ  
 ブリンが含まれ、アルブミン、ポリアルギニン、ポリリシン及びポリヒスチジンがより好  
 ましい。

従って適した錯体は  $Mn(II) - DTPA$ 、 $Mn(II) - EDTA$ 、 $Mn(II) -$   
 $DOTA$ 、 $Mn(II) - DO3A$ 、 $Mn(II) -$  クリプタンド、 $Gd(III) - D$   
 $TPA$ 、 $Gd(III) - DOTA$ 、 $Gd(III) - DO3A$ 、 $Gd(III) -$  クリ  
 プタンド、 $Cr(III) - EDTA$ 、 $Cu(II) - EDTA$  又は鉄 - デスフェリオキ  
 サミン、特に  $Mn(II) - DTPA$  又は  $Gd(III) - DTPA$  を含む。

ニトロキシド類は、ニトロキシド分子内に不対電子があるためにMRIにおいてT1及び  
 T2緩和速度の両方を増加させる常磁性造影剤である。当該技術分野における通常の熟練  
 者に既知の通り、MRI造影剤としてのある化合物の常磁性効率はいくとも部分的に常  
 磁性核もしくは分子中の不対電子の数、特に不対電子の数の平方に関連し得る。例えばガ  
 ドリニウムは7個の不対電子を有するが、ニトロキシド分子は1個の不対電子を有する。  
 かくしてガドリニウムは一般にニトロキシドよりずっと強いMRI造影剤である。しかし  
 造影剤の効率を評価するための他の重要なパラメーターである有効相関時間 (effective correlation time) はニトロキシドに有力な緩和性の向上を  
 与える。例えば常磁性造影剤を大分子に結合することによりタンブラリング速度 (tumbling rate) を遅くすると、それはもっとゆっくりタンブラリングし、それにより  
 もっと有効に水のプロトンのハステン緩和 (hasten relaxation) にエ  
 ネルギーを移動させるであろう。しかしガドリニウムの場合、電子スピン緩和時間は速く  
 、遅い回転相関時間が緩和性を向上させる程度を制限するであろう。しかしニトロキシド  
 の場合は電子スピン相関時間がもっと好ましく、これらの分子の回転相関時間を遅くする  
 ことにより緩和性における非常に大きな向上を得ることができる。本発明の気体充填小胞  
 は、回転相関時間を遅くし、その結果として緩和性を向上させるという目的を達成するた  
 めに理想的である。いずれの特定の作用理論に縛られるつもりもないが、例えばそのアル  
 キル誘導体を製造することにより、ニトロキシドを小胞の周囲をコーティングするように  
 設計することができるので、得られる相関時間を最適化することができると思われる。さ  
 らに、得られる本発明の造影剤は、緩和性を最大にする幾何学的配置である磁性球と見な  
 すことができる。

必要ならニトロキシドをアルキル化するか又はニトロキシド2, 2, 5, 5 - テトラメチ  
 ル - 1 - ピロリジニルオキシ、ラジカル及び2, 2, 6, 6 - テトラメチル - 1 - ピペリ  
 ジニルオキシ、ラジカル (TMPO) などのように他の方法で誘導化することができる。  
 本発明の組成物において用いるのに適した代表的超常磁性造影剤には、磁区を経験する (experi  
 ence) 金属酸化物及び硫化物、フェロ - もしくはフェリ磁性化合物、例  
 えば純粋な鉄、磁性酸化鉄、例えばマグネタイト、  
 -  $Fe_2O_3$ 、 $Fe_3O_4$ 、亜鉄酸マン  
 ガン、亜鉄酸コバルト及び亜鉄酸ニッケルが含まれる。常磁性の気体、例えば酸素17ガ  
 ス ( $^{17}O_2$ ) も本組成物において用いることができる。さらに、超分極キセノン、ネオン  
 又はヘリウムガスも用いることができる。次いでMR全身画像法を用い、例えば血栓症に  
 関して体を迅速に検査することができ、必要なら血栓崩壊を助けるために超音波を適用す  
 ることができる。

上記の常磁性及び超常磁性造影剤などの造影剤は脂質、タンパク質、ポリマー及び/又は  
 小胞組成物中の成分として用いることができる。小胞組成物の場合、前記の造影剤をその  
 内腔内に捕獲するか、小胞と共に溶液として投与するか、追加の安定化材料と共に導入す  
 るかあるいは小胞の表面もしくは膜上にコーティングすることができる。

必要なら、常磁性又は超常磁性薬剤を組成物中、特に小胞の脂質性の壁内に導入されるア

10

20

30

40

50

ルキル化誘導体又は他の誘導体として送達することができる。特にニトロキシド 2, 2, 5, 5 - テトラメチル - 1 - ピロリドニルオキシ、ラジカル及び 2, 2, 6, 6 - テトラメチル - 1 - ピペリジニルオキシ、ラジカルはメチル基により占有されていない環の位置において、例えばアセチルオキシ結合を含む多様な結合を介して長鎖脂肪酸と付加物を形成することができる。そのような付加物は本発明の脂質及び / 又は小胞組成物中に非常に導入し易い。

本組成物におけるいずれの 1 つ又はそれ以上の常磁性薬剤及び / 又は超常磁性薬剤の混合物も用いることができる。常磁性及び超常磁性薬剤を、必要なら別々に共投与することもできる。

本発明の脂質、タンパク質、ポリマー及び / 又は小胞組成物そして特に小胞組成物は、上記の超常磁性薬剤の有効な担体として働くことができるのみでなく、造影剤の磁化率の効果を向上させることができる。超常磁性造影剤は金属酸化物、特に酸化マンガンを含むのみの酸化鉄ならびに磁区を経験する種々の量のマンガン、コバルト及びニッケルを含有する酸化鉄を含む。これらの薬剤はナノもしくはミクロ粒子であり、非常に高いバルク磁化率及び緩和速度を有する。約 100 nm の直径を有する粒子を例とする比較的大きな粒子は R1 緩和性と比較してずっと高い R2 緩和性を有する。約 10 ~ 約 15 nm の直径を有する粒子を例とする比較的小さい粒子はいくらか低い R2 緩和性を有するが、もっとずっと均衡がとれた R1 及び R2 値を有する。もっとずっと小さい粒子、例えば約 3 ~ 約 5 nm の直径を有する単結晶性酸化鉄粒子はもっと低い R2 緩和性を有するが、おそらく最も均衡がとれた R1 及び R2 緩和速度を有する。非常に高い緩和速度の超常磁性鉄の芯を封入するために、フェリチンを調製することもできる。脂質及び / 又は小胞組成物、特に気体充填小胞を含む小胞組成物は、これらの通常の酸化鉄に基づく MRI 造影剤の効率及び安全性を向上させ得ることが見いだされた。

酸化鉄は簡単に脂質及び / 又は小胞組成物中に導入することができる。好ましくは、脂質から調製される小胞の場合、酸化鉄を例えば小胞の表面上に吸着させることにより小胞の壁内に導入することができるかあるいはその開孔全体が引用されることにより本明細書の内容となる米国特許第 5, 088, 499 号に記載されている通り、小胞の内部に捕獲することができる。

いずれの特定の作用理論に縛られるつもりもないが、本発明の組成物そして特に小胞組成物はいくつかの機構によって超常磁性造影剤の効率を向上させると思われる。第 1 に、小胞は酸化鉄粒子の見掛けの磁気濃度を向上させるように働くと思われる。又、小胞は常磁性及び超常磁性薬剤を含む MRI 造影剤の見掛けの回転相関時間を増加させ、緩和速度を向上させると思われる。さらに、小胞は下記に記載するやり方に従って造影剤の見掛けの磁区を増加させるようである。

本発明のある種の小胞そして特に脂質から調製される小胞は、例えば造影剤あるいは例えば血管内注射又は他の体の部位内への注射の場合は血液もしくは他の体液の水性懸濁液を含む懸濁媒体からの種々の磁化率の柔軟性球状磁区とみなすことができる。フェライト又は酸化鉄粒子の場合、これらの薬剤により与えられるコントラストは粒度に依存することに注意しなければならない。この現象は非常に普通であり、多くの場合に水分子の「セキュラー (secular)」緩和と呼ばれる。もっと物理的な用語で記載すると、この緩和機構は常磁性原子もしくは常磁性分子が存在し得る分子錯体の有効寸法に依存する。1 つの物理的説明を以下の Solomon - Bloembergen 式において記載することができ、それは常磁性寄与を、常磁性イオンにより摂動を受ける磁気回転比  $g$  を有するスピン  $1/2$  核の  $T_1$  及び  $T_2$  緩和時間の関数として定義している：

10

20

30

40

$$1/T_1M = (2/15) S(S+1) \gamma^2 g^2 \beta^2 / r^6 [3\tau_c / (1 + \omega_1^2 \tau_c^2) + 7\tau_c / (1 + \omega_2^2 \tau_c^2)] + (2/3) S(S+1) A^2 / h^2 [\tau_c / (1 + \omega_2^2 \tau_c^2)]$$

及び

$$1/T_2M = (1/15) S(S+1) \gamma^2 g^2 \beta^2 / h^6 [4\tau_c + 3\tau_c / (1 + \omega_1^2 \tau_c^2) + 13\tau_c / (1 + \omega_2^2 \tau_c^2)] + (1/3) S(S+1) A^2 / h^2 [\tau_c / (1 + \omega_2^2 \tau_c^2)]$$

式中：

S は電子スピン量子数であり；

g は電子的 g 因子であり；

はボーア磁子であり；

I 及び  $(657W_1)$  は核スピン及び電子スピンに関するラーモア角歳差運動振動数であり；

r はイオン - 核距離であり；

A は超微細結合定数であり；

$\tau_c$  及び  $\tau_c$  はそれぞれ双極子及びスカラー相互作用に関する相関時間であり；

h はプランク定数である。

例えば Solomon, I. Phys. Rev. Vol. 99, p. 559 (1955) 及び Bloembergen, N. J. Chem. Phys. Vol. 27, pp. 572, 595 (1957) を参照されたい。

いくつかの大粒子はそれより多数のもっとずっと小さい粒子よりずっと大きな効果を有し得、それは主により大きな相関時間のためである。しかし酸化鉄粒子を非常に大きくしようとすると、毒性の増加が生じ得、肺に塞栓が形成され得るか又は補体カスケードシステムが活性化され得る。さらに、粒子の合計寸法はその端又は外面における粒子の直径程重要ではないと思われる。磁区又は磁化率効果は粒子の表面から指数関数的に低下する。一般に双極子（空間を介する）緩和機構の場合、この指数関数的低下は常磁性双極子 - 双極子相互作用に関する  $r^6$  依存性を示す。文字通りに解釈すると、常磁性表面から 4 オングストローム離れた水分子は、同じ常磁性表面から 2 オングストローム離れた水分子より 64 倍低い影響を受けるであろう。コントラスト効果を最大にする点での理想的状況は、酸化鉄粒子を中空、柔軟性且つ可能な限り大きくすることである。今までこれを達成することは不可能であり、利益も今まで認識されていなかったと思われる。小胞の内面又は外面に造影剤をコーティングすることにより、個々の造影剤、例えば酸化鉄ナノ粒子又は常磁性イオンが比較的小さい構造であっても、造影剤の効率を非常に向上させることができる。そうすることにおいて、造影剤は有効にもっとずっと大きな球として働くことができ、この場合有効磁区は小胞の直径により決定され、小胞の表面において最大である。これらの薬剤は柔軟性、すなわちコンプライアンスという利点を与える。剛い小胞は肺又は他の臓器で留まり、毒性反応を引き起こし得るが、これらの柔軟性小胞は毛細血管をもっとずっと容易に滑り通る。

上記の柔軟性小胞と対照的に、ある状況では、例えばポリメチルメタクリレートを含むポリマー材料などの実質的に不透過性の材料から小胞を調製するのが望ましいことがあり得る。これは一般に実質的に不透過性であることができ、比較的に非弾性の脆い小胞の形成を生ずるであろう。画像診断法、例えば超音波を含む実施態様の場合、そのような脆い小胞を含む造影剤は一般に、柔軟性小胞が与えることができる所望の反射能を与えない。しかし超音波への出力を上げることにより、脆い小胞を破裂させ、それにより超音波変換器により検出することができる音響を発生させることができる。

核医学画像法 (NMI) も本発明の診断的及び治療的方法の側面と関連して用いることができる。例えば NMI を用い、Xe<sup>133</sup> などの放射性気体を検出することができ、それは上記の気体の他に又はその代わりに本組成物中に導入することができる。そのような放射性気体は、例えば血栓症の検出において用いるために小胞内に捕獲することができる。好

10

20

30

40

50

ましくは2官能基性キレート誘導体を小胞の壁内に導入し、得られる小胞をNM I及び超音波の両方に用いることができる。この場合、高エネルギーで高品質の核医学造影同位体、例えばテクネチウム<sup>99m</sup>又はインジウム<sup>111</sup>を小胞の壁に導入することができる。次いで全身ガンマ走査カメラを用い、生体内における小胞吸収の部位を迅速に定位することができる。超音波は一般に核医学法と比較して向上した解像度を与えるので、必要なら超音波も用いて、例えば血管内の血餅の存在を確認することができる。NM Iを用いて患者の全身を検査し、血管血栓症の区域を検出することもでき、小胞の破裂を促進し、血餅を処置するために超音波をこれらの区域に局部的に適用することができる。

上記の通り、コンピューター連動断層撮影(CT)画像法と関連して本組成物を用いることもできる。CTは種々の欠点に悩まされており、一般に上記で議論した診断法と比較して効率が低い。それにもかかわらず十分に高い濃度の本造影剤そして特に気体充填小胞組成物が問題の部位、例えば血餅に送達されれば、血餅の全体的密度の低下のために、CT画像上で血餅を検出することができる。一般に1%の約1/10かそれより高い濃度の気体充填小胞(体積に基づき)が、CTにより検出されるべき前記の血餅を含む問題の部位に送達されることが必要であり得る。

又、光学的画像法のために、光学的に活性な気体、例えばアルゴン又はネオンを本組成物中に導入することができる。さらに光学的に活性な材料、例えばポルフィリン誘導体を含む蛍光材料を用いることもできる。エラストグラフィは、1MHzより高い過剰周波数(over frequencies)を含み得る超音波と比較して、一般に約60KHzというもっとずっと低い周波数の音を用いる画像法である。エラストグラフィの場合、一般に音波エネルギーを組織に適用し、次いで組織の弾性を測定することができる。本明細書に記載する脂質に基づく小胞は好ましくは高度に弾性であり、それは、それが向けられた(directed)組織の局部的弾性を向上させることができる。この向上した弾性を次いでエラストグラフィを用いて検出することができる。必要ならエラストグラフィをMRI及び超音波などの他の画像法と一緒に用いることができる。

脂質、タンパク質、ポリマー及び/又は小胞組成物、例えばミセル及び/又はリボソームの調製のために多様な方法を利用できる。これらの方法の中に含まれるのは、例えば震盪、乾燥、気体-滴下、噴霧乾燥などである。脂質からの小胞組成物の調製のための適した方法は、例えばUnger et al., 米国特許第5,469,854号に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。上記の通り、小胞は好ましくはゲル状態のままである脂質から調製される。

ミセル組成物の調製に特定の言及して、以下の議論を示す。ミセルは当該技術分野における熟練者に明らかであろう多様な通常ミセル調製法のいずれの1つを用いても調製することができる。これらの方法は典型的に、1種もしくはそれ以上の脂質化合物を有機溶媒中に懸濁させ、溶媒を蒸発させ、水性媒体中に再懸濁させ、音波処理し、遠心することを含む。前記の方法ならびに他の方法は、例えばCanfield et al., Methods in Enzymology, Vol. 189, pp. 418-422 (1990); El Gorab et al., Biochem. Biophys. Acta, Vol. 306, pp. 58-66 (1973); Colloidal Surfactant, Shinoda, K., Nakagana, Tamamushi and Isajura, Academic Press, NY (1963) (特に“The Formation of Micelles”, Shinoda, Chapter 1, pp. 1-88); Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems, Fendler and Fendler, Academic Press, NY (1975)において議論されている。前記の出版物のそれぞれの開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

上記の通り、小胞組成物はリボソームを含んでいることができる。リボソーム組成物の調製と関連して多様な方法を利用できる。従って当該技術分野における熟練者に明らかであろう多様な通常のリボソーム調製法のいずれの1つを用いてもリボソームを調製することができる。これらの方法には、例えば溶媒透析、フレンチプレス、押し出し(凍結-解凍

10

20

30

40

50



を用いて又は用いずに)、逆相蒸発、単純な凍結 - 解凍、音波処理、キレート透析、ホモジナイゼーション、溶媒温浸法、微細乳化、自然生成、溶媒蒸発、溶媒透析、フレンチプレッシャー細胞法 (French pressure cell technique)、調節洗剤透析 (controlled detergent dialysis) 及び他が含まれ、それぞれ種々の様式における小胞の調製を含んでいる。例えば Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990, 53, 37 - 46 を参照されたく、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。適した凍結 - 解凍法は例えば 1989 年 11 月 8 日出願の国際特許出願番号 PCT/US 89/05040 に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。凍結 - 解凍法を含む方法はリボソームの調製と関連して好ましい。リボソームの調製は、食塩水溶液、リン酸塩緩衝水溶液又は無菌水などの溶液で行うことができる。震盪又は渦動を含む種々の方法によってもリボソームを調製することができる。これは、例えば機械的震盪装置、例えば Wig - L - Bug™ (Crescent Dental, Lyons, IL)、Mixomat (Degussa AG, Frankfurt, Germany)、Capmix (Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GmbH & Co., Seefeld, Oberay Germany)、Silamat Plus (Vivadent, Liechtenstein) 又は Vibros (Quayle Dental, Sussex, England) を用いることにより行うことができる。通常の微細乳化装置、例えば Microfluidizer™ (Microfluidics, Woburn, MA) も用いることができる。

気体 - 充填小胞の調製のために噴霧乾燥を用いることもできる。この方法を用い、脂質を水性環境下で予備混合し、次いで噴霧乾燥して気体 - 充填小胞を作ることができる。小胞を所望の気体のヘッドスペース下で保存することができる。

小胞組成物の調製に用いるために適応させることができる多くのリボソーム調製法が、例えば米国特許第 4,728,578 号; 英国特許 GB 2193095 A; 米国特許第 4,728,575 号; 米国特許第 4,737,323 号; 国際特許出願番号 PCT/US 85/01161; Mayer et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 858, pp. 161 - 168 (1986); Hope et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 812, pp. 55 - 65 (1985); 米国特許第 4,533,254 号; Mayhew et al., Methods in Enzymology, Vol. 149, pp. 64 - 77 (1987); Mayhew et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 755, pp. 169 - 74 (1984); Cheng et al. Investigative Radiology, Vol. 22, pp. 47 - 55 (1987); 国際特許出願番号 PCT/US 89/05040; 米国特許第 4,162,282 号; 米国特許第 4,310,505 号; 米国特許第 4,921,706 号; ならびに Liposome Technology, Gregoriadis, G., ed., Vol. I, pp. 29 - 31, 51 - 67 及び 79 - 108 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1984) において議論されており、それらのそれぞれの開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

気体を含む脂質組成物は、必要なら安定化材料を含有する水溶液を気体の存在下で攪拌することにより調製することができる。本明細書で用いられる場合、「攪拌」という用語は、気体を局部的周囲環境から水溶液中に導入することができるように水溶液を震盪するいずれの動きも意味する。この攪拌は好ましくは脂質のゲルから液晶への相転移温度より低い温度で行われる。溶液の攪拌に含まれる震盪は、好ましくは小胞組成物そして特に気体充填小胞を含有する小胞組成物を含む脂質組成物を生成させるのに十分な力の震盪である。震盪は渦巻き、例えば渦動によるか、左右 (side-to-side) 又は上下の動きによることができる。種々の型の動きを組み合わせることができる。又、脂質水溶液を

10

20

30

40

50

保持している容器を震盪させることによって又は容器自身を震盪させずに容器内の水溶液を震盪させることによって震盪を行うことができる。

震盪は手動で又は機械によって行うことができる。用いることができる機械的震盪機には、例えば VWR Scientific (Cerritos, CA) 震盪台などの震盪台ならびに前記の震盪装置のいずれも含まれ、Capmix (Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GmbH & Co., Seefeld, Oberay Germany) が好ましい。ある様式の震盪もしくは渦動を用いて好ましい寸法範囲内の小胞を調製できることが見いだされた。震盪が好ましく、Espe Capmix 機械的震盪機を用いて震盪を行うのが好ましい。この好ましい方法に従うと、脂質組成物そして特に小胞組成物の生成に往復運動を用いるのが好ましい。動きが弧の形の往復であるのがさらにもっと好ましい。往復の速度及びその弧が小胞の形成と関連して特に重要であると思われる。好ましくは、往復又は全サイクル振動 (full cycle oscillations) の数は 1 分当たり約 1000 ~ 約 20,000 であることができる。より好ましくは、往復又は振動の数は 1 分当たり約 2500 ~ 約 8000 であることができ、1 分当たり約 3300 ~ 約 5000 回の往復もしくは振動がさらにもっと好ましい。もちろん振動の数は攪拌されている内容物の質量に依存し得る。一般に、より大きい質量は必要とする振動が少なくても良い。震盪を与えるための他の手段には、高速又は高圧下で発射される気体の作用が含まれる。

好ましくは水溶液の容積がより大きいと、力の合計量是对应して増加し得ることも理解されるであろう。激しい攪拌は 1 分当たり少なくとも約 60 回の震盪の動きとして定義され、それが好ましい。1 分当たり約 60 ~ 約 300 回転の渦動がより好ましい。1 分当たり約 300 ~ 約 1800 回転の渦動がさらにもっと好ましい。

上記の単純な震盪法の他に、もっと凝った方法を用いることもできる。そのような凝った方法には、例えば液晶震盪気体注入法及び真空乾燥気体注入法が含まれ、それらは 1993 年 6 月 11 日出願の同時係属米国出願番号 08/076,250 に記載されているようなものであり、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。複数の異なる方法のいずれを用いることもできるが、本発明で用いられる小胞組成物は好ましくは震盪法を用いて調製される。好ましくは震盪法は、例えばその開示全体が引用することにより本明細書の内容となる 1993 年 11 月 30 日出願の同時係属米国出願番号 160,232 に開示されている方法を用い、機械的震盪装置、例えば Espe Capmix (Seefeld, Oberay Germany) を用いる攪拌を含む。

必要なら、例えば微細乳化、渦動、押し出し、濾過、音波処理、ホモジナイゼーション、凍結解凍サイクルの繰り返し、限定された寸法の孔を介する圧力下の押し出し及び類似の方法を含む多様な方法により、気体充填小胞の寸法を調整することができる。本明細書に記載する方法に従って調製される気体充填小胞は、寸法が約 1  $\mu\text{m}$  未満 ~ 約 100  $\mu\text{m}$  より大きい範囲であることができる。さらに、下記で詳細に議論する押し出し及び滅菌法の後、攪拌又は震盪により、溶液の残りに残留無水脂質相を実質的に含有しないか又は最少量で含有し得る小胞組成物を得ることができる (Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C., J. Mol. Biol. Vol. 13, pp. 238 - 252 (1965)). 望ましいなら小胞を、その寸法をさらに変更しようとせずに、それが形成されたままで用いることができる。血管内用途の場合、小胞は好ましくは約 30  $\mu\text{m}$  未満、より好ましくは約 12  $\mu\text{m}$  未満の直径を有する。例えば癌組織などのある組織への結合を含む標的化血管内用途の場合、小胞は有意にもっと小さく、例えば直径が約 100 nm 未満であることができる。腸又は胃腸用途の場合、小胞は有意にもっと大きく、例えば最高ミリメートルの寸法であることができる。好ましくは、小胞を約 2  $\mu\text{m}$  ~ 約 100  $\mu\text{m}$  の直径を有する寸法とすることができる。

フィルターを介する押し出しという簡単な方法により気体充填小胞の寸法を与えることができ、この方法ではフィルターの孔径が得られる気体充填小胞の寸法分布を制御する。2 つ又はそれより多いカスケード化された又は積み重ねられたフィルターの組、例えば 10  $\mu\text{m}$  フィルターの次に 8  $\mu\text{m}$  フィルターを用いることにより、7 ~ 9  $\mu\text{m}$  近辺の非常に狭

い寸法分布を有するように気体充填小胞を選択することができる。濾過の後、これらの気体充填小胞は24時間以上安定なままであることができる。

例えば使用前に無菌のバイアルから組成物を取り出す場合にフィルターアセンブリを用いることによって寸法設定 (sizing) 又は濾過段階を行うことができるかあるいはより好ましくは使用の間、フィルターアセンブリをシリンジ中に挿入していることができる。その場合、小胞の寸法設定の方法は、胴 (barrel)、少なくとも1つのフィルター及び針を含むシリンジの使用を含み；胴と針の間でシリンジに取り付けられたフィルターを介して小胞を胴から押し出し、それにより患者に投与する前に小胞の寸法設定をすることを含む抽出の段階により行うことができる。抽出の段階は小胞をシリンジ中に吸引することを含むこともでき、そこでフィルターが同じ様に働き、シリンジ中に入る時に小胞の寸法設定をすることができる。他の代替の方法は、他の何らかの方法によりすでに寸法設定された小胞をそのようなシリンジに満たすことであり、その場合フィルターは、所望の寸法範囲内又は所望の最大寸法の小胞のみが、その後シリンジからの押し出しによって投与されることを保証するように働くことができる。

ある好ましい実施態様の場合、震盪の前に小胞組成物を熱滅菌するか又はフィルター滅菌し、フィルターを介して押し出すことができる。一般に気体を含む小胞組成物は熱滅菌することができ、気体前駆体を含む小胞組成物はフィルター滅菌することができる。気体充填小胞を形成したら、それを寸法設定のために上記の通りに濾過することができる。気体及び気体前駆体充填小胞の形成の前にこれらの段階を行うことは、患者に投与する準備ができていない無菌気体充填小胞を与える。例えばバイアル又はシリンジなどの混合容器に濾過された脂質及び/又は小胞組成物を満たし、例えばオートクレーブにかけることにより組成物を混合容器内で滅菌することができる。気体を組成物中に注入し、無菌容器を震盪させることにより気体充填小胞を形成することができる。好ましくは無菌容器には、気体充填小胞が患者と接触する前にフィルターを通過するような位置に置かれたフィルターが備えられている。

脂質化合物の溶液をフィルターを介して押し出す段階は、乾燥材料を破壊し、水和のためにより大きな表面積をさらすことにより、非水和材料の量を減少させる。好ましくはフィルターは約0.1~約5  $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約0.1~約4  $\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは約0.1~約2  $\mu\text{m}$ そしてさらにもっと好ましくは約1  $\mu\text{m}$ の孔径を有する。一般に望ましくない非水和化合物は不均一な寸法の非晶質の固まりとして現れる。

滅菌段階は、例えば超音波、MRI又はCTを含む画像診断法のために患者に容易に投与できる組成物を与える。ある好ましい実施態様の場合、熱滅菌により、好ましくは溶液を少なくとも約100の温度でオートクレーブにかけることにより、より好ましくは約100~約130、さらに好ましくは約110~約130、もっと好ましくは約120~約130そしてさらにもっと好ましくは約130でオートクレーブにかけることにより滅菌を行うことができる。好ましくは少なくとも約1分、より好ましくは約1~30分、さらに好ましくは約10~約20分、さらにもっと好ましくは約15分、加熱を行う。

望ましければ、上記で概略を示した押し出し及び加熱段階を逆転させるかあるいは2段階の1つのみを用いることができる。例えばガンマ線への暴露を含む他の様式の滅菌を用いることができる。

前記の実施態様の他に、例えば高められた温度、pHの変化又は光への暴露により活性化されると、例えば小胞中に捕獲されている液体を含む液体から、膨張して本明細書に記載する気体充填小胞を生む気体への相転移を行うことができる、小胞中に含有される気体前駆体を調製することができる。この方法は1993年11月30日出願の同時係属特許出願番号08/160,232及び1993年11月30日出願の08/159,687に詳細に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

気体前駆体の活性化の好ましい方法は、高められた温度への暴露による方法である。活性化もしくは転移温度及び類似の用語は気体前駆体の沸点を言い、気体前駆体の液相から気

相への転移が起こる温度である。有用な気体前駆体は約 - 100 ~ 約 70 の範囲内に沸点を有する材料である。活性化温度はそれぞれの気体前駆体に特有である。約 37 又は大体人間の体温という活性化温度が本発明の範囲内の気体前駆体のために好ましい。かくして好ましい形態では、液体の気体前駆体が約 37 又はそれ未満において活性化されて気体となる。気体前駆体は、本発明の方法で用いるために液相又は気相であることができる。

気体前駆体充填小胞の調製の方法を、気体前駆体の沸点未満の温度で行い、液体が例えば小胞中に導入されるようにすることができる。さらに該方法を気体前駆体の沸点で行い、気体が例えば小胞中に導入されるようにすることができる。低い沸点を有する気体前駆体の場合、液体状前駆体を低温に冷却された微小流動化装置を用いて乳化することができる。液体の形態で前駆体を用いるために、液体媒体中の溶媒を用いて沸点を下げることもできる。さらに、プロセスを通じて温度を上昇させ、それにより液体としての気体前駆体でプロセスを開始し、気体で終了する方法を行うことができる。

標的化された組織もしくは液においてその場で、患者もしくは動物に入ると生体内で、使用前に、保存の間に又は製造の間に気体を発生するように気体前駆体を選ぶことができる。温度 - 活性化気体前駆体充填小胞の製造法を、気体前駆体の沸点未満の温度で行うことができる。この実施態様では、気体前駆体を小胞内に捕獲し、製造の間に相転移が起こらないようにすることができる。転移を起こさず、気体前駆体の液相において気体前駆体充填小胞を製造する。相転移の活性化は、温度が前駆体の沸点を越えることが許されるいずれの時点にも行うことができる。又、液体状気体前駆体の滴中における液体の量がわかると、気体状態になる時の小胞の寸法を決定することができる。

別の場合、気体前駆体を用い、使用前に予備形成される安定な気体充填小胞を作ることができる。この実施態様の場合、それぞれの気体前駆体の液体 - 気体相転移温度より低い温度で気体前駆体を脂質組成物の入った容器に加えることができる。温度が上昇し、気体前駆体と脂質溶液の間で乳液が形成される時、気体前駆体は液体から気体状態に転移する。この加熱及び気体発生の結果として、気体は液体混合物上のヘッドスペースの空気にとって代わり、気体充填小胞を形成し、それは気体状の気体前駆体、周囲気体（例えば空気）を捕獲するか又は気体状の気体前駆体及び周囲空気を共捕獲することができる。この相転移は造影剤の最適混合及び形成のために用いることができる。例えば気体前駆体であるペルフルオロブタンを脂質小胞中に捕獲することができ、温度がペルフルオロブタンの沸点（4）を越えて上昇する時にペルフルオロブタンガスが小胞中に捕獲される。

従って生体内で気体充填小胞を形成するように気体前駆体を選ぶことができるかあるいはその場で、製造プロセスの間、保存中又は使用前のいずれかの時点に気体充填小胞を作るように気体前駆体を設計することができる。

本発明の他の実施態様として、液体状態の気体前駆体を水性乳液に予備形成することにより、気体状態への転移が行われたら、理想気体の法則を用いて小胞の最大寸法を概算することができる。気体前駆体から気体充填小胞を作る目的の場合、気相は即座に生成し、新しく形成される小胞中の気体が一般に水性である液体中への拡散のために枯渇することは実質的にないと仮定することができる。従って乳液中の既知の液体体積から、気体充填小胞の寸法の上限を予測することができる。

本発明の実施態様において、限定された寸法の液滴を含有する脂質化合物と気体前駆体の混合物を、特定の温度、例えば気体前駆体の沸点に達したら滴が膨張して限定された寸法の気体充填小胞となれるように調製することができる。理想気体の法則は一般に溶液中への気体の拡散、大気中への気体の損失及び圧力の増加の影響などの因子を説明することができないので、限定された寸法は実際の寸法への上限を示し得る。

液体から気体状態に転移すると泡になる気体の体積における増加を計算するために用いることができる理想気体の法則は、以下の通りである：

$$P V = n R T$$

式中、

P は大気の圧力であり（気圧）；

10

20

30

40

50

V はリットルにおける体積であり ( L ) ;

n は気体のモル数であり ;

T は度ケルビンにおける温度であり ( K ) ;

R は理想気体定数である ( 2 2 . 4 L - 気圧 / K - モル ) 。

液体の混合物中のその液体の体積、密度及び温度を知り、気体に変換された時に既知の体積の小胞に膨張し得る液体前駆体の例えばモルにおける量及び体積を計算することができる。算出される体積は、気体充填小胞に即座に膨張すること及び膨張の時間を通じての気体の拡散が無視し得ることを仮定し、気体充填小胞の寸法に対する上限を反映することができる。

かくして前駆体滴が球状である場合の混合物中における液体状態の前駆体の安定化のために、前駆体滴の体積は式 :

$$\text{体積 ( 球状小胞体 )} = 4 / 3 \quad r^3$$

により決定され、

式中、

r は球の半径である。

かくして体積が予測され、所望の温度における液体の密度を知り、滴における液体の気体前駆体の量を決定することができる。さらに説明的言葉では以下を適用することができる :

$$V_{\text{gas}} = 4 / 3 \quad ( r_{\text{gas}} )^3$$

理想気体の法則により、

$$P V = n R T$$

置換して、

$$V_{\text{gas}} = n R T / P_{\text{gas}}$$

あるいは

$$( A ) \quad n = 4 / 3 [ \quad r_{\text{gas}}^3 ] P / R T$$

$$\text{量 } n = 4 / 3 [ \quad r_{\text{gas}}^3 P / R T ] \cdot MW_n$$

液体の体積に逆変換して

$$( B ) \quad V_{\text{liq}} = [ 4 / 3 [ \quad r_{\text{gas}}^3 ] P / R T ] \cdot MW_n / D ]$$

ここで D は前駆体の密度である。

液滴の直径に関して解いて、

$$( C ) \quad \text{直径} / 2 = [ 3 / 4 \quad [ 4 / 3 \cdot [ \quad r_{\text{gas}}^3 ] P / R T ] MW_n / D ]^{1/3}$$

これを変形して

$$\text{直径} = 2 [ [ r_{\text{gas}}^3 ] P / R T [ MW_n / D ] ]^{1/3}。$$

本発明の方法で用いるために所望の寸法の小胞を調製するためのさらなる手段としてそして液滴の体積及び特に半径を知り、適切な寸法のフィルターを用い、気体前駆体滴の寸法を設定して適した直径の球とすることができる。

代表的気体前駆体を用い、限定された寸法、例えば直径が 1 0 μ m の小胞を形成することができる。この実施例の場合、人間の血流中で小胞を形成することができ、かくして典型的温度は 3 7 又は 3 1 0 K であろう。1 気圧の圧力で及び ( A ) の式を用いて、直径が 1 0 μ m の小胞の体積を満たすために 7 . 5 4 × 1 0 <sup>-17</sup> モルの気体前駆体が必要であり得る。

上記で計算される気体前駆体の量ならびに 7 6 . 1 1 の分子量、3 2 . 5 の沸点及び 2 0 における 0 . 7 7 8 9 g / m L の密度を有する 1 - フルオロブタンを用い、さらに計算すると、1 0 μ m の小胞のためには 5 . 7 4 × 1 0 <sup>-15</sup> グラムのこの前駆体が必要であり得ることが予測される。さらに外挿し、密度の知識を以て、式 ( B ) は 1 0 μ m の上限を有する小胞を形成するために 8 . 4 7 × 1 0 <sup>-16</sup> m L の液体の前駆体が必要であり得ることを予測する。

最後に式 ( C ) を用い、混合物、例えば 0 . 0 2 7 2 μ m の半径又は対応する 0 . 0 5 4 4 μ m の直径を有する滴を含有する乳液を形成し、1 0 μ m 小胞という上限を有する気体前駆体充填小胞を形成することができる。

この特定の寸法の乳液は適切な寸法のフィルターを用いることにより容易に得られた。さらに、限定された寸法の気体前駆体滴の形成に必要なフィルターの寸法によってわかる通り、フィルターの寸法はあり得るいずれのバクテリア性汚染物の除去にも十分であり得、従って無菌濾過としても用いることができる。

気体充填小胞の調製のためのこの実施態様は、温度により活性化されるすべての気体前駆体に適用することができる。事実、溶媒系の凝固点降下は0未満の温度で液体から気体への相転移を行い得る気体前駆体の使用を可能にする。気体前駆体の懸濁のための媒体を与えるために溶媒系を選択することができる。例えば緩衝食塩水中に混和性の20%プロピレングリコールは水のみ凝固点より十分に低い凝固点降下を示す。プロピレングリコールの量を増加させるか又は塩化ナトリウムなどの材料を加えることにより、凝固点をさらに降下させることができる。

10

適した溶媒系の選択も物理的方法によって同様に決定することができる。本明細書で溶質と呼ぶ固体もしくは液体の物質を水に基づく緩衝液などの溶媒中に溶解すると、溶液の組成に依存する量で凝固点を下げることができる。かくしてWallにより定義される通り、溶媒の凝固点降下を以下の式により表すことができる：

$$\ln x_a = \ln(1 - x_b) = -H_{fus} / R(1/T_0 - 1/T)$$

式中、

$x_a$  は溶媒のモル分率であり；

$x_b$  は溶質のモル分率であり；

$H_{fus}$  は溶媒の融解熱であり；

20

$T_0$  は溶媒の通常の凝固点である。

溶媒の通常の凝固点は式を解くことにより得ることができる。 $x_b$  が  $x_a$  に対して小さい場合、上記の式を以下のように書くことができる。

$$x_b = H_{fus} / R [T - T_0 / T_0 T] \quad H_{fus} T / R T_0^2$$

上記の式は温度の変化  $T$  が  $T_2$  と比較して小さいと仮定している。溶質の濃度をモル濃度、 $m$  (溶媒の1000グラム当たりの溶質のモル数) を用いて表すことにより、この式をさらに簡単に行うことができる。かくして該式を以下のように書くことができる。

$$X_b = m / [m + 1000 / M_a] \quad mM_a / 1000$$

ここで  $M_a$  は溶媒の分子量である。

かくして分率  $x_b$  を置換して：

30

$$T = [M_{ardi} / 1000 - H_{fus}] m$$

$$T = K_f m, \text{ ここで}$$

$$K_f = M_{ardi} / 1000 - H_{fus} \text{ である。}$$

$K_f$  はモル凝固点 (molal freezing point) であり、1気圧における水の場合、単位モル濃度当たり1.86度に等しい。上記の式を用い、気体前駆体充填小胞の溶液のモル凝固点を正確に決定することができる。従って上記の式を適用し、凝固点降下を概算し、溶媒凝固点を適した値に降下させるのに必要な液体もしくは固体溶質の適した濃度を決定することができる。

温度活性化気体前駆体充填小胞の調製の方法は以下を含む：

(a) 気体前駆体ならびに例えば安定化材料、増粘剤及び/又は分散剤を含む所望の追加の材料の水性混合物を渦動及び/又は震盪する。この方法の任意の変法は、渦動又は震盪の前にオートグレーブにかけること；気体前駆体の水性混合物を加熱すること；混合物/懸濁液を含有する容器を排気すること；気体前駆体充填小胞を震盪するか又は自然に形成させ、気体前駆体充填小胞の懸濁液を冷却すること；ならびに約0.22  $\mu m$  のフィルターを介して気体前駆体の水性懸濁液を押し出すことを含む。別の場合、小胞の生体内投与の間に濾過を行い、約0.22  $\mu m$  のフィルターを用いることができる；

40

(b) 気体前駆体の水性混合物を攪拌により乳化し、加熱して例えば患者への投与の前に小胞を形成する微細乳化；

(c) 攪拌して又はせずに混合物中の気体前駆体を加熱し、それにより比較的密度の低い気体前駆体充填小胞を膨張により溶液の上部に浮遊させ、容器内の他の小胞と置き換える

50

ことができ、容器を排気して空気を放出させる；ならびに

(d) 上記の方法のいずれかにおいて密閉された容器を用いて気体前駆体の水性懸濁液を保持し、気体前駆体の相転移温度より低い温度に懸濁液を保ち、続いて場合により震盪して又は自然に気体前駆体小胞を形成させながらオートクレーブにかけることにより温度を相転移温度より高く上げ、それにより密閉された容器内で膨張した気体前駆体が容器内の圧力を上げ、そして気体充填小胞懸濁液を冷却し、その後震盪も行う。

凍結乾燥は震盪滴下法の前に水及び有機材料を除去するのに有用であることができる。小胞から水を除去するために乾燥滴下法を用いることができる。乾燥された小胞中に気体前駆体を予備 - 捕獲することにより(すなわち乾燥の前に)、加温の後、気体前駆体が膨張して小胞を満たすことができる。小胞を真空に供した後、気体前駆体を用いて乾燥された小胞を満たすこともできる。乾燥された小胞はそのゲル状態から液晶への温度より低い温度に保たれるので、乾燥室を気体状態の気体前駆体でゆっくり満たすことができる。例えば乾燥された小胞を約 4 の温度でペルフルオロブタンを用いて満たすことができる。

温度活性化気体前駆体充填小胞の調製の好ましい方法は、脂質化合物を有する水溶液を気体前駆体の存在下で、気体前駆体の液体状態から気体状態への相転移温度より低い温度で震盪することを含む。これは好ましくは脂質のゲル状態から液晶状態への相転移温度より低い温度で行われる。次いで混合物を気体前駆体の液体状態から気体状態への相転移温度より高い温度に加熱することができ、これは前駆体を揮発させ、膨張させることができる。次いで加熱を中断し、混合物の温度を気体前駆体の液体状態から気体状態への相転移温度より下に下げることができる。加熱段階の間又は混合物を冷ました後に混合物の震盪を行うことができる。

気体前駆体充填小胞の調製のための他の方法は、例えば脂質及び気体前駆体の水溶液を震盪し、得られる気体前駆体充填小胞を分離することを含み得る。

先行技術の通常的水性 - 充填リボソームは慣例的に、それを作るのに用いられる脂質の相転移温度より高い温度で形成され、それは液晶状態においてそれがより柔軟であり、かくして生物系で有用だからである。例えば Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. 1978, 75, 4194 - 4198 を参照されたい。対照的に、本明細書に記載するある好ましい実施態様に従って作られる小胞は気体前駆体が充填されたものであり、それは気体前駆体が気体発生後に水溶液より圧縮可能であり、弾性なので、より大きな柔軟性を与える。

調製法は脂質を含む水溶液を温度活性化気体前駆体の存在下で震盪することを含み得る。好ましくは震盪は 30 分などの短時間内に、好ましくは約 20 分以内そしてより好ましくは約 10 分以内に泡が形成されるのに十分な力の震盪である。震盪は微細乳化、微細流動化、渦巻き(例えば渦動による)、左右もしくは上下の動きを含むことができる。液体状態の気体前駆体を加える場合、上記に示した震盪法の他に音波処理を用いることができる。さらに、種々の型の動きを組み合わせることができる。又、震盪は、脂質水溶液を保持している容器を震盪することによりあるいは容器自身を震盪せずに容器内の水溶液を震盪することにより行うことができる。さらに震盪は手動により又は機械により行うことができる。用いることができる機械的震盪機には例えば前記に記載した機械的震盪機が含まれ、Espe Capmix (Seefeld, Oberay Germany) が好ましい。震盪を生ずるための他の手段には高速もしくは高圧下で発射される気体前駆体の作用が含まれる。

本明細書に記載する方法に従うと、空気などの気体を局部的周囲大気により与えることもできる。局部的周囲大気は密閉容器内の雰囲気ならびに外部雰囲気を含み得る。別の場合、例えば脂質水溶液を有する容器又は脂質水溶液自身に気体を注入するか又は他の方法で加え、空気以外の気体を与えることができる。空気より軽い気体は一般に密閉容器に加え、空気より重い気体は密閉されたもしくは密閉されない容器に加えることができる。従って本発明は気体前駆体と一緒に空気及び/又は他の気体を共 - 捕獲することを含む。

従って、温度又は pH などの因子を用いて気体を発生させることができる宿主の組織に適用することにより活性化されたら、気体前駆体充填小胞を本明細書に記載する気体充填小

10

20

30

40

50

胞と実質的に同じ方法で用いることができる。気体前駆体は宿主の正常な体温近辺で液体から気体状態に相転移を行い、そのようなことによって例えば宿主の生体内温度により活性化されてその中で気相に転移するのが好ましい。これは、例えば宿主の組織が約37の正常な温度を有する人間の組織であり、気体前駆体が37近辺で液体から気体状態に相転移を行う場合に起こることができる。

上記の通り、オートクレーブ又は無菌濾過の方法が滴下段階の前又は組成物内の温度感受性気体前駆体の温度媒介変換の前に行われる場合、脂質、タンパク質、ポリマー及び/又は小胞組成物をオートクレーブ又は無菌濾過により滅菌することができる。別の場合、1種もしくはそれ以上の抗バクテリア剤及び/又は防腐剤、例えば安息香酸ナトリウム、第4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、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、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、二酸化硫黄及び有機水銀塩を組成物の調製に含めることができる。照射によるなどの他の通常的手段によっても行うことができるそのような滅菌は、例えば血管内もしくは腹腔内などの侵襲的状況下の造影に安定化小胞が用いられる場合に必要であり得る。滅菌の適した手段は本開示に基づき、熟練者に明らかであろう。

タンパク質又はポリマーから調製される小胞を含む小胞組成物は、本開示を動員したら当該技術分野における熟練者に容易に明らかになる通り、種々の方法により調製することができる。代表的な方法は、例えば界面重合、相分離及びコアセルベーション、マルチオリフィス遠心調製ならびに溶媒蒸発を含む。ポリマーから小胞を調製するために本開示に従って用いるか又は修正することができる適した方法には、Garner et al., 米国特許第4,179,546号、Garner et al., 米国特許第3,945,956号、Cohrs et al., 米国特許第4,108,806号、日本公開東京公報62-286534(Japan Kokai Tokyo Koho 62-286534)、英国特許第1,044,680号、Kenega et al., 米国特許第3,293,114号、Morehouse et al., 米国特許第3,401,475号、Walters, 米国特許第3,479,811号、Walters et al., 米国特許第3,488,714号、Morehouse et al., 米国特許第3,615,972号、Baker et al., 米国特許第4,549,892号、Sands et al., 米国特許第4,540,629号、Sands et al., 米国特許第4,421,562号、Sands, 米国特許第4,420,442号、Mathiowitz et al., 米国特許第4,898,734号、Lenc ki et al., 米国特許第4,822,534号、Herbig et al., 米国特許第3,732,172号、Himmel et al., 米国特許第3,594,326号、Sommer ville et al., 米国特許第3,015,128号、Deasy, Microencapsulation and Related Drug Processes, Vol. 20, Chs. 9 and 10, pp. 195-240 (Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1984)、Chang et al., Canadian J. of Physiology and Pharmacology, Vol. 44, pp. 115-129 (1966)及びChang, Science, Vol. 146, pp. 524-525 (1964)に開示されている方法が含まれ、これらのそれぞれの開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

好ましい合成案に従うと、熱膨張法、例えばGarner et al., 米国特許第4,179,546号、Garner et al., 米国特許第3,945,956号、Cohrs et al., 米国特許第4,108,806号、英国特許第1,044,680号及び日本公開東京公報62-286534に記載されている方法を用いてポリマー小胞を調製することができる。一般的に言うと、熱膨張法は膨張可能なポリマーもしくはコポリマーの小胞を調製することにより行うことができ、それはその腔(空洞)内に揮

10

20

30

40

50



発性液体（気体前駆体）を含有することができる。次いで小胞を加熱し、小胞を可塑化し、揮発性液体を気体に変換して小胞を最高でその最初の寸法の約数倍まで膨張させる。熱が除かれると、熱可塑性ポリマーは少なくともその膨張した形のいくらかを留める。この方法により作られる小胞は特に低密度のものである傾向があり、かくして好ましい。前記の方法は当該技術分野において周知であり、低密度小胞の調製のための熱膨張法と呼ばれ得る。

熱膨張法で有用なポリマーは当該技術分野における熟練者に容易に明らかになり、上記のモノマーの多くのポリマーもしくはコポリマーを含む熱可塑性ポリマーもしくはコポリマーが含まれる。上記のポリマーもしくはコポリマーの中で好ましいものには以下のコポリマー：ポリビニリデン - ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン - ポリアクリロニトリル - ポリメチルメタクリレート及びポリスチレン - ポリアクリロニトリルが含まれる。最も好ましいコポリマーはポリビニリデン - ポリアクリロニトリルである。

熱膨張法で有用な揮発性液体も当該技術分野における熟練者に周知であり：脂肪族炭化水素、例えばエタン、エチレン、プロパン、プロペン、ブタン、イソブタン、ネオペンタン、アセチレン、ヘキサン、ヘプタン；クロロフルオロカーボン類、例えば  $\text{CCl}_3\text{F}$ 、 $\text{CCl}_2\text{F}_2$ 、 $\text{CClF}_3$ 、 $\text{CClF}_2 - \text{CCl}_2\text{F}_2$ 、クロロヘptaフルオロシクロブタン及び 1, 2 - ジクロロヘキサフルオロシクロブタン；テトラアルキルシラン類、例えばテトラメチルシラン、トリメチルエチルシラン、トリメチルイソプロピルシラン及びトリメチル n - プロピルシラン；ならびに上記のペフルオロカーボンを含むペフルオロカーボン類が含まれる。一般に揮発性液体は用いられるポリマーもしくはコポリマーのための溶媒ではないことが重要である。揮発性液体が、含まれるポリマーもしくはコポリマーの軟化点より低い沸点を有することも好ましい。種々の揮発性液体の沸点ならびに種々のポリマー及びコポリマーの軟化点は当該技術分野における熟練者が容易に確認することができ、ポリマーもしくはコポリマーと揮発性液体の適した組み合わせは熟練者に容易に明らかになるであろう。指針としてそして当該技術分野における熟練者がわかる通り、一般に揮発性液体の炭素鎖の長さが増加すると共にその液体の沸点も上昇する。又、最終的な加熱及び膨張の前に、水中の小胞を過酸化水素の存在下で穏やかに予備加熱することは、小胞を予備軟化し、膨張を比較的容易に起こさせることができる。

例えば合成ポリマーから小胞を作るために、前記の修正もしくは非修正文献法の 1 つ又はそれ以上を用い、液体イソブタン媒体中でビニリデン及びアクリロニトリルを共重合させ、イソブタンが小胞内に捕獲されるようにすることができる。次いで該小胞を約 80 ~ 約 120 の温度に加熱すると、イソブタンガスが膨張し、それが今度は小胞を膨張させる。熱を除いた後、膨張したポリビニリデン及びアクリロニトリルコポリマー小胞はその膨張した位置に実質的に固定されて留まる。得られる低密度小胞は乾燥状態及び水性媒体中に懸濁された状態の両方で非常に安定である。本明細書でイソブタンは単に液体の例として用いられ、これらの小胞の合成及び加熱された時の非常に低密度の小胞の形成に有用な温度において液体 / 気体転移を行う他の液体をイソブタンの代わりに置き換え得ることが理解される。同様に、ビニリデン及びアクリロニトリル以外のモノマーを小胞の調製に用いることができる。

ある好ましい実施態様の場合、合成ポリマーから調製され、本発明の方法で用いることができる小胞は EXPANCEL 551 DE<sup>TM</sup> 微小球を含んで Expancel, Nobel Industries (Sundsvall, Sweden) から商業的に入手可能である。EXPANCEL 551 DE<sup>TM</sup> 微小球はビニリデン及びアクリロニトリルのコポリマーから成り、それはその中に液体イソブタンを封入している。そのような微小球は乾燥組成物として販売されており、寸法が約 50 ミクロンである。EXPANCEL 551 DE<sup>TM</sup> 微小球は比重がわずかに 0.02 ~ 0.05 であり、それは水の密度の 50 分の 1 ~ 20 分の 1 である。

タンパク質に基づく小胞の調製のための前記の特許に記載されている方法の中に、タンパク質の溶液の音波処理を含む方法が含まれている。好ましい形態の場合、出発材料は熱 - 変性可能で水溶性の生物適合性タンパク質の水溶液であることができる。封入タンパク質

10

20

30

40

50

は好ましくは熱 - 感受性であり、それは音波処理の間に加熱により部分的に不溶化することができる。適した熱 - 感受性タンパク質には、例えばアルブミン、ヘモグロビン、コラーゲンなどが含まれる。好ましくはタンパク質は人間のタンパク質であり、人間の血清アルブミン (HSA) がより好ましい。HSAは無菌の5%水溶液として商業的に入手可能であり、それはタンパク質に基づく小胞の調製に用いるのに適している。もちろん、当該技術分野における通常の熟練者に明らかな通り、他の濃度のアルブミンならびに熱 - 変性可能な他のタンパク質を小胞の調製に用いることができる。一般にHSAの濃度は変化することができ、約0.1~約25重量%の範囲ならびにそこに含まれる範囲のすべての組み合わせ及びサブコンビネーションであることができる。タンパク質に基づく小胞の調製のためのある方法と関連して、タンパク質を希水溶液の形態で用いるのが好ましいことがあり得る。アルブミンの場合、約0.5~約7.5重量%のアルブミンを含有する水溶液を用いるのが好ましく、約5重量%未満、例えば約0.5~約3重量%の濃度が好ましい。

10

タンパク質に基づく小胞は、商業的に入手可能な装置を用いて調製することができる。例えばCerney et al., 米国特許第4,957,656号に開示されているような供給調製操作 (a feed preparation operation) と関連して、Walker Stainless Equipment Co. (New Lisbon, WI) から商業的に入手可能なステンレススチールタンク及びMillipore (Bedford, MA) から商業的に入手可能なプロセスフィルターを用いることができる。

20

音波処理操作は熱交換器及びフロースルー音波処理容器の両方を直列に用いることができる。この型の熱交換器装置はITT Standard (Buffalo, NY) から得ることができる。熱交換器は音波処理のための運転温度を維持し、温度制御は媒体の組成に依存して約65~約80の範囲である。音波処理装置の振動周波数は広い範囲に及んで、例えば約5~約40キロヘルツ (kHz) で変わり得、商業的に入手可能な音波処理器の大部分は約10又は20kHzで働く。適した音波処理装置は例えば平らな先端の音波発生ホーンが備えられたSonics & Materials Vibra-Cellを含み、それはSonics & Materials, Inc. (Danbury, CT) から商業的に入手可能である。音波発生ホーンに加えられる出力は、Sonics & Materials Vibra-Cell Model VL1500の場合のように、製造者による1~10の目盛りの出力設定の範囲で変えることができる。例えば5~9などの中間の出力設定を用いることができる。供給される振動周波数及び出力が、音波処理されている液体中にキャビテーションを生ずるのに十分であるのが好ましい。供給流量は約50mL/分~約1000mL/分の範囲ならびにそこに含まれる範囲のすべての組み合わせ及びサブコンビネーションであることができる。音波処理容器内における滞留時間は約1秒~約4分の範囲であることができ、気体流添加速度は1分当たり約10立方センチメートル (cc) ~約100cc/分あるいは供給流量の5%~25%ならびにそこに含まれる範囲のすべての組み合わせ及びサブコンビネーションであることができる。

30

溶液の発泡そして特に強い発泡を生むような方法で音波処理を行うのが好ましいことがあり得る。一般に強い発泡及びエアゾール化は強化された濃度及び安定性を有する造影剤を得るために重要である。発泡を促進するために、音波発生ホーンへの出力投入を増加させることができ、穏やかな圧力下、例えば約1~約5psiにおいて該方法を行うことができる。発泡は溶液の濁った外観によって及び生まれる泡によって容易に検出することができる。

40

タンパク質に基づく小胞の調製のための適した方法は、水溶液中でタンパク質もしくはタンパク質誘導体を物理的又は化学的に変えて材料を変性させるか又は固定することを含み得る。例えばタンパク質に基づく小胞をHSAの5%水溶液から、音波処理を介する造影剤の形成の後又は形成の間に加熱することにより調製することができる。化学的改変は、グルタルアルデヒドなどの2官能基性アルデヒドを用いてタンパク質を結合させることに

50

より化学的に変性させるか又は固定することを含み得る。例えば小胞をタンパク質 1 グラム当たり 0.25 グラムの 50% グルタルアルデヒド水溶液と、pH 4.5 において 6 時間反応させることができる。次いで未反応グルタルアルデヒドをタンパク質から洗い流すことができる。

本発明は造影剤を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与することを含む画像診断のための方法を目的とする。腎血管拡張薬は、造影剤の投与の前、その間及び／又は後に患者に投与することができる。腎血管拡張薬を含む生物活性薬を含有する脂質及び／又は小胞組成物の調製のために多様な方法を利用できる。例えば脂質及び／又は小胞組成物を脂質化合物、生物活性薬及び気体もしくは気体前駆体の混合物から調製することができる。この場合、脂質及び／又は小胞組成物を上記の通りに調製することができ、そこにおいて組成物は生物活性薬も含有する。かくして例えばミセルを生物活性薬の存在下で調製することができる。気体を含む脂質及び／又は小胞組成物と関連して、調製は例えば脂質化合物及び 1 種もしくはそれ以上の追加の材料の混合物中に気体を直接泡立てることを含むことができる。別の場合、脂質化合物及び気体もしくは気体前駆体から脂質及び／又は小胞組成物を予備生成することができる。後者の場合、生物活性薬を次いで使用前に脂質及び／又は小胞組成物に加えることができる。例えばリポソームと気体の水性混合物を調製し、それに生物活性薬を加え、それを攪拌してリポソーム組成物を得ることができる。生物活性薬をさらに含むリポソーム組成物は容易に単離することができ、それは、気体及び／又は生物活性薬充填リポソーム小胞が一般に水溶液の上部に浮遊するからである。過剰の生物活性薬は残る水溶液から回収することができる。

当該技術分野における熟練者が認識する通り、本明細書に記載する脂質及び／又は小胞組成物のいずれも保存のために凍結乾燥することができ、例えば水性媒体（例えば無菌水、リン酸塩緩衝溶液又は食塩水溶液）を用い、激しい攪拌により再構築することができる。凍結乾燥の結果として脂質が凝集又は融合するのを妨げるために、そのような融合又は凝集が起こるのを妨げる添加剤を含むのが有用であり得る。有用であり得る添加剤にはソルビトール、マンニトール、塩化ナトリウム、グルコース、トレハロース、ポリビニルピロリドン及びポリ（エチレングリコール）（PEG）、例えば約 400 ~ 約 10,000 の分子量を有する PEG ポリマーが含まれ、約 1000、3000（例えば PEG 3350）及び 5000 の分子量を有する PEG ポリマーが好ましい。これら及び他の添加剤は、例えばアメリカ薬局方、USP XXII、NF XVII、アメリカ薬局方、アメリカ国民医薬品集、United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 などの文献に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。凍結乾燥された調剤は一般により長い保存寿命という利点を有する。

上記で議論した通り、気体及び／又は気体前駆体充填小胞を含む本発明の組成物は、例えば超音波（US）画像法、CT 血管造影（CTA）を含むコンピューター連動断層撮影（CT）画像法、磁気共鳴血管造影（MRA）を含む磁気共鳴（MR）画像法、核医学、光学的画像法及びエラストグラフィを含む画像診断法のための造影剤として有用である。

本発明に従い、患者の 1 つ又はそれ以上の部位及び特に患者の腎臓部位の造影の方法を提供する。本発明は患者における疾患組織の存在もしくは不在、特に疾患腎組織の存在もしくは不在を診断するための方法も提供する。本発明の方法は、例えば脂質及び／又は小胞組成物の形態の造影剤を患者に投与することを含む。腎血管拡張薬も患者に投与される。例えば超音波画像法を含む画像診断法を用いて患者を走査し、患者の内部位、特に腎臓部位の可視画像を得る。該方法を例えば血管系を含む患者の他の内部位の造影に用いることもできる。腎臓部位を走査する場合、腹部大動脈を含むことが可能である。本発明を患者の内部位への生物活性薬の送達と関連して用いることもできる。

本発明の方法で用いられる腎血管拡張薬に関し、本発明の方法で用いるのに適していることができ、患者に投与されると腎血管拡張効果、すなわち腎臓部位における血管の拡張そして特に腎動脈の拡張を与えることができる多様な材料を利用できる。好ましくは材料は

全体的腎血流を増加させることができる。材料は直接作用して腎血流を増加させることができるかあるいは生化学的経路に含まれ、それによって腎血流の増加を生むことができる。さらに好ましくは、材料はアンギオテンシン転換酵素 (ACE) を阻害するように作用する。

ACE は比較的の不活性なデカペプチドであるアンギオテンシン I から有力な内在性血管収縮薬であるアンギオテンシン II への転換ならびに有力な血管拡張薬であるブラジキニンの破壊を触媒する。The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman, Joel G. And Limbird, Lee, E., eds. in chief, 1996, McGraw-Hill, New York, N.Y., pp. 743 - 751。腎動脈狭窄を有する患者の場合、腎臓中への血流が減少する。血流が減少した腎臓はレニンを生じ、それは腎臓中への血流を促進するために血圧を上昇させる。血圧の上昇は血管循環中の血漿グロブリン基質へのレニンの作用から生ずる。アンギオテンシン I はこの相互作用において生産され、ACE によりアンギオテンシン II に加水分解される。ACE 阻害剤の投与は特に腎臓において血管拡張効果を生じ、それは腎血管がアンギオテンシン II の血管収縮効果に特に敏感だからである。

ACE 阻害剤はその化学構造に従って分類することができる。スルフヒドリル - 含有 ACE 阻害剤にはカプトプリル (1 - (3 - メルカプト - 2 - メチル - 1 - オキソプロピル) - L - プロリン)、フェンチアプリル (2 - (2 - ヒドロキシフェニル) - 3 - (メルカプト - 1 - オキソプロピル) - 4 - チアゾジンカルボン酸)、ピバロプリル (N - シクロペンチル - N - [3 - (2, 2 - ジメチル - 1 - オキソプロピル) チオ] - 2 - メチル - 1 - オキソプロピル) - (S) - グリシン)、ゾフェノプリル (1 - [3 - (ベンゾイルチオ) - 2 - メチル - 1 - オキソプロピル] - 4 - フェニルチオ) - ヒドロキシ - 2, 2 - ジメチル - 4 - (2 - オキソ - 1 - [ピロリジニル] - 2 H - 1 - ベンゾピラン - 6 - カルボニトリル L - プロリン) 及びアラセプリル ((S) - N - [1 - [3 - (アセチルチオ) - 2 - メチル - 1 - オキソプロピル] L - プロリル] - L - フェニルアラニン) が含まれる。ジカルボキシル - 含有 ACE 阻害剤にはエナラプリル (1 - [N - [1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] - L - アラニル] L - プロリン)、エナラプリラート (エナラプリルの親ジカルボン酸)、リシノプリル ((S) - 1 - [N<sup>2</sup> - (1 - カルボキシ - 3 - フェニルプロピル) - L - リシル] - L - プロリン二水和物)、ベナゼプリル (3 - [[1 - エトキシ - カルボニル] - 3 - フェニル - (1S) プロピル] アミノ] - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 2 - オキソ - 1 H - 1 - (3S) ベンズアゼピン - 1 - 酢酸)、キナプリル (3S - [2 [R\* (R\*)], 3 R\*]) - 2 - [2 - [[1 - エトキシカルボニル] - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 3 - イソキノリンカルボン酸)、モエキシプリル (2 - [[1 - エトキシカルボニル] - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 6, 7 - ジメトキシ - 3 - イソキノリンカルボン酸 [3S - [2 R\* (R\*)], 3 R\*]) - 、ラミプリル (2S - [1 [R\* (R\*)], 2, 3, 6]) - 1 - [2 - [[1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] アミノ] 1 - オキソプロピル] オクタヒドロシクロペンタ [b] ピロール - 2 - カルボン酸)、スピラプリル (7 - [2 - [[1 - エトキシカルボニル] - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1 H - インドール - 2 - カルボン酸、[8S - [7 [R\* (R\*)], 8 R\*]) - 1 H - インドール - 2 - カルボン酸と 3 - [2 - 4 - (4 - フルオロベンゾイル) - 1 - ピペリジニル] エチル] - 2, 4 (1 H, 3 H) - キナゾリンジオンの混合物)、ペリンドプリル (2S - [1 - [R\*, (R\*)], 2, 3, 7]) - 1 - [2 - [[1 - (エトキシカルボニル) プロチル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] オクタヒドロ - 1 H - インドール - 2 - カルボン酸)、インドラプリル (1 - [2 - [[1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] オクタヒドロ - 1 H - インドール - 2 - カルボン酸, [2S - [1 [R\* (R\*)], 2, アルファ, 3 a, ベータ, 7 a, ベータ]])、イ

10

20

30

40

50

ンダラプリル((S)-N-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-2-イル)-N-[N-{1-エトキシカルボニル}-3-フェニルプロピル]-L-アラニル]グリシン及びシラザプリル(1S-[[[1,9-(R\*)]]-9-[[1-エトキシカルボニル]-3-フェニルプロピル]アミノ]オクタヒドロ-10-オキソ-6H-ピリダジノ[1,2-a][1,2]ジアゼピン-1-カルボン酸一水和物)が含まれる。リン-含有ACE阻害剤にはフェシノプリル((2,4)-4-シクロヘキシル-1-[[[2-メチル-1-(1-オキソプロポキシ)プロポキシ](4-フェニルブチル)ホスフィニル]アセチル]-L-プロリン)が含まれる。そのような化合物は例えばThe Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman, Joel G. And Limbird, Lee W., eds in chief, 1996, McGraw-Hill, New York, N.Y., pp. 743-751及びThe Merck Index, Eleventh Ed., 1989, Merck & Co.に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。これら及び他の適した血管拡張薬化合物は、本開示を動員すると当該技術分野における熟練者に容易に明らかになるであろう。阻害剤の送達、効率及び生物利用性が不必要に損なわれなければ、いずれのACE阻害剤の製薬学的に許容され得る塩も用いることができる。本発明の方法で用いるために好ましいのはカプトプリル及びエナラプリルである。カプトプリルは経口的投与に好ましく、好ましい経口的投薬量は患者の体重に依存して約25ミリグラム～約50ミリグラムであり、患者を走査する約0.5～約5時間、好ましくは約1～約2時間前に投与する。エナラプリルは静脈内投与に適している。一般にエナラプリルは患者を走査する約15分～約2時間前に注射される。

必要なら、本明細書に記載する脂質、タンパク質、ポリマー及び/又は小胞組成物はさらに、例えば腎組織を含む生体内の組織及び/又はレセプターの標的化を助長するための標的化剤を含むことができる。適した標的化剤、脂質及び/又は小胞組成物中へのその導入法ならびにそのような標的化組成物の使用法は、例えば1996年5月1日出願の同時係属米国特許出願番号08/640,464及び1996年6月6日出願の米国特許出願番号08/660,032に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

当該技術分野における熟練者がわかる通り、本明細書に記載する脂質及び/又は小胞組成物ならびに腎血管拡張薬の投与は、非経口的、経口的又は腹腔内を含む種々の様式で行うことができる。非経口的投与が好ましく、それには以下の経路による投与が含まれる：静脈内；筋肉内；間質内(interstitially)；動脈内；皮下；眼内；滑液包内；経皮的を含む経上皮的；吸入を含む肺性；眼性；舌下及び頬性；眼性を含む局所的；皮膚的；眼性；直腸的；ならびに通気を含む鼻吸入。非経口的投与の経路の中で静脈内投与が好ましい。脂質及び/又は小胞組成物ならびに腎血管拡張薬の種々の組み合わせを用い、粘度、容量オスモル濃度又は口にし易さを含む性質を所望通りに変えることができる。本発明の画像法を行う場合、腎血管拡張薬を含む造影剤を単独であるいは追加の診断薬、治療薬もしくは他の薬剤と組み合わせる用いることができる。そのような他の薬剤には風味料又は着色材料などの賦形剤が含まれる。

用いられるCT画像法は通常行われ、例えばComputed Body Tomography, Lee, J. K. T., Sagel, S. S., and Stanley, R. J., eds., 1983, Ravens Press, New York, N.Y.,、特に“Physical Principle and Instrumentation”, Ter-Pogossian, M. M., 及び“Techniques”, Aronerg, D. J.という標題のその最初の2章に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

特に腎臓部位の造影を目的とする磁気共鳴画像法は例えばBrown, et al., “Magnetic Resonance Imaging of the Adrenal Gland and Kidney”, Topics in Magnetic Resonance Imaging, Vol. 7(2), pp. 90-101(1995

10

20

30

40

50

); Krestin, "Magnetic Resonance Imaging of the Kidneys: Current Status", Magnetic Resonance Quarterly, Vol. 10 (1), pp. 2 - 21 (March 1994); Lee, "Recent Advances in Magnetic Resonance Imaging of Renal Masses", Canadian Association of Radiologists Journal, Vol. 42 (3), pp. 185 - 9 (June 1991); Lubat et al., "Magnetic Resonance Imaging of the Kidneys and Adrenals", Vol. 2 (3), pp. 17 - 36 (June 1990); Baumgartner et al., "Magnetic Resonance Imaging of the Kidneys and Adrenal Glands", Seminars in Ultrasound, CT and MR, Vol. 10 (1), pp. 43 - 62 (February 1989); Choyke et al., "The Role of MRI in Disease of the Kidney", Radiologic Clinics of North America Vol. 26 (3), pp. 617 - 31 (May 1988); ならびに Papanicolaou et al., "Magnetic Resonance Imaging of the Kidney", Urologic Radiology, Vol. 8 (3), pp. 139 - 50 (1986) に記載されている。

10

20

超音波に関し、第2調和造影 (second harmonic imaging) 及びゲートド造影 (gated imaging) を含む超音波画像法は当該技術分野において周知であり、例えば Uhlenendorf, "Physics of Ultrasound Contrast Imaging: Scattering in the Linear Range", IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, Vol. 14 (1), pp. 70 - 79 (1994) 及び Sutherland, et al., "Color Doppler Myocardial Imaging: A New Techniques for the Assessment of Myocardial Function", Journal of the American Society of Echocardiography, Vol. 7 (5), pp. 441 - 458 (1994) に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

30

超音波、CT 及び MRI などの診断的用途の場合、超音波エネルギーなどのエネルギーを少なくとも患者の一部に適用し、標的組織を造影することができる。次いで患者の内部位、好ましくは腎臓部位の可視画像を得、疾患組織の存在又は不在を突き止めることができる。

超音波は診断的及び治療的目的の両方に用いることができる。診断的超音波の場合、超音波又は1系列の超音波のパルスを変換器を用いて適用することができる。超音波は一般に連続的ではなく、パルス状 (断続的) であるが、必要ならそれは連続的であることができる。かくして診断的超音波は一般にエコーのパルスの適用を含み、その後、聴取期間の間に超音波変換器が反射された信号を受け取る。高調波、超高調波又はサブハーモニクス (subharmonics) を用いることができる。第2調和様式を有益に用いることができ、その様式では  $2 \times$  周波数を受け取ることができ、ここで  $x$  は入射周波数である。これは背景材料からの信号を減少させ、所望の部位を標的とすることができる本発明の造影剤を用いた変換器からの信号を強化するように働くことができる。奇数高調波信号、例えば  $3 \times$  もしくは  $5 \times$  などの他の高調波信号をこの方法を用いて同様に受け取ることができる。サブハーモニック信号、例えば  $x/2$  及び  $x/3$  を受け取り、処理して画像を形成することもできる。

40

パルス発生法の他に、連続波超音波、例えば Power Doppler を適用すること

50

ができる。これは剛い小胞、例えばポリメチルメタクリレートもしくはシアノメタクリレートから調製される小胞が用いられる場合に特に有用であり得る。この場合、比較的高エネルギーの Power Doppler を小胞に共鳴させ、それによりその破裂を促進することができる。これは音響を発生させることができ、それはサブハーモニック又は超高調領域あるいはいくつかの場合には適用される超音波と同じ周波数であり得る。この方法では、放出される音響的特徴 (acoustic signature) の範囲があり、そのように用いられる変換器は音響発生を受け取って、例えば血餅の存在を検出することができると思われる。さらに、小胞破裂の過程を用いて運動エネルギーを例えば血餅の表面に移動させ、血餅の溶解を促進することができる。かくして診断的及び治療的超音波の組み合わせの間に治療的血栓崩壊を達成することができる。スペクトルドップラー (spectral Doppler) も用いることができる。一般に診断的超音波からのエネルギーのレベルは小胞の破裂を促進し、生物活性薬の放出及び細胞吸収を助長するには不十分である。上記の通り、診断的超音波は1つもしくはそれ以上の音波のパルスの適用を含み得る。パルス間の途切れが反射される音波の信号を受け取り、分析することを可能にする。診断的超音波で用いられるパルスの数の制限は、調べられている組織に送達される有効なエネルギーを制限する。

10

比較的高エネルギーの超音波、例えば治療的超音波装置により発生される超音波は一般に小胞種を破裂させることができる。一般に治療的超音波のための装置は、超音波を用いて処置されるべき組織の面積に依存して、約10～約100%のデューティーサイクル (duty cycle) を用いる。一般に比較的大量の筋肉塊により特徴付けられる体の領域、例えば背中及び大腿ならびに高度に血管化された組織、例えば心臓血管組織は比較的大きな、例えば最高約100%のデューティーサイクルを必要とし得る。

20

治療的超音波の場合、より高いエネルギーレベルを送達するために連続波超音波が用いられる。小胞の破裂のためには連続波超音波が好ましいが、音波エネルギーをパルス化することもできる。パルス化された音波エネルギーが用いられる場合、音波は一般に1回に約8～約20又はそれより多いパルスというエコー系列長でパルス化される。好ましくは、エコー系列長は1回に約20パルスである。さらに、用いられる音波の周波数は約0.025～約100メガヘルツ (MHz) で変わることができる。一般に治療的超音波の周波数は好ましくは約0.75～約3MHzの範囲であり、約1～約2MHzがより好ましい。さらに、エネルギーレベルは平方センチメートル ( $\text{cm}^2$ ) 当たり約0.5ワット (W) ～約5.0  $\text{W}/\text{cm}^2$  で変わることができ、約0.5～約2.5  $\text{W}/\text{cm}^2$  のエネルギーレベルが好ましい。高熱を含む治療的超音波のためのエネルギーレベルは一般に約5  $\text{W}/\text{cm}^2$  ～約50  $\text{W}/\text{cm}^2$  である。非常に小さい小胞、例えば約0.5  $\mu\text{m}$  未満の直径を有する小胞の場合、比較的高い周波数の音波が一般に好ましい。これは、より小さい小胞はより高い音波の周波数においてより有効に音波エネルギーを吸収することができ得るからである。非常に高い周波数、例えば約10MHzより高い周波数が用いられると、音波エネルギーは限られた深さまでしか液及び組織に透過することができない。かくして音波エネルギーの外部適用は皮膚及び他の表面組織に適していることができる。しかし一般に深い構造が超音波エネルギーを集中させ、エネルギーが焦点区域に優先的に向くようにすることが必要である。別の場合、超音波エネルギーを間質プローブ (interstitial probe)、血管内超音波カテーテル又は内腔カテーテル (endoluminal catheters) を介して超音波エネルギーを適用することができる。そのようなプローブ又はカテーテルは、例えば食道癌の診断及び/または治療のために食道で用いることができる。上記で議論した治療的用途の他に、本明細書に記載する組成物を食道癌と関連して又はアテローム性動脈硬化の処置のために冠動脈においてならびに例えばその開示全体が引用することにより本明細書の内容となる米国特許第5,149,319号に記載されている治療的用途で用いることができる。

30

40

2種類の周波数の超音波を用いている治療的超音波装置を使用することができる。第1の周波数をxと限定することができ、第2の周波数を2xと限定することができる。好ましい形態の場合、第1及び第2の周波数の焦点区域が1つの焦点区域に収斂するように装置

50

が設計される。次いで装置の焦点区域を問題の部位の組織内の組成物、例えば小胞組成物に指向することができる。この超音波装置は $x$ 及び $2x$ 周波数の超音波エネルギーを同時に適用して第2調和治療を与えることができる。小胞を含む超音波の場合、この第2調和治療は単一の周波数を含む超音波エネルギーと比較して小胞の破裂を促進することができると思われる。好ましい周波数範囲は小胞の基本的調和周波数内にある得とも思われる。この装置を用い、比較的低エネルギーを使用することもできる。前記の第2調和治療と関連して用いることができる超音波装置は、例えばKawabata, K. et al., Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 3, pp. 1-5 (1996)に記載されており、その開示は引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

10

脂質から調製される小胞組成物の場合、所望の安定化のレベルの小胞を形成するのに必要な脂質の濃度は、例えば用いられる脂質の型に依存して変わり得、慣例的実験により容易に決定することができる。例えば好ましい実施態様の場合、本発明の方法に従う安定化小胞の形成に用いられる1,2-ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)の濃度は食塩溶液1mL当たり約0.1mg~約30mg、より好ましくは食塩溶液1mL当たり約0.5mg~約20mg、さらにもっと好ましくは食塩溶液1mL当たり約1mg~約10mgであることができる。好ましい実施態様で用いられるジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)の濃度は食塩溶液1mL当たり約0.1mg~約30mg、より好ましくは食塩溶液1mL当たり約0.5mg~約20mg、さらにもっと好ましくは食塩溶液1mL当たり約1mg~約10mgであることができる。

20

投与されるべき造影剤及び/又は腎血管拡張薬の有用な投薬量ならびに特定の投与様式は、年令、体重及び特定の哺乳類及び走査されるべきその部位ならびに用いられる特定の造影剤及び/又は腎血管拡張薬に依存して変わり得る。典型的に投薬量を比較的小量で開始し、所望のコントラスト増強又は他の効果が達成されるまで増加させることができる。造影剤に関し、IV投薬量は70kgの患者の場合に約10mL未満であることができ、より低い投薬量が好ましい。腎血管拡張薬の投薬量は、例えば約0.01~約100mg/kgあるいは約0.4mg~約10g又はそれ以上で変化し得る。DPPC、DPPE及びDPPEPEG-5000を腎血管拡張薬と組み合わせる含有する組成物の投与を含む好ましい実施態様の場合、好ましくは腎血管拡張薬は約0.01~約30mg/mL、好ましくは約0.01mg/mL~約1mg/mL、より好ましくは約0.01mg/mL~約0.1mg/mLの投薬量で患者に投与される。

30

本明細書に記載する組成物そして特に小胞組成物は、画像診断法における造影剤として有用であり、画像診断法が用いられるすべての分野で用いるためにも適していることができる。しかし安定化小胞は灌流造影法に特に有用である。

本発明に従い、患者を全身的に、好ましくは腎臓部位を造影する及び/又は特定の患者、特に腎臓部位における疾患組織の存在を診断する方法を提供する。本発明の画像法は、造影剤及び腎血管拡張薬を患者に投与し、次いで例えば超音波、コンピューター連動断層撮影及び/又は磁気共鳴画像法を用いて患者を走査し、患者の内部位及び/又はその部位における疾患組織の可視画像を得ることにより行うことができる。該方法は、腎臓部位の画像を得ることにおいて特に有用であり得るが、もっと広く、例えば血管系又は胃腸管部位の造影においてあるいは当該技術分野における熟練者に容易に明らかになる他の方法で用いることもできる。患者はいずれの型の哺乳類であることもできるが、最も好ましくは人間である。

40

本発明は患者における疾患組織、特に心臓血管系における疾患組織の存在を診断する方法も提供する。疾患組織には、例えば疾患組織を支えている血管系から生ずる内皮組織が含まれる。結果として、正常な状況下では内皮組織を伴わない患者の部位への内皮組織の定位及び視覚化がその部位における疾患組織の指標となる。さらに、例えば腎動脈狭窄を含む腎動脈疾患の存在もしくは不在の診断のために本発明の方法を用いることができる。本発明の方法を用いて造影及び/又は診断することができる心臓血管系の他の疾患は、本開示を動員したら、当該技術分野における通常の熟練者に容易に明らかになるであろう。

50



上記の通り、本明細書に記載する組成物の投与は、血管内、経口的、直腸内などの種々の様式で、多様な投薬形態を用いて行うことができる。走査されるべき部位が心臓血管部位の場合、造影剤の投与は好ましくは例えば静脈内を含む血管内に行われる。走査されるべき部位が腎臓部位の場合、造影剤の投与は好ましくは経口的もしくは血管内に行われる。走査されるべき部位が胃腸部位の場合、造影剤の投与は好ましくは経口的又は直腸内に行われる。腎血管拡張薬の投与も用いられる特定の腎血管拡張薬に依存して種々の様式で、例えば血管内又は経口的に行うことができる。例えばニトログリセリンなどのニトロ血管拡張薬はIVならびに経皮的に投与することができる。腎血管拡張薬の投与の適した様式は、本開示を動員したら、当該技術分野における通常の熟練者に容易に明らかになるであろう。投与は所望通り、例えば連続的静脈内輸液によるか又は断続的静脈内輸液による連続的（一定）又は断続的（例えばパルス状）であることができる。

10

脂質、タンパク質、ポリマー及び／又は小胞組成物の種々の組み合わせを用い、造影剤の弛緩挙動を修正するか又は粘度、容量オスモル濃度もしくは口にし易さ（経口的に投与される材料の場合）などの性質を変えることができる。

超音波を用いた小胞そして特に気体充填小胞のエコー発生性ならびにピーク共鳴周波数において小胞を破裂させる能力は、患者の内部位への生物活性薬の制御された送達を可能にする。特定的には、小胞を患者へのその投与に続いて環視し、小胞が例えば所望の部位に達する速度を決定することができる。さらに、超音波を用いて小胞を破裂させ、その部位において生物活性薬を放出させることができる。

本発明に従い、患者の腎臓部位における血流を測定するための方法も提供する。本発明のこの側面に従い、最初に問題の部位に超音波エネルギーの実質的パルス、例えば最高約  $0.5 \text{ W/cm}^2$ 、好ましくは約  $0.1 \text{ W/cm}^2$  の超音波エネルギーパルスを適用し、エネルギーの「矩形波」を与えることを含み得るある実施態様を提供する。この矩形波エネルギーは実質的反射能及び従って超音波画像における実質的輝度を与えることができる。矩形波エネルギーは血流中で希釈されるので、対応する超音波画像の輝度は同様に低下する。矩形波エネルギーが希釈される速度の観察及び分析は、腎血流の速度の指標となる。

20

患者の腎臓部位における血流を測定するための方法の他の実施態様において、一般に腎臓部位における造影剤の濃度を大体一定のレベルに維持するような方法で造影剤を患者に投与することを含む方法を本明細書で提供する。これは例えば造影剤の一定静脈内注射を含む多様な方法を用いることにより成され得る。

30

本発明の好ましい実施態様の場合、脂質及び／又は小胞組成物をシリンジにより、すなわち静脈内（IV）注射により投与することができる。従って本明細書で示す気体及び／又は小胞投与速度は一般に注射速度に対応する。本開示を動員したら当該技術分野における通常の熟練者に明らかな通り、患者の体上で脂質及び／又は小胞組成物が注射される位置は変わり得、例えば用いられる特定の脂質及び／又は小胞組成物、意図されている用途、例えば診断的もしくは治療的用途ならびに問題の特定の部位を含む多様な因子に依存する。例えば心筋組織の診断的超音波の場合、脂質及び／又は小胞組成物を例えば患者の腕で静脈内（IV）に注射することができる。

例えば小胞組成物を含む本明細書に記載する造影剤のIV投与はシリンジを介する投与を含むことができる。これは例えばシリンジを手動で取り扱う適した医学的技術者により行うことができる。別の場合、機械的に、例えば空気圧又は水圧を用いて働く機械的インジェクターなどの一定輸液装置を用いることにより投与を行うことができる。本発明の方法で用いることができる適した機械的インジェクターには Sage Instrument (Orion Research Inc., Boston, MA の 1 部門) から商業的に入手可能な Syringe Pump Model 351、Medrad, Inc. (Pittsburgh, PA) から商業的に入手可能な MedRad<sup>TM</sup> パワーインジェクターあるいは Liebel Flarsheim Co. (Cincinnati, OH) から商業的に入手可能な Liebel Flarsheim が含まれる。好ましくは造影剤は、例えば用いられる特定の造影剤、注射の容積などに依存して少なくとも約 1 秒、より好ましくは約 5 秒から最高約 30 秒かそれより長い時間投与される。小胞に基づ

40

50

く造影剤の場合、投与の時間は例えば造影剤中の小胞の濃度、小胞の寸法及び造影剤中における小胞の寸法の分布にも依存し得る。例えば超音波画像法などの画像診断法を用いる腎臓部位の走査は、腎臓部位の診断画像を与える。腎臓部位における造影剤の濃度を実質的に一定に維持することにより、望ましくはこの診断画像における実質的に一定のレベルの輝度を与えることができる。続いて患者に腎血管拡張薬を投与すると、次いで腎血流を増加させることができ、それは上記の通り、腎組織における造影剤の濃度も向上させることができる。

超音波画像法などの画像法を介して得られる画像を定性的に分析することができるが、好ましくは定量的方法を用いる。ビデオデンシトメトリー信号を数値化し、分析して信号強度の変化を決定することができる。種々の比較測定を行うことができる。例えば2つの腎臓からのビデオデンシトメトリーを比較し、1つの腎臓が比較的低いビデオデンシトメトリー応答を示し、1つの腎臓に腎動脈性高血圧が存在しそうであることを示しているか否かを決定することができる。別の場合、1つ又は両方の腎臓からのビデオデンシトメトリーを腹部大動脈のそれと比較することができる。大動脈からのビデオデンシトメトリーを基準として用い、腎性高血圧を有すると思われる患者の腎臓における相対的増強を正常な患者の場合の年令 - 調整標準的増強と比較することができ、それは腎臓狭窄の程度の指標となり得る。例えば同じ患者の2つの腎臓の比較のためあるいは造影剤の投与によるコントラスト増強の前のビデオデンシトメトリーをコントラスト増強後のビデオデンシトメトリーと比較するために、引き去り法を用いることができる。

本実施態様に従って記載する方法の目的の場合、小胞の濃度は診断画像、特に超音波画像の輝度に大体比例しており、それが今度は腎臓部位の血流の速度に大体比例していると理解される。やはり本実施態様において記載する方法の目的の場合、小胞は好ましくは一次除去速度に従うと理解される。しかし他の速度次数、例えばゼロ、二次又は三次速度をこれらの方法に適用することもできる。これらのことを理解して、簡単な誘導を用いることにより、腎血管拡張薬により与えられる腎臓の流れにおけるパーセント増加の指標を得ることができる：

$$-d[\text{小胞}] / dT = k[\text{小胞}]$$

ここで

[小胞] = 小胞の濃度；

k = 一次過程としての速度定数 (秒<sup>-1</sup>)；及び

T = 時間 (秒)。

好ましくは小胞濃度、ビデオデンシトメトリー及び腎血流の間に相関があり、その相関を例えば相関定数 k により定義することも理解すると：

$$-d[\text{小胞}] / dT = k[\text{小胞}]$$

$$= d[\text{ビデオデンシトメトリー}] / dT$$

$$= k[\text{ビデオデンシトメトリー}]$$

ここで

[ビデオデンシトメトリー] = ビデオデンシトメトリー単位におけるビデオ輝度 (VDU 's)。

上記の式を転位させると以下となる：

$$-d[\text{ビデオデンシトメトリー}] / [\text{ビデオデンシトメトリー}]$$

$$= k dT$$

かくして

$$-d[\text{ビデオデンシトメトリー}] / [\text{ビデオデンシトメトリー}]$$

$$= k dT$$

又は

$$\ln [\text{ビデオデンシトメトリー}_{t=0} - \text{ビデオデンシトメトリー}_t]$$

$$= k T$$

前記の式を展開すると：

$$[\text{ビデオデンシトメトリー}_t] = [\text{ビデオデンシトメトリー}_{t=0}]$$

$$= e^{-kT}$$

を与える。

本実施態様において造影剤の一定輸液を用いる腎臓部位の診断画像のビデオ濃度と呼ばれる  $t = 0$  の時点における基準ビデオデンストメトリーならびに本明細書において腎血管拡張薬の投与後の腎臓部位の診断画像のビデオ濃度と呼ばれる  $T = t$  の時点における最終的ビデオデンストメトリーの測定を用い、腎血管拡張薬のある与えられた投薬量における腎臓の流れの増加に関する速度定数を決定することができる。

腎臓部位における血流がビデオデンストメトリーと大体比例することを理解し、次いで置換すると：

$$[\text{流れ}_t] = [\text{流れ}_{t=0}] = e^{-kT}$$

10

を与える。かくして造影剤の一定の投与を用い、腎血管拡張薬の投与後の超音波画像における腎組織の輝度の変化を知ると、腎血流における相対的増加（％）を決定することができる。単位時間当たりの流れ、ビデオデンストメトリー及び微泡濃度の間の相関に起こり得る変動は、腎血流の増加の決定の精度に影響し得る。しかし非 - 直線性又は非 - 比例性への修正を計算に導入することができる。例えば小胞濃度と画像の定量の間の変動に関する修正を、例えば Eriksen, M., "Tissue Echo Intensity and Blood Attenuation Changes - The Pitfalls of Video Densitometry", The Second Annual International Symposium on Contrast Agents in Diagnostic Ultrasound, Atlantic City, NJ (May 7, 1996) に記載されている方法を用いることにより与えることができる。

20

キャリブレーション法を用いてデンストメトリーデータと血流の相関の精度を向上させることができる。例えば心筋血流の計算に用いるための Mor-Avi, V. Et. Al, Ultrasound in Medicine and Biology 19(8), pp. 619 - 33 (1993) に記載されている方法などの内部キャリブレーション法を腎臓部位で用いるために適応させることができる。造影剤の比較的高い濃度における非 - 直線性の故に不正確さが残り得る。別の場合、外部キャリブレーション法を用い、モデル系においてビデオ濃度と造影剤の容積の間の関係を決定することができる。キャリブレーションされた造影剤を用いて患者を走査することにより得られる画像を処理し、モデル系に基づいて血流速度を計算することができる。外部キャリブレーション法の場合、造影剤の比較的高い濃度における音響応答の非 - 直線性ならびに患者における造影剤と赤血球の間の流動学的性質における差に関して補正するように修正することができる。

30

以下の実施例は単に本発明の例示であり、いかようにも本発明の範囲を制限すると考えるべきではない。実施例 1 及び 2 は実際の実施例であり、実施例 3 及び 4 は予言的である。

#### 実施例

##### 実施例 1

この実施例は本発明の方法で用いるための脂質小胞組成物の調製を記載する。「DPPC」はジパルミトイルホスファチジルコリンを言い；「DPPЕ」はジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを言い；「DPPA」はジパルミトイルホスファチジン酸を言う。「PEG5000」は約 5000 の分子量を有するポリ（エチレングリコール）ポリマーを言う。「DPPЕ - PEG5000」は PEG5000 に共有結合している DPPЕ を言い、ここで DPPЕ 及び PEG5000 は約 20 : 80 の重量比で存在する。「PFP」はペルフルオロプロパンガスを言う。

40

食塩、プロピレングリコール及びグリセロール（8 : 1 : 1）の溶液に DPPC、DPPЕ - PEG5000 及び DPPA を 82 : 8 : 10 のモル比で加えた。得られる混合物を約 45 に加熱し、濾過した（0.22  $\mu\text{m}$ ）。濾過された混合物をバイアル中に入れ、室温に冷ました。バイアルを真空下に置いて気体を排気し、その後バイアルを PFP で加圧した。次いでバイアルを密閉し、震盪機上に置き、室温で攪拌して約 2.5  $\mu\text{m}$  の平均直径を有する PFP - 充填小胞の溶液を得た。溶液中の小胞の濃度は約  $1.5 \times 10^9$  小

50

胞 / mL であった。

## 実施例 2

この実施例は閉塞した腎臓を検出するための哺乳類における腎臓の造影のための実施例 1 に従って調製された小胞の利用を記載する。

18 kg の雌の雑種犬をハロタン ( $C_2HBrClF_3$ ) を用いて麻酔した。左の腎臓に通じる腎動脈を 2 mm の空気圧オクルダー (InvivoMetric, Haldsburg, CA) に露出し、Doppler フロープローブ (Transonic, Ithaca, NY) を取り付けた。

腹を縫合して閉じ、7.5 MHz の密に湾曲した線状の変換器列 (tightly curved linear array transducer) (Acoustic Imaging, Phoenix, AZ) を有する Acoustic Imaging 5200 S 超音波機を用いて経腹的に超音波画像法を行った。流量が 44 mL / 分から 22 mL / 分に減少するまで空気圧オクルダーをふくらませた。実施例 1 に従って調製した小胞を 0.02 cc / kg ( $3.0 \times 10^7$  小胞 / kg) の投薬量でカテーテルを介してぎょう側皮静脈に注入し、左の (閉塞した) 腎臓の造影を行った。次いでこの手順を右の (閉塞されていない) 腎臓に繰り返した。左の腎動脈は、閉塞されていない腎臓の造影の間、閉塞させた。330 マイクロリットル ( $\mu L$ ) の投薬量のエナブラリル (1.25 mg / mL) (Vasotec, Merck, Sharp and Dohme, West Point, PA) をぎょう側皮カテーテルを介して投与した。エナブラリルが作用するまでに 30 分待ち、次いで空気圧オクルダーを再度ふくらませて流れを 22 mL / 分に減少させた。追加の 0.02 cc / kg ( $3.0 \times 10^7$  小胞 / kg) の投薬量の小胞を各腎臓に投与し、造影を行った。小胞の各注入の後に 4 分かけ、連続的基本的超音波画像法を行った。各注入の間に 10 分間おき、腎臓部位から小胞をクリアランスさせた。

次いで Panasonic SV 3350 SVHS VCR (Japan) 及び Macintosh Centris 660 AV コンピューター (Apple Computer, Cupertino, CA) を用いて画像を捕獲した。捕獲された画像を NIH (Bethesda, MD) により販売されている画像分析ソフトウェアパッケージである Image 1.55 を用いて分析した。問題の部位をエナブラリルの投与の前 (「プレ - エナブラリル」) 及びエナブラリルの投与の後 (「ポスト - エナブラリル」) の閉塞腎臓からならびにプレ - エナブラリル及びポスト - エナブラリルの非閉塞腎臓から選択した。データを下記の表に示す。ビデオデンシトメトリーにおける減少 (負の数により示される) は画像が暗くなったことを意味し、増加は輝度の上昇を示す。「プレコントラスト」という用語は小胞の投与の前に取られたビデオデンシトメトリー測定値を示す。「ポストコントラスト」という用語は小胞の投与に続いて取られたビデオデンシトメトリー測定値を示す。データは示されている引き去りの結果として与えられている。例えば [プレコントラスト - ポストコントラスト] は、小胞の投与の前のビデオデンシトメトリー測定値からの小胞の投与に続くビデオデンシトメトリー測定値の引き去りを示す。「プレエナブラリル」はエナブラリルの投与の前を意味する。「ポストエナブラリル」はエナブラリルの投与の後を意味する。

処置	ビデオデンストメトリー 測定値における変化
[プレコントラストーポストコントラスト]、 プレエナラプリル、閉塞腎臓	11.84
[プレコントラストーポストコントラスト]、 ポストエナラプリル、閉塞腎臓	8.59
閉塞腎臓 [プレエナラプリルーポストエナ ラプリル]	-3.25
[プレコントラストーポストコントラスト]、 プレエナラプリル、非閉塞腎臓	31.74
[プレコントラストーポストコントラスト]、 ポストエナラプリル、非閉塞腎臓	49.20
[プレエナラプリルーポストエナラプリル]、 非閉塞腎臓	17.46

10

20

上記のデータにおいてわかる通り、エナラプリルの投与の後に非閉塞腎臓において測定可能な輝度の上昇がある。しかし閉塞腎臓の場合、測定値は非常に一定のままである。

#### 実施例 3

この実施例は哺乳類中の腎血流を測定するための超音波画像法における実施例 1 に従って調製された小胞の利用を記載する。

20 kg の犬をハロタンを用いて麻酔する。腎動脈を実施例 2 の場合の通りに 2 mm の空気圧オクルダーに暴露し、Doppler フロープローブを実施例 2 の場合と同じ方法で腎動脈に連結する。実施例 1 に従って調製した小胞（食塩水中で  $6 \times 10^7$  小胞 / cc）を 37 に予備加熱し、次いでぎょう側皮静脈中のカテーテルを介して 1 cc / 分の速度で連続的に注入する。

30

Hewlett Packard 超音波機（Hewlett Packard, Boston, MA）を用い、パルス状超音波画像法を腎臓について行う。2 MHz における透過及び 5 MHz における受信で、連続的第 2 調和画像法を用いる。次いで 1.0 ワット /  $\text{cm}^2$  のエネルギーを有するパルスを断続的に適用し、小胞を破裂させる。各破裂パルスの間におかれる時間間隔を変えて（それぞれ 1、2、3、4 及び 5 秒）、実施例を 5 回繰り返す。

患者につきビデオデンストメトリーを行う。破裂パルスに続く「B」と示されるビデオ濃度信号の再出現が得られる。信号は腎血流と直接相関している（相関定数  $r = 0.88 \sim 0.98$ ）。式  $y = A(1 - 10^{-B/A^t})$  を用いて標準化ビデオデンストメトリー信号（ $y$ ）を計算し、ここで  $A$  はピークビデオ濃度であり、腎組織中の血液の量と直接相関して

40

おり、 $t$  は造影パルスと破裂パルスの間の時間間隔である。  
データを図 1 においてプロットする。「A」はピーク又は極大ビデオ濃度を示し、それは血流が腎組織に極大量の小胞を送達し、かくして極大ビデオ濃度信号を発生する時に生ずる。破裂パルスに続き、小胞が破裂して信号は低下する。血流が再び小胞を送達すると共にビデオ濃度信号は再出現する。「B」はビデオ濃度信号の再出現を示す。信号が高い程、多くの小胞が部位に存在し、対応して血液流量が高い。より多くの小胞が部位内に運ばれると共に信号 B は増加する。

図において信号は、再出現ビデオ濃度信号 B 対ピークビデオ濃度信号 A の比率、すなわち（ $B/A$ ）として示されている。ある与えられた標準化ビデオ濃度の場合、血流の速度が高い程、比率（ $B/A$ ）は高い。従って閉塞のない場合、（ $B/A$ ）はより急速に増加す

50

ることが予測される。

標準化ビデオ濃度値 (y) は y 軸上にあり、ビデオ濃度の再出現 B 対ピークビデオ濃度 A の比率 (B / A) は x 軸上にある。各プロットは破裂パルス後の異なる時間間隔 (1 ~ 5 秒) を示す。データはパルス状超音波画像法及び腎血管拡張薬の連続的投与を用いて、血流を定量的に測定できることを示している。

#### 実施例 4

この実施例は、狭窄腎動脈を有する哺乳類の腎臓を通る血流を測定するための腎血管拡張薬を用いる断続的超音波画像法の利用を示す。

狭窄腎動脈を有する 20 kg の犬を用いる以外は、実施例 3 の場合と同じ手順を行う。実施例 3 の場合の通りに超音波画像法を行う。血液循環により腎臓部位から小胞が運ばれるのに 1 時間待つ。

カプトプリルを投与し (10 mg)、続いて小胞を投与する。実施例 3 の場合と同様に再び超音波画像法を行う。

本明細書で引用した又は記載した各特許、特許出願及び出版物の開示は、引用することによりその全体が本明細書の内容となる。

本明細書に記載のものの他に、前記の説明から種々の修正が当該技術分野における熟練者に明らかであろう。そのような修正も添付の請求の範囲の範囲内に含まれるものとする。

なお、本発明の主たる特徴及び態様を示せば以下のとおりである。

1. (i) 脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小胞組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与し、

(ii) 画像診断法を用いて患者を走査して腎臓部位の可視画像を得ることを含む患者の腎臓部位の画像を与えるための方法。

2. 該小胞が脂質小胞を含む上記第 1 項に記載の方法。

3. 該小胞組成物がミセル及びリポソームから成る群より選ばれる小胞を含む上記第 2 項に記載の方法。

4. 該脂質がリン脂質を含む上記第 2 項に記載の方法。

5. 該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ノ及びホスファチジン酸から成る群より選ばれる上記第 4 項に記載の方法。

6. 該ホスファチジルコリンが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及びジステアロイルホスファチ

ジルコリンからなる群より選ばれる上記第 5 項に記載の方法。

7. 該ホスファチジルコリンがジパルミトイルホスファチジルコリンを含む上記第 6 項に記載の方法。

8. 該ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、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及び 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から成る群より選ばれる上記第 5 項に記載の方法。

9. 該ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含む上記第 8 項に記載の方法。

10. 該ホスファチジン酸がジパルミトリルホスフィチジン酸を含む上記第 5 項に記載の方法。

11. 該脂質がさらにポリマーを含む上記第 3 項に記載の方法。

12. 該ポリマーが親水性ポリマーを含む上記第 11 項に記載の方法。

13. 該親水性ポリマーがポリエチレングリコールを含む上記第 12 項に記載の方法。

14. 該小胞がタンパク質小胞を含む上記第 1 項に記載の方法。

15. 該タンパク質がアルブミンを含む上記第 14 項に記載の方法。

16. 該小胞がポリマー小胞を含む上記第 1 項に記載の方法。

17. 該ポリマーがアクリル酸、メタクリル酸、エチレンイミン、クロトン酸、アクリルアミド、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、2 - ヒドロキシエチルメタクリレート、乳酸、グリコール酸、 $\epsilon$ -カプロラクトン、アクロレイン、シアノアクリレート、シア

10

20

30

40

50

ノメタクリレート、ビスフェノールA、エピクロロヒドリン、ヒドロキシアルキルアクリレート、シロキサン、ジメチルシロキサン、エチレンオキシド、エチレングリコール、ヒドロキシアルキルメタクリレート、N - 置換アクリルアミド、N - 置換メタクリルアミド、N - ビニル - 2 - ピロリドン、2, 4 - ペンタジエン - 1 - オール、酢酸ビニル、アクリロニトリル、スチレン、p - アミノ - スチレン、p - アミノベンジルスチレン、スチレンスルホン酸ナトリウム、2 - スルホキシエチル - メタクリル酸ナトリウム、ビニルピリジン、アミノエチルメタクリレート及び2 - メタクリロイルオキシトリメチル - アンモニウムクロリドから成る群より選ばれるモノマーから製造される合成ポリマーもしくはコポリマーを含む上記第16項に記載の方法。

18. 該ポリマーがポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリシアノメタクリレート、ポリシロキサン、ポリジメチルシロキサン、ポリ乳酸、ポリ(ε - カプロラクトン)、エポキシ樹脂、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレングリコール)、ポリアミド、ポリビニリデン - ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン - ポリアクリロニトリル - ポリメチルメタクリレート及びポリスチレン - ポリアクリロニトリルから成る群より選ばれる合成ポリマーもしくはコポリマーを含む上記第16項に記載の方法。

19. 該ポリマーがポリビニリデン - ポリアクリロニトリルコポリマーを含む上記第18項に記載の方法。

20. 該組成物が気体を含み、該気体がフッ化ガスを含む上記第1項に記載の方法。

21. 該フッ化ガスがペルフルオロカーボンガスである上記第20項に記載の方法。

22. 該ペルフルオロカーボンガスがペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン及びペルフルオロシクロブタンから成る群より選ばれる上記第21項に記載の方法。

23. 該フッ化ガスが六フッ化硫黄及びヘプタフルオロプロパンから成る群より選ばれる上記第20項に記載の方法。

24. 該組成物が気体前駆体を含み、該気体前駆体が約37℃より高い沸点を有する上記第1項に記載の方法。

25. 該気体前駆体がフッ化ガス前駆体を含む上記第24項に記載の方法。

26. 該フッ化ガス前駆体がペルフルオロカーボンガス前駆体を含む上記第25項に記載の方法。

27. 該ペルフルオロカーボンガス前駆体がペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン及びペルフルオロヘプタンから成る群より選ばれる上記第26項に記載の方法。

28. 該画像診断法がコンピューター連動断層撮影画像法を含む上記第1項に記載の方法。

29. 該画像診断法が超音波画像法を含む上記第1項に記載の方法。

30. 該小胞が単ラメラ小胞を含む上記第3項に記載の方法。

31. 該小胞が1つの単層を含む上記第30項に記載の方法。

32. 該脂質がリン脂質を含む上記第31項に記載の方法。

33. 該小胞が1つの二重層を含む上記第30項に記載の方法。

34. 該脂質がリン脂質を含む上記第33項に記載の方法。

35. 該小胞がオリゴラメラ及び多重ラメラ小胞から成る群より選ばれる上記第3項に記載の方法。

36. 該脂質がリン脂質を含む上記第35項に記載の方法。

37. 該腎血管拡張薬が診断画像の輝度を増強する上記第1項に記載の方法。

38. 該腎血管拡張薬が診断画像における診断的アーチファクトを実質的に除去する上記第1項に記載の方法。

39. 該小胞組成物がさらに追加の生物活性薬を含む上記第1項に記載の方法。

40. 該小胞を破裂させるのに十分な超音波エネルギーを適用することをさらに含む上記第1項に記載の方法。

41. 該超音波画像法がパルス状調和画像法であり、該小胞組成物を連続的静脈内輸液に

10

20

30

40

50

より投与する上記第 40 項に記載の方法。

42. 該腎血管拡張薬がアンギオテンシン転換酵素阻害剤である上記第 1 項に記載の方法。

43. 該腎血管拡張薬がスルフヒドリル基を含有する上記第 42 項に記載の方法。

44. 該腎血管拡張薬がカプトプリル、フェンチアプリル、ピバロプリル、ゾフェノプリル及びアラセプリルから成る群より選ばれる上記第 43 項に記載の方法。

45. 該腎血管拡張薬が 2 つのカルボキシル基を含有する上記第 42 項に記載の方法。

46. 該腎血管拡張薬がリシノプリル、ベナゼプリル、キナプリル、モエキシプリル、ラミプリル、スピラプリル、ペリンドプリル、インドラプリル、ペントプリル、インダラプリル、シラザプリル、エナラプリル及びエナラプリラートから成る群より選ばれる上記第 45 項に記載の方法。

10

47. 該腎血管拡張薬がベナゼプリル、エナラプリル及びエナラプリラートから成る群より選ばれる上記第 46 項に記載の方法。 1

48. 該腎血管拡張薬がリンを含有する上記第 42 項に記載の方法。

49. 該腎血管拡張薬がフォシノプリルである上記第 48 項に記載の方法。

50. (i) 脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含む組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与し、(ii) 画像診断法を用いて患者を走査して腎臓部位の可視画像を得ることを含む患者の腎臓部位の画像を与えるための方法。

51. 該組成物が脂質を含む上記第 50 項に記載の方法。

52. 該脂質がリン脂質を含む上記第 51 項に記載の方法。

20

53. 該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及びホスファチジン酸から成る群より選ばれる上記第 52 項に記載の方法。

54. 該ホスファチジルコリンが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及びジステアロイルホスファチジルコリンから成る群より選ばれる上記第 53 項に記載の方法。

55. 該ホスファチジルコリンがジパルミトイルホスファチジルコリンを含む上記第 54 項に記載の方法。

56. 該ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、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及び 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から成る群より選ばれる上記第 53 項に記載の方法。

30

57. 該ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含む上記第 56 項に記載の方法。

58. 該ホスファチジン酸がジパルミトリルホスフィチジン酸を含む上記第 53 項に記載の方法。

59. 該脂質組成物が小胞組成物を含む上記第 51 項に記載の方法。

60. 該小胞組成物がミセル及びリポソームから成る群より選ばれる小胞を含む上記第 59 項に記載の方法。

61. 該脂質組成物が乳濁液、懸濁液又は分散液を含む上記第 59 項に記載の方法。

62. 該脂質がさらにポリマーを含む上記第 51 項に記載の方法。

40

63. 該ポリマーが親水性ポリマーを含む上記第 62 項に記載の方法。

64. 該親水性ポリマーがポリエチレングリコールを含む上記第 63 項に記載の方法。

65. 該組成物がタンパク質を含む上記第 50 項に記載の方法。

66. 該タンパク質がアルブミンを含む上記第 65 項に記載の方法。

67. 該ポリマーがアクリル酸、メタクリル酸、エチレンイミン、クロトン酸、アクリルアミド、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、2 - ヒドロキシエチルメタクリレート、乳酸、グリコール酸、 $\epsilon$ -カプロラクトン、アクロレイン、シアノアクリレート、シアノメタクリレート、ビスフェノール A、エピクロルヒドリン、ヒドロキシアルキルアクリレート、シロキサン、ジメチルシロキサン、エチレンオキシド、エチレングリコール、ヒドロキシアルキルメタクリレート、N - 置換アクリルアミド、N - 置換メタクリルアミド、

50



N - ビニル - 2 - ピロリドン、2, 4 - ペンタジエン - 1 - オール、酢酸ビニル、アクリロニトリル、スチレン、p - アミノ - スチレン、p - アミノベンジルスチレン、スチレンスルホン酸ナトリウム、2 - スルホキシエチル - メタクリル酸ナトリウム、ビニルピリジン、アミノエチルメタクリレート及び2 - メタクリロイルオキシトリメチル - アンモニウムクロリドから成る群より選ばれるモノマーから製造される合成ポリマーもしくはコポリマーを含む上記第 6 2 項に記載の方法。

6 8 . 該ポリマーがポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリシアノメタクリレート、ポリシロキサン、ポリジメチルシロキサン、ポリ乳酸、ポリ( - カプロラクトン)、エポキシ樹脂、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレングリコール)、ポリアミド、ポリビニリデン - ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン - ポリアクリロニトリル - ポリメチルメタクリレート及びポリスチレン - ポリアクリロニトリルから成る群より選ばれる合成ポリマーもしくはコポリマーを含む上記第 6 7 項に記載の方法。

6 9 . 該ポリマーがポリビニリデン - ポリアクリロニトリルコポリマーを含む上記第 6 8 項に記載の方法。

7 0 . 該組成物が気体を含み、該気体がフッ化ガスを含む上記第 5 0 項に記載の方法。

7 1 . 該フッ化ガスがペルフルオロカーボンガスである上記第 7 0 項に記載の方法。

7 2 . 該ペルフルオロカーボンガスがペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン及びペルフルオロシクロブタンから成る群より選ばれる上記第 7 1 項に記載の方法。

7 3 . 該フッ化ガスが六フッ化硫黄及びヘプタフルオロプロパンから成る群より選ばれる上記第 7 0 項に記載の方法。

7 4 . 該組成物が気体前駆体を含み、該気体前駆体が約 3 7 °C より高い沸点を有する上記第 5 0 項に記載の方法。

7 5 . 該気体前駆体がフッ化ガス前駆体を含む上記第 7 4 項に記載の方法。

7 6 . 該フッ化ガス前駆体がペルフルオロカーボンガス前駆体を含む上記第 7 5 項に記載の方法。

7 7 . 該ペルフルオロカーボンガス前駆体がペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン及びペルフルオロヘプタンから成る群より選ばれる上記第 7 6 項に記載の方法。

7 8 . 該画像診断法がコンピューター連動断層撮影画像法を含む上記第 5 0 項に記載の方法。

7 9 . 該画像診断法が超音波画像法を含む上記第 5 0 項に記載の方法。

8 0 . 該小胞が単ラメラ小胞を含む上記第 6 0 項に記載の方法。

8 1 . 該小胞が 1 つの単層を含む上記第 8 0 項に記載の方法。

8 2 . 該脂質がリン脂質を含む上記第 8 1 項に記載の方法。

8 3 . 該小胞が 1 つの二重層を含む上記第 8 0 項に記載の方法。

8 4 . 該脂質がリン脂質を含む上記第 8 3 項に記載の方法。

8 5 . 該小胞がオリゴラメラ及び多重ラメラ小胞から成る群より選ばれる上記第 6 0 項に記載の方法。

8 6 . 該脂質がリン脂質を含む上記第 8 5 項に記載の方法。

8 7 . 該腎血管拡張薬が診断画像の輝度を増強する上記第 5 0 項に記載の方法。

8 8 . 該腎血管拡張薬が診断画像における診断的アーチファクトを実質的に除去する上記第 5 0 項に記載の方法。

8 9 . 該小胞組成物がさらに追加の生物活性薬を含む上記第 5 0 項に記載の方法。

9 0 . 腎動脈の血管拡張を誘導する薬剤を造影剤と組み合わせて患者に投与することを含む患者の腎臓部位の診断画像における診断的アーチファクトを実質的に除去するための方法。

9 1 . 診断画像がコンピューター連動断層撮影画像を含む上記第 9 0 項に記載の方法。

9 2 . 診断画像が超音波画像を含む上記第 9 0 項に記載の方法。

9 3 . 診断的アーチファクトがコンピューター連動断層撮影アーチファクトを含む上記第

10

20

30

40

50

- 9 0 項に記載の方法。
- 9 4 . 診断的アーチファクトが超音波アーチファクトを含む上記第 9 0 項に記載の方法。
- 9 5 . 該造影剤が脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含有する小胞組成物を含む上記第 9 0 項に記載の方法。
- 9 6 . 該小胞組成物が脂質小胞を含む上記第 9 5 項に記載の方法。
- 9 7 . 該小胞がミセル及びリポソームから成る群より選ばれる上記第 9 6 項に記載の方法。
- 9 8 . 該組成物が気体を含み、該気体がフッ化ガスを含む上記第 9 5 項に記載の方法。
- 9 9 . 該フッ化ガスがペルフルオロカーボンガスである上記第 9 8 項に記載の方法。
- 1 0 0 . 該ペルフルオロカーボンガスがペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン及びペルフルオロシクロブタンから成る群より選ばれる上記第 9 9 項に記載の方法。 10
- 1 0 1 . 該フッ化ガスが六フッ化硫黄及びヘプタフルオロプロパンから成る群より選ばれる上記第 9 9 項に記載の方法。
- 1 0 2 . 該組成物が気体前駆体を含み、該気体前駆体が約 3 7 °C より高い沸点を有する上記第 9 5 項に記載の方法。
- 1 0 3 . 該気体前駆体がフッ化ガス前駆体を含む上記第 1 0 2 項に記載の方法。
- 1 0 4 . 該フッ化ガス前駆体がペルフルオロカーボンガス前駆体を含む上記第 1 0 3 項に記載の方法。
- 1 0 5 . 該ペルフルオロカーボンガス前駆体がペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン及びペルフルオロヘブタンから成る群より選ばれる上記第 1 0 4 項に記載の方法。 20
- 1 0 6 . 該造影剤が脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含有する組成物を含む上記第 9 5 項に記載の方法。
- 1 0 7 . 該組成物が脂質組成物である上記第 9 5 項に記載の方法。
- 1 0 8 . 該脂質組成物が乳濁液、懸濁液又は分散液である上記第 1 0 7 項に記載の方法。
- 1 0 9 . 該組成物が気体を含み、該気体がフッ化ガスを含む上記第 1 0 6 項に記載の方法。
- 1 1 0 . 該フッ化ガスがペルフルオロカーボンガスである上記第 1 0 9 項に記載の方法。
- 1 1 1 . 該ペルフルオロカーボンガスがペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン及びペルフルオロシクロブタンから成る群より選ばれる上記第 1 1 0 項に記載の方法。 30
- 1 1 2 . 該フッ化ガスが六フッ化硫黄及びヘプタフルオロプロパンから成る群より選ばれる上記第 1 1 0 項に記載の方法。
- 1 1 3 . 該組成物が気体前駆体を含み、該気体前駆体が約 3 7 °C より高い沸点を有する上記第 1 0 6 項に記載の方法。
- 1 1 4 . 該気体前駆体がフッ化ガス前駆体を含む上記第 1 1 3 項に記載の方法。
- 1 1 5 . 該フッ化ガス前駆体がペルフルオロカーボンガス前駆体を含む上記第 1 1 4 項に記載の方法。
- 1 1 6 . 該ペルフルオロカーボンガス前駆体がペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン及びペルフルオロヘブタンから成る群より選ばれる上記第 1 1 5 項に記載の方法。 40
- 1 1 7 . 腎動脈の血管拡張を誘導する該薬剤がアンギオテンシン転換酵素阻害剤である上記第 9 0 項に記載の方法。
- 1 1 8 . 該アンギオテンシン転換酵素阻害剤がスルフヒドリル基を含有する上記第 1 1 7 項に記載の方法。
- 1 1 9 . 該アンギオテンシン転換酵素阻害剤がカプトプリル、フェンチアプリル、ピバロプリル、ゾフェノプリル及びアラセプリルから成る群より選ばれる上記第 1 1 8 項に記載の方法。
- 1 2 0 . 該アンギオテンシン転換酵素阻害剤が 2 つのカルボキシル基を含有する上記第 1 1 6 項に記載の方法。
- 1 2 1 . 該アンギオテンシン転換酵素阻害剤がリシノプリル、ベナゼプリル、キナプリル 50

、モエキシプリル、ラミプリル、スピラプリル、ペリンドプリル、インドラプリル、ペン  
トプリル、インダラプリル、シラザプリル、エナラプリル及びエナラプリラートから成  
群より選ばれる上記第 1 2 0 項に記載の方法。

1 2 2 . 該アンギオテンシン転換酵素阻害剤がベナゼプリル、エナラプリル及びエナラ  
プリラートから成る群より選ばれる上記第 1 2 1 項に記載の方法。

1 2 3 . 該アンギオテンシン転換酵素阻害剤がリンを含有する上記第 1 1 7 項に記載の  
方法。

1 2 4 . 該アンギオテンシン転換酵素阻害剤がフォシノプリルである上記第 1 2 3 項に記  
載の方法。

1 2 5 . ( i ) 脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小  
胞組成物を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与し、( i i ) 画像診断法を用いて患者  
を走査して患者の腎臓部位における疾患の可視画像を得ることを含む患者の腎臓部位に  
おける腎疾患の存在を診断するための方法。

10

1 2 6 . 腎疾患が腎動脈性高血圧である上記第 1 2 5 項に記載の方法。

1 2 7 . ( i ) 脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含む組成物  
を腎血管拡張薬と組み合わせて患者に投与し、( i i ) 画像診断法を用いて患者を走査し  
て患者の腎臓部位における疾患の可視画像を得ることを含む患者の腎臓部位における腎疾  
患の存在を診断するための方法。

1 2 8 . 腎疾患が腎動脈性高血圧である上記第 1 2 7 項に記載の方法。

1 2 9 . 脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小胞組成  
物を腎血管拡張薬と組み合わせて含む画像診断法のための造影剤。

20

1 3 0 . 脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含む組成物を腎血  
管拡張薬と組み合わせて含む画像診断法のための造影剤。

1 3 1 . ( i ) 脂質、タンパク質又はポリマー小胞及び気体もしくは気体前駆体を含む小  
胞組成物を患者に投与し、( i i ) 画像診断法を用いて患者を走査して腎臓部位の可視画  
像を得、( i i i ) 腎血管拡張薬を患者に投与し、( i v ) 該走査を続け、( v ) 段階 ( i i )  
から ( i v ) で得られる画像におけるビデオ濃度対時間の関係から血流を決定する  
ことを含む患者の腎臓部位における血流を測定するための方法。

1 3 2 . 該小胞組成物を患者に投与して腎臓部位における小胞組成物の実質的に一定の濃  
度を維持する上記第 1 3 1 項に記載の方法。

30

1 3 3 . 該投与が一定の投与を含む上記第 1 3 2 項に記載の方法。

1 3 4 . 一定輸液装置を用いて該小胞組成物を投与することを含む上記第 1 3 3 項に記載  
の方法。

1 3 5 . 該一定輸液装置がパワーインジェクターを含む上記第 1 3 4 項に記載の方法。

1 3 6 . 該画像診断法が超音波画像法及びコンピューター連動断層撮影画像法から成る群  
より選ばれる上記第 1 3 1 項に記載の方法。

1 3 7 . 該画像診断法が超音波画像法を含む上記第 1 3 6 項に記載の方法。

1 3 8 . 該小胞が脂質小胞を含む上記第 1 3 1 項に記載の方法。

1 3 9 . 該小胞がミセル及びリポソームから成る群より選ばれる小胞を含む上記第 1 3 8  
項に記載の方法。

40

1 4 0 . 該脂質がリン脂質を含む上記第 1 3 8 項に記載の方法。

1 4 1 . 該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及びホス  
ファチジン酸から成る群より選ばれる上記第 1 4 0 項に記載の方法。

1 4 2 . 該ホスファチジルコリンが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及びジステアロイルホス  
ファチジルコリンから成る群より選ばれる上記第 1 4 0 項に記載の方法。

1 4 3 . 該ホスファチジルコリンがジパルミトイルホスファチジルコリンを含む上記第 1  
4 2 項に記載の方法。

1 4 4 . 該ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノール  
アミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、N - スクシニルジオレオイルホ

50

スファチジルエタノールアミン及び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から成る群より選ばれる上記第141項に記載の方法。

145. 該ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含む上記第144項に記載の方法。

146. 該ホスファチジン酸がジパルミトリルホスフィチジン酸を含む上記第141項に記載の方法。

147. 該脂質がさらにポリマーを含む上記第138項に記載の方法。

148. 該ポリマーが親水性ポリマーを含む上記第147項に記載の方法。

149. 該親水性ポリマーがポリエチレングリコールを含む上記第148項に記載の方法。

10

150. 該小胞がポリマー小胞を含む上記第131項に記載の方法。

151. 該ポリマーがアクリル酸、メタクリル酸、エチレンイミン、クロトン酸、アクリルアミド、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、乳酸、グリコール酸、 $\epsilon$ -カプロラクトン、アクロレイン、シアノアクリレート、シアノメタクリレート、ビスフェノールA、エピクロルヒドリン、ヒドロキシアルキルアクリレート、シロキサン、ジメチルシロキサン、エチレンオキシド、エチレングリコール、ヒドロキシアルキルメタクリレート、N-置換アクリルアミド、N-置換メタクリルアミド、N-ビニル-2-ピロリドン、2,4-ペンタジエン-1-オール、酢酸ビニル、アクリロニトリル、スチレン、p-アミノ-スチレン、p-アミノベンジルスチレン、スチレンスルホン酸ナトリウム、2-スルホキシエチル-メタクリル酸ナトリウム、ビニルピリジン、アミノエチルメタクリレート及び2-メタクリロイルオキシトリメチル-アンモニウムクロリドから成る群より選ばれるモノマーから製造される合成ポリマーもしくはコポリマーを含む上記第150項に記載の方法。

20

152. 該ポリマーがポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリメタクリル酸、ポリシアノメタクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリシロキサン、ポリジメチルシロキサン、ポリ乳酸、ポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)、エポキシ樹脂、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレングリコール)、ポリアミド、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル-ポリメチルメタクリレート及びポリスチレン-ポリアクリロニトリルから成る群より選ばれる合成ポリマーもしくはコポリマーを含む上記第151項に記載の方法。

30

153. 該ポリマーがポリビニリデン-ポリアクリロニトリルコポリマーを含む上記第152項に記載の方法。

154. 該気体がフッ化ガスを含む上記第131項に記載の方法。

155. 該フッ化ガスがペルフルオロカーボン、六フッ化硫黄及びヘプタフルオロプロパンから成る群より選ばれる上記第154項に記載の方法。

156. 該フッ化ガスがペルフルオロカーボンを含む上記第154項に記載の方法。

157. 該ペルフルオロカーボンガスがペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン及びペルフルオロシクロブタンから成る群より選ばれる上記第156項に記載の方法。

158. 該気体前駆体が約37℃より高い沸点を有する上記第131項に記載の方法。

40

159. 該気体前駆体がフッ化化合物を含む上記第158項に記載の方法。

160. 該フッ化化合物がペルフルオロカーボンを含む上記第159項に記載の方法。

161. 該ペルフルオロカーボンがペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン及びペルフルオロヘプタンから成る群より選ばれる上記第160項に記載の方法。

162. 該画像法が超音波画像法を含む上記第96項に記載の方法。

163. 該小胞を破裂させるのに十分な超音波エネルギーを適用する段階をさらに含む上記第162項に記載の方法。

164. 該小胞を破裂させるのに十分な超音波エネルギーの適用をさらに含み、該適用を段階(i i)及び(i v)の間に行う上記第162項に記載の方法。

165. 該小胞組成物を連続的静脈内輸液により投与する上記第164項に記載の方法。

50

166. (i) 脂質、タンパク質又はポリマー及び気体もしくは気体前駆体を含む組成物を患者に投与し、(ii) 画像診断法を用いて患者を走査して腎臓部位の可視画像を得、(iii) 腎血管拡張薬を患者に投与し、(iv) 該走査を続け、(v) 段階(ii) から(iv) で得られる画像におけるビデオ濃度対時間の関係から血流を決定することを含む患者の腎臓部位における血流を測定するための方法。

---

フロントページの続き

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 伊藤和夫, 核医学, 1995年, 第32巻4号, 435 - 439

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A61K 49/00

A61K 45/08

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)