

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-263804

(P2005-263804A)

(43) 公開日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 K 49/00

A 6 1 K 9/127

F I

A 6 1 K 49/00

A 6 1 K 9/127

C

テーマコード (参考)

4 C O 7 6

4 C O 8 5

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2005-77072 (P2005-77072)
 (22) 出願日 平成17年3月17日 (2005.3.17)
 (62) 分割の表示 特願平8-526274の分割
 原出願日 平成8年2月15日 (1996.2.15)
 (31) 優先権主張番号 08/395,680
 (32) 優先日 平成7年2月28日 (1995.2.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505099853
 アイエムシーオーアール ファーマシュー
 ティカル カンパニー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21 サン ディエゴ ラスク ブールバ
 ード 6175
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実
 (74) 代理人 100098268
 弁理士 永田 豊
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超音波のコントラスト増強のためのリン脂質を含む安定な気体エマルジョン

(57) 【要約】

【課題】 生体適合性で、簡単に調製でき、超音波画像化で優れたコントラスト増強を提供する寿命の長いコントラスト増強剤を提供する。

【解決手段】 N_2 、 CO_2 及び O_2 からなる群から選択される気体又はそれらの混合物を含む第一気体と、パーフルオロカーボンである第二気体とを含む気体混合物を含み、気体混合物は膜形成材料により囲まれている、液体媒体中の安定化気体封入微小泡製剤であって、第一気体及び第二気体は、約1:100~1000:1のモル比で存在し、第一気体は、37℃で少なくとも約(760-x)mmHgの蒸気圧を有し、xは、第二気体の37℃での蒸気圧であり、第一気体及び第二気体のそれぞれの蒸気圧は37℃で約75mmHgより大きく、第一気体及び第二気体は水蒸気ではない、前記製剤。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N₂、CO₂及びO₂からなる群から選択される気体又はそれらの混合物を含む第一気体と、パーフルオロカーボンである第二気体とを含む気体混合物を含み、気体混合物は膜形成材料により囲まれている、液体媒体中の安定化気体封入微小泡製剤であって、第一気体及び第二気体は、約1：100～1000：1のモル比で存在し、第一気体は、37℃で少なくとも約(760-x)mmHgの蒸気圧を有し、xは、第二気体の37℃での蒸気圧であり、第一気体及び第二気体のそれぞれの蒸気圧は37℃で約75mmHgより大きく、第一気体及び第二気体は水蒸気ではない、前記製剤。

【請求項 2】

パーフルオロカーボンが、パーフルオロメタン、パーフルオロエタン、パーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロシクロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロシクロヘキサン、パーフルオロヘプタン、パーフルオロシクロヘプタン、パーフルオロオクタン及びパーフルオロシクロオクタンからなる群から選択されるか又はそれらの混合物である請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 3】

膜形成材料が界面活性剤である請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 4】

膜形成材料が少なくとも1種のリン脂質を含む請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 5】

膜形成材料がアルブミンを含む請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 6】

第一気体及び第二気体が、約1：10～100：1のモル比で存在する請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 7】

リン脂質がDMPCである請求項4記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 8】

液体媒体が水系である請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 9】

液体媒体及び微小泡が容器中にある請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 10】

液体媒体がin vivoの血液である請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 11】

安定化気体封入微小泡製剤が液体媒体中に調製される時に微小泡が第一平均直径を有しており、微小泡が、第一気体が該媒体中へ失われるために前記液体媒体中で第一直径の約75%よりも小さい第二平均直径に収縮し、該媒体に対する気体浸透圧の差のために第二直径又はその直径付近で少なくとも約1分間安定化されたままであるようにされている請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 12】

第一直径が約10ミクロンであり、第二直径が1～6ミクロンである請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 13】

微小泡が機械的振盪若しくは振動、又は、単純振盪、又は、温和な攪拌により形成された請求項1記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 14】

パーフルオロカーボンが、パーフルオロプロパン、パーフルオロブタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロヘプタン及びパーフルオロオクタンからなる群から選択されるか又はそれらの混合物である請求項1記載の安定化気体封入微小泡製

10

20

30

40

50

剤。

【請求項 15】

微小泡が浸透圧により安定化された請求項 11 記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 16】

微小泡が診断画像化に使用される請求項 1 記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 17】

微小泡が少なくとも 20 秒の半減期を有する請求項 1 記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 18】

第一気体が窒素であり、第二気体がパーフルオロヘキサンである請求項 1 記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【請求項 19】

界面活性剤が蛋白性である請求項 3 記載の安定化気体封入微小泡製剤

10

。

【請求項 20】

リン脂質が微小泡上に単層形態で存在する請求項 4 記載の安定化気体封入微小泡製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、超音波のコントラスト増強のため及び他の用途のための、安定で長期間持続する気体エマルジョンの製造方法とそれによって製造された気体エマルジョンの組成物に関する。

20

【背景技術】

【0002】

超音波技術は、電離放射線を用いる造影法に代わる、重要でより経済的な手段を提供している。従来の相当数の造影技術、例えば磁気共鳴造影 (MRI)、コンピューター断層撮影 (CT)、陽電子コンピューター断層撮影 (PET) などにも利用できるが、これらの技術は総じて極めて高価な装置を用いる。さらに、CTとPETは電離放射線を用いる。これらの技術と異なり、超音波撮影装置は比較的廉価である。さらに、超音波撮影装置は電離放射線を用いない。

【0003】

超音波撮影装置は、組織による音波の反射に影響する組織の密度と組成の違いを利用している。組織の密度や圧縮率の違いがある場所、つまり組織の境界で画像は極めて鮮明である。固体の組織、骨格系、様々な臓器及び／または腫瘍の間は容易に超音波で画像化できる。

30

【0004】

従って、多くの画像化の応用において超音波画像装置はコントラスト増強剤を用いずに適切に機能するが、しかし、例えば血流の画像化の様な他の適用にはコントラスト増強剤を開発する努力が続けられている。そのようなコントラスト増強剤の特に重要な適用のひとつは、還流の画像化の領域である。そのような超音波造影剤は、心筋、腎臓、肝臓、他の組織における血流の画像を改良することができるであろう。これは続いて画像化した組織に関連した研究、診断、手術、及び治療を促進するであろう。血液プールの造影剤はまた、血液容量に基づいた (例えば腫瘍と炎症組織) 画像化を可能とし、また、母体循環のみを増強することによって胎盤及び胎児の画像化を補佐するであろう。

40

【0005】

様々な超音波コントラスト増強剤が提供されている。最も成功している薬剤は一般的に、静脈内投与もできる気体の小さな泡の分散体からなる。最も典型的には、泡は画像化される生体の血流中に注射される。それから、泡は周辺の流動体組織や血液と比べて、異なる密度及び高い圧縮率を有する、流血中の物理的な実体を提供する。結果として、泡は簡単に超音波によって画像化される。血管を流れるために、泡は直径 10 μm 以下である必要があり、微小泡と呼ばれる。微小泡は様々な異なる方法で液体中で作製される。簡単な

50

例としては、勢いよく攪拌することやあるいは小さな穴を通して気体を液体中に吹き込むことがある。他の成分の添加が無いときは、気体は凝縮媒体に直接接触するであろう（即ち、むき出しの泡）。しかし、そのような泡は、捕捉された気体が囲まれた液体中に拡散するためにすぐに小さくなる傾向にある。また、「むき出しの」微小泡は補体の活性化の様な副作用を生じることが示されている（たとえば、K.A. Shastri et al. (1991) Under sea Biomed. Res., 18, 157参照）。微小泡の有益性を増大させるためにその寿命を延ばす試みとして、囲んでいる液体に気体が拡散するのを遅延させるように、気体泡を封入することができる安定化剤の添加に焦点が当たっている。

【0006】

数分間そのまま放置すると、ほとんどの微小泡の組成物では、例えば数秒でも持続するコントラストの増強作用をもたらすことができなかった。これはかなりその利用価値を制限する。従って、微小泡はこれまで、効果的なコントラスト増強時間を延長させることを期待して、様々な方法で「構築」されてきた。様々な手法が行われており、例えばゼラチンやアルブミンの微小球(microsphere)の利用ではまず最初に液体懸濁液の形態で形成し、固体化させる過程で気体を封入する。しかし、気体を封入している固相の殻は、気体が生体内で満足できるだけ寿命をもつには脆弱あるいは透過性過ぎることが一般的に証明されている。更に、厚い殻（例えば、アルブミン、糖、あるいは他の粘性の物質）は小泡の圧縮率を減少させる。従って、それらが持続している短い時間における反射生成率を減少させる。注射時にガスあるいは泡を放出する固体粒子あるいは液体エマルジョンの小滴は、（Quay, P C T / U S 9 4 / 0 0 4 2 2 のように）血液が気体あるいは蒸気で過飽和になる危険が生じる。これは、予定された多数の小泡よりもむしろ、利用できる核となりうる部位がある場所で少数の塞栓形成性の大きな気泡の形成を導くことになろう。また、生体内でこのように形成された泡は「むき出し」であり、結果として前述したように補体活性化の問題を有するであろう。

【0007】

気泡分散体の安定化剤としての界面活性剤の使用もまた、検討されている。界面活性剤は、極性物質と非極性物質の界面で、界面層を形成する傾向のある物質である。その「界面活性」の挙動は、極性物質と相互作用する傾向のある親水性領域（普通「頭(head)」と呼ばれる一端をしばしば構成する）と、非極性物質と相互作用する傾向のある疎水性領域（普通「尾(tail)」と呼ばれる他端をしばしば構成する）の両者の存在から生じる。確立されると、界面層は極性/非極性界面の性質に影響を与える。界面活性剤が存在するとき、様々な界面活性物質から構築される界面層によって、気体は液体から切り離される。

【0008】

界面活性剤を含有するいくつかのコントラスト増強剤は、別の様式例えばリポソームの水性コア中に気泡を捉える。リポソームは単層あるいは複数層の同中心で閉じた二分子リン脂質層によって閉ざされた水性コアからなる、おおよそ球状の「バッグ」である。リン脂質は細胞膜の天然成分であるがまた、界面活性の特性を有することでもよく知られている。Ungerの米国特許第5, 334, 381号において、気泡を含むリポソームはいくつかの異なるメカニズムで作られている。Ryanらの米国特許第4, 900, 540号ではまた、気体あるいは気体前駆物質を含有するリン脂質リポソームが開示されている。おそらく、リポソーム中に捉えられた気泡はゆっくりと漏れだし、それによって造影剤の効果は増大する。界面活性剤のこの使用は、気体／液体界面における界面活性剤の界面層の存在を意味するのではないといえよう。むしろ、小さな気泡は、単一あるいは多層リポソーム構造によってそれ自身束縛された多量の水性液体中に捉えられている。

【0009】

界面活性剤含有造影剤は、他の方法でリポソームを使用し得る。例えば、Schneiderらの米国特許第5, 380, 519号および第5, 271, 928号では、凍結乾燥リポソームから調製された微小泡が記載されている。この開示によると、リポソーム懸濁液を凍結乾燥することによって作製された乾燥した微粉状物の水中への再構築は、水充填リポソームの懸濁液中において気泡の分散を生じさせる。そのようにして調製された微小泡は、

10

20

30

40

50

界面活性剤の「どちらかと言えばはかない(rather evanescent)」外殻によって取り囲まれていると述べられている。そのようなはかない界面活性剤の層は持続性がないであろうし、そのような微小泡はしたがって長時間では不安定であることが一般的に予想される。Schneiderらは、隣接した水充填リポソーム中あるいはそこからの層状の界面活性剤が、系中に微小泡の形で存在する気体を安定化すると述べている。

【0010】

リポソーム依存コントラスト増強剤はリポソームの予めの形成を必要とし、したがってリポソームを形成することのできるタイプに安定化界面活性剤の主成分が限定されることが容易に理解されよう。更に、リポソーム調製は、複雑で時間のかかる製造となる。

【0011】

安定化成分あるいは構造の存在下でさえ、ラプラスの式($\Delta P = 2\gamma / r$)によって示されるように、囲んでいる界面活性剤の表面張力のために、捉えられた気体は泡の中で圧力が増している。気体は高圧部位(泡中)から低圧の環境(この上昇圧力において気体で飽和していない周りの液体中や大きな直径で低圧の泡中のいずれか)へ移行するので、この増大した圧力は更に、泡の縮みや消失を促進する。

【0012】

そのような問題に対処する一つの提案が、Quay, PCT/US92/07250に概説してある。Quayは、体温(37℃)において気体であり、水溶性が少なく、より密度が高く、空気に比較して溶液中での気体拡散が少ないことを基本にして選択した気体を用いて、泡を形成した。水溶性と拡散性の減少は、気体が泡から離れる率に影響を与えることはできたが、Quayの泡には非常に多くの問題が残っている。十分に小さな直径(即ち3~5μm)の泡の形成には高エネルギーの投入が必要である。これは、複雑な泡の調製システムが使用の際に提供されなければならないという不利益性を有する。更に、Quayの気体選択基準は泡の縮みの主要原因、即ち泡の表面張力の効果、界面活性剤及び気体浸透効果を考慮していないために正しくない。これらの間違いによって、不適格な気体を選択してしまったり、最適な気体を排除したりする結果となる。

【0013】

従って、組成物およびそのような組成物を調製する方法において、生体適合性で、簡単に調製でき、超音波画像化で優れたコントラスト増強を提供する寿命の長いコントラスト増強剤を提供し使用する必要が存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明によれば、泡安定化剤として界面活性剤の混合物を取り入れた気体エマルジョン超音波コントラスト増強媒体が提供される。少なくともそのような界面活性剤の一つは、疎水性のリン脂質あるいはリン脂質混合物である。少なくとも第二の界面活性剤は、リン脂質あるいはリン脂質混合物であっても、そうでなくてもよいが、第一の界面活性剤として提供されたリン脂質あるいはリン脂質混合物よりもより親水性である。そのようなリン脂質安定化気体エマルジョンは生体内における寿命が延びている。

【0015】

本発明の一つの実施態様として、気体エマルジョン混合物は、まず、親水性モノマーもしくはポリマーまたはそれらの組合せ、第一及び第二の界面活性剤並びに膨張剤(inflating agent)を水性溶液に分散することによって調製される。第一の界面活性剤は10個以上の炭素原子を含む一つ以上のアシル鎖を有するリン脂質またはリン脂質混合物であり、全界面活性剤の少なくとも約5%w/wを構成し、第二の界面活性剤は第一の界面活性剤よりも水溶性が高い。

【0016】

次いで、分散体は、膨張剤を蒸発させ、乾燥した粒子状でほぼ微小球形の材料(dry, hollow, particulate, approximately microspherical material)を作るために噴霧乾燥する。この乾燥した粒子状の材料は少なくとも第一の気体に曝し、それから水性液体(aqueo

10

20

30

40

50

us liquid)に溶解させることができる。それによって水性気体エマルジョン組成物が生成され、その組成物は第一及び第二の界面活性剤の層によって囲まれた気体の泡を含む。安定性はリポソームに非依存性である。

【0017】

第二の界面活性剤はさまざまな材料から構成され得る。いくつかの具体的な例としては、脂肪酸、脂肪酸塩、脂肪酸の糖エステル、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンコポリマー、非イオン性アルキルグルコシド、ポリソルベートが挙げられる。特に適した気体エマルジョンは、第二の界面活性剤が、それぞれアシル鎖が14個以下の炭素原子を含む、一つ以上のアシル鎖を有するリン脂質あるいはリン脂質混合物を含むときに調製される。親水性のモノマーもしくは、ポリマーまたはその組合せはでんぷんであってもよい。

10

【0018】

乾燥した粒子状の材料に浸透する気体あるいは気体混合物も、空気、窒素、二酸化炭素、あるいは血中に通常に存在する他の気体を含む広範囲の物質から選択することができ、それはまた、フルオロカーボンの様な有機材料であってもよい。準備される気体のうち一つは、37℃で760mmHg未満の蒸気圧を有することが好ましい。特に好ましい態様では、パーフルオロヘキサンで飽和した窒素を使用する。

【0019】

本発明はまた、気体が浸透した乾燥した粒子状の気体エマルジョン生成組成物の容器、物体または身体の一部もしくは体腔にリン脂質含有気体エマルジョン組成物を導入することによって物体または身体の一部もしくは体腔を画像化する方法、及び超音波によって身体の一部もしくは一部を画像化する方法を含む。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本明細書においては、微小泡は直径が0.5と300 μm の間の、好ましくは200、100、または50 μm 以下の直径を有する水性培地中の気泡であると考えられる。微小泡は気体/液体界面に層あるいはコーティングを有してもよいし、そうでなくてもよい。もし存在するならば、コーティングは一つあるいはそれ以上の分子の厚さであってもよい。加えて、微小泡は二分子層によって捉えられていてもよいし（単一層リポソームの場合）、二重層のいくつかの層によって捉えられていてもよい（多層粒子）。微小泡はまた、変成蛋白質のようにより耐久性のある殻のような構造によって囲まれていてもよい。エマルジョンは、界面活性剤の界面によって安定化された二つ以上の混和できない溶液の分散体と定義されているように、本発明の気体分散体は本質的に、液体ではなく気体であるエマルジョンの不連続相を有する気体エマルジョンである。従って、本明細書における気体エマルジョンという用語は、水性媒体中の複数の微小泡の分散体を意味する。

30

【0021】

血管内での使用のための最適の泡の大きさは、二つの競争的な観点から決定される。より小さな泡が小さな血管や毛細血管を通じて循環するには効果的であるが、超音波の反響性(echogenicity)は泡の大きさに強く依存する。血管超音波コントラスト増強に適している微小泡はしたがって、直径1~10 μm が好ましく、3~5 μm が特に好ましい。

40

【0022】

本発明は、泡の生体内での寿命が延長されており、超音波や磁気共鳴画像法(MRI)コントラスト増強剤として使用されるのに適した気体分散体あるいはエマルジョンを提供する。典型的な超音波増強剤は、動脈系の約一回の通過のみで、あるいは数秒から約一分のみで可能なコントラスト増強を示し、従って、静脈内投与を受けた患者においては大動脈を過ぎては残存していない。これに比較すると、本発明に従って調製された造影剤は、静脈内投与を受けた患者の全循環系を複数回通過してもコントラスト増強を示し続ける。数分間の泡の存続は簡単に示される。超音波の利用においてコントラスト増強能力のそのような長さは非常に有益である。加えて、本発明のコントラスト増強剤は、優れた画像を提供する。例えば心臓、肝臓及び腎臓の血流の明確で、鮮明で、はっきりとした画像が得

50

られる。少量の毒性のない用量で末梢血管に投与することができ、全身の画像を増強するのに使用できる。

【0023】

静脈内超音波造影剤で使用するためには泡が最も有効な超音波散乱剤であることが示されたので、主な実施上の問題は、浮遊状態で毛細血管を通過するのに必要な小さな（典型的には直径5ミクロン未満）泡の非常に短い寿命である。この短い寿命は、泡に作用する表面張力から生じる泡内の気体圧力の上昇により引き起こされる。泡の直径が減少するにつれて、内部のこの上昇圧力が増加する。増加した内部の気体圧力は、泡の中の気体を溶解させ、気体は溶液になるので泡は潰れる。ラプラスの式、 $\Delta P = 2\gamma / r$ （ ΔP は泡中の増加した気体圧力、 γ は泡の膜の表面張力、 r は泡の半径を表わす）は、囲まれた泡の表面あるいは膜によって気泡に働く圧力を示す。ラプラスの圧力は、泡の半径に反比例し、従って、泡が縮むに従ってラプラス圧力は上昇し、泡の外に気体が拡散する速度と泡が縮む速度が上昇する。

10

【0024】

一実施態様において、本発明は、他の界面活性剤あるいは他のリン脂質を含有する組成物に比べ特定の利点を有するリン脂質の界面活性剤気体分散体組成物を企画している。好ましい実施態様において、組成物は、多数の微小泡を形成するのを助け、小泡と液体との気体／液体界面での表面張力を至適に減少させるために2種あるいはそれ以上の界面活性剤を含有している。さらに、水溶性の低い気体は微小泡中の気体の少なくとも一部を構成することが有利である。気体の捕捉を改善するために安定化界面活性剤の組合せとして、高い水溶性を示す第二の界面活性化剤をリン脂質と共に用いることは特に有利であると判明した。

20

【0025】

気体エマルジョンの安定性は、エマルジョン化剤として用いる界面活性剤の表面張力を減少させる特性に強く依存している。肺界面活性物質における主要な成分としてその機能が知られているリン脂質はこの観点から言うと非常に有効である。本発明における気体分散体の安定化において必ずしも必要な性質ではないが、リン脂質はまた容易に二重膜やリポソームのような薄層構造を形成する。気体エマルジョンの安定性のもう一つの決定因子は気体そのものであり、下記に説明するようにガスの浸透圧効果を介したその安定化特性である。この組合せによって、驚異的に安定で且つ現実的に有用な微小泡が得られる。

30

【0026】

本発明による気体分散体組成物は、リン脂質を含む第一界面活性剤、好ましくは少なくとも一つの別の共界面活性剤（co-surfactant、第二界面活性剤とも呼ぶ）及び水溶性のモノマーもしくはポリマーまたはその組合せの水分散液を噴霧乾燥することによって調製することができる。水性開始材料は、任意に塩及び／または膨張剤を含有してもよい。本発明によるそのような液体を噴霧乾燥させると、乾燥した中空の粒子状でほぼ微小球形の材料になる。

【0027】

水溶性の成分（例えばヒドロキシエチル澱粉、塩）と比較的水溶性の界面活性剤（例えばPluronic F-68, Tween 20, ジオクトノイルホスファチジルコリン）およびリン脂質（例えば卵黄リン脂質）から成る、予め生成された球形の中空物質は、噴霧乾燥によって作製した物理的形状においては、再度水和状態にさせると格段に安定な微小泡を形成することができることが発見されたことは驚くべきことである。界面活性剤はリポソームあるいは他の薄膜構造を取っている必要はない。界面活性剤と構造的な成分の溶解による浸透の後に球形の中空（0.5～10ミクロン直径）の内表面に最初に接する水に起因していると考えられ、結果として最初に飽和した界面活性剤溶液で囲まれた望ましいの大きさ（腔の大きさ）の小泡を形成することとなり、従って最適な最大にパックされた界面活性剤コーティングを有することになる。これらの泡は、水溶性の気体（例えば、空気や窒素）で満たしたときでさえ生体内で非常に安定である。

40

【0028】

50

この過程とそれによって得られた乾燥し再構築した製品についても以下に、より詳細に説明し記載する。

【0029】

I. リン脂質を含有する前駆物質の調製 分散：

次の噴霧乾燥のため、第一の界面活性剤として疎水性リン脂質と、それに加えて少なくとも1つ以上の親水性の界面活性剤とを含有する第一の水性溶液を調製する。好ましくは、疎水性リン脂質は、全部で約10個以上の炭素原子(例えばデカノイルリン脂質)を有する1つ以上のアシル鎖を有する。いくつかの実施態様では、リン脂質第一界面活性剤は約10あるいは14から約20あるいは24個の炭素原子のアシル鎖を有する。例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリン(各々16個の炭素原子を含む2本のアシル鎖を含む)が使用できる。アシル鎖は水素化(hydrogenated)されていてもフルオロ化されていても良い。他のリン脂質の頭部グループもまた考えられる。たとえば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミンは、本発明に適した特性を有している。このようなリン脂質の組合せもまた、卵あるいは大豆レシチンや肺界面活性物質のような天然物由来のリン脂質物質と同様に、「第一界面活性剤」を構成することができる。さらに、リン脂質第一界面活性剤は他の極めて水不溶性の界面活性剤、例えばスクロースジ、トリ、あるいはテトラエステルで補足しても良い。コレステロールも第一界面活性剤を補うことができ、コレステロール／リン脂質の重量比でおよそ0.01から0.5の範囲で供給された場合に安定性を増す効果があることが知られている。不飽和のアシル基も本発明の範囲内であるが、好ましくは、リン脂質のアシル基は飽和されているほうがよい。第一界面活性剤は、好ましくは溶液のおよそ0.005～20% w/vで供給されるのがよく、0.02～10% w/vが最も好ましい。

10

20

【0030】

疎水性の第一界面活性剤の主要な役割は、微小泡の表面張力を平衡値以下に低下させることにある。比較的不溶性で浸透性の安定化ガスが捕捉されている場合(詳細は下記)は、平衡値以下に表面張力を低下させるのは捕捉されている安定化ガスよりも界面活性剤の方がゆっくり拡散する場合にのみ可能であるために、非常に水溶性が低い第一界面活性剤が必要である。界面活性剤の最適の低い溶解性を得るには、長い(すなわち10個を超える炭素原子を含む)アシル基を持ったリン脂質が特に好ましい。

【0031】

第二界面活性剤は、第一界面活性剤を構成する長鎖リン脂質よりも親水性で拡散も速いことが好ましい。この第二界面活性剤の安定な気体分散体を生成する上での役割は、水で再構築する際の溶解速度を速くすることと、より効率的な気体の捕捉とにあり、詳細は後述するが、それによって再構築の初期の小泡の形成が促進される。このように、第二界面活性剤の拡散速度が速いことは、再構築の際に気体を覆う耐久性で連続的な薄膜を形成するのを助けている。

30

【0032】

本発明において、好ましい第二界面活性剤は、リン脂質、ホスホコリン、リゾリン脂質、非イオン性界面活性剤、中性あるいは陰イオン性界面活性剤、中性あるいは陰イオン性であるフッ素化界面活性剤、このような乳化剤あるいは発泡剤の組合せからなる群から選択することが可能である。いくつか第二界面活性剤として有用な特定の界面活性剤の例を挙げると、ポリオキシプロピレンおよびポリオキシエチレンのブロックコポリマー(この種の化合物の例としては、Pluronic F-68のようなPluronicがある)、糖エステル、脂肪アルコール、脂肪族アミノオキシド、ヒアルロン酸脂肪族エステル、ヒアルロン酸脂肪族エステル塩、ドデシルポリ(エチレンオキシ)エタノール、ノニルフェノキシポリ(エチレンオキシ)エタノール、澱粉誘導体、ヒドロキシエチル澱粉脂肪酸エステル、脂肪酸塩、市販の食品植物性澱粉、デキストラン脂肪酸エステル、ソルビトール脂肪酸エステル、ゼラチン、血清アルブミン、そして、これらの組合せが挙げられる。

40

【0033】

同様に第二界面活性剤として考えられるものは、ポリオキシエチレンステアリン酸エス

50

テル、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエステル、ポリオキシエチレン化ソルビタン脂肪酸エステル、グリセロールポリエチレングリコールオキシステアリン酸エステル、グリセロールポリエチレングリコールリシノリン酸エステル、エトキシ化大豆ステロール、エトキシ化ひまし油およびこれらの水素添加物のようなポリオキシエチレン脂肪酸エステルである。さらに、Tween^R、Span^R、Brij^Rなどの非イオン性アルキルグルコシドも本発明の範囲内である。Spanは、ソルビタンテトラオレイン酸、ソルビタンテトラステアリン酸、ソルビタントリスステアリン酸、ソルビタントリパルミチン酸、ソルビタントリオレイン酸、ソルビタンジステアリン酸を含む。Tweenは、ポリオキシエチレンソルビタントリスステアリン酸、ポリオキシエチレンソルビタントリパルミチン酸、ポリオキシエチレンソルビタントリオレイン酸を含む。Brij類縁体はもう一つの有用な部類の材料で、ポリオキシエチレン10ステアリルエーテルを含む。陰イオン界面活性剤、特に6〜24個の炭素原子を持つ脂肪酸とその塩も同様に使用できる。適当な陰イオン界面活性剤の一例としてはオレイン酸とその塩であるオレイン酸ナトリウムがある。塩化ドデシルトリメチルアンモニウムなどの陽イオン界面活性剤も第二界面活性剤として考えられる。

10

【0034】

前述のことから、広い範囲の第二界面活性剤が使用できることが理解されるであろう。実際に、本発明において実質上どんな界面活性剤でも（まだ開発中のものも含めて）、第一界面活性剤を構成する長鎖リン脂質が示すよりも高い水溶性と拡散性を持つものであれば使用することができる。与えられた用途における最適な界面活性剤は、過度の実験を必要とせず、経験的な検討によって決定することができる。従って、本発明の技術を実行する者は生物学的適合性の様な特性に基づいて界面活性剤を選択すべきである。共界面活性剤として、第一界面活性剤よりも親水性が高い、より短鎖のリン脂質を用いることの有用性が判明している。具体例としては、12または14個の炭素原子を含むアシル基を有する第一リン脂質は、共界面活性剤として炭素原子8または10個の炭素原子を含むアシル基を有する第二リン脂質と共に用いられる。

20

【0035】

第一または第二界面活性剤のいずれかとして12個の炭素原子を含むアシル基を有するリン脂質を用いることの有用性が特に判明している。例えば、12個の炭素原子のアシル基を有するリン脂質が第一界面活性剤を構成し、スクロースエステルまたはPluronic化合物が第二界面活性剤を構成することができる。別の選択肢としては、16個の炭素原子のアシル基を有するリン脂質が第一界面活性剤を構成し、12個の炭素原子のアシル基を有するリン脂質が第二界面活性剤を構成することもできる。

30

【0036】

卓越した小泡の形成と持続性という性質を持っていることに加えて、第一界面活性剤と共界面活性剤の両者にリン脂質を用いて作製された小泡は、従来の技術による微小泡において問題となり得た補体の活性化と言ったような生体にとって望ましくない反応を最小限に抑さえるのみでなく、生体に注射された後の代謝による消失という領域での特性においても優れている。この観点において、12または14個の炭素原子のアシル基を有するリン脂質界面活性剤を含有する気体エマルジョン組成物が特に有用であろう。

【0037】

リン脂質を含有する微小泡は、非リン脂質性の界面活性剤を含むものよりも生体適合性であるだけでなく、リポソームに比べても、より生体適合性であると考えられる。つまり、それらは明かにリポソームよりも効率的に細網内皮系から逃れるため、リポソームの様に迅速に循環から消去されることはない。

40

【0038】

第一界面活性剤について述べたように、第二すなわち共界面活性剤についても前述の界面活性剤の組合せで構成することができる。好ましくは、噴霧乾燥に先立って第二界面活性剤は0.005%から20% w/vの範囲で供給される。第一界面活性剤が混合物において上回ることは必要とされない。第一あるいは第二界面活性剤のいずれもが、モル濃度、重量の一方あるいは両方において上回ってもよい。一般的に、溶液中の界面活性剤濃度

50

の合計は、溶液の約 0.01% から 20% w/v である。

【0039】

上述のような界面活性剤の水溶液の作成に引き続いて、膨張剤、好ましくはフレオン (Freon) 113 のようなフルオロカーボンが添加され粗懸濁液を作成する。膨張剤は、噴霧乾燥時に気体になるものであればいかなる材料でもよい。膨張剤は、約 5000 から 15000 psi の圧力で例えば市販されているマイクロフレイダイザーを用いて界面活性剤溶液中に分散される。本発明の一つの好ましい具体例においては、高圧ホモゲナイザーが、リン脂質を含有する界面活性剤溶液中にフレオン 113 の通常のエマルジョンを作製するために使用される。この過程は、界面活性剤の単分子層でコートされた水不混和性のフレオンのサブミクロンの小滴を含む通常のエマルジョンを生成する。この方法や他の方法での分散は一般的なものであり、その技術分野ではよく知られている。 10

【0040】

噴霧乾燥されるための溶液中に膨張剤を含有させることは、非常に多くの中空の微小球を形成することによって、噴霧乾燥した粉末のグラム当りの超音波シグナルが大きくなる結果をもたらす。膨張剤は、乾燥器中の熱風にこれらの小滴が混合されるときに、噴霧乾燥器に入っている霧状の小滴中での蒸気泡形成の核となる。適した膨張剤は、乾燥した小滴の上昇した温度 (約 100°C) において、気体あるいは蒸気により霧状の小滴中の溶液を過飽和にするものである。適した膨張剤には以下のものがある。

【0041】

1. 室温において溶液を飽和させて用いられる塩化メチレン、アセトン、及び二硫化炭素の様な、水性溶液に対して限定された混和力を有する溶解した低沸騰点 (100°C 以下) 溶媒。 20

【0042】

2. 室温で、上昇した圧力 (例えば 3 bar) 下で溶液を飽和させて用いられる例えば CO₂ あるいは N₂ のような気体。小滴は 1 気圧、100°C では気体により過飽和となる。

【0043】

3. フレオン 113、パーフルオロペンタン、パーフルオロヘキサン、パーフルオロブタン、ペンタン、ブタン、FC-11、FC-11B1、FC-11B2、FC-12B2、FC-21、FC-21B1、FC-21B2、FC-31B1、FC-113A、FC-112、FC-123、FC-132、FC-133、FC-141、FC-141B、FC-142、FC-151、FC-152、FC-1112、FC-1121 および FC-1131 のような不混和性で低沸騰点 (100°C 以下) の液体のエマルジョン。 30

【0044】

膨張剤は、界面活性剤溶液の約 0.5 ~ 10% v/v の量で界面活性剤溶液に添加される。およそ 3% v/v の膨張剤が、好適な微小泡を形成する噴霧乾燥粉を産生することが判明している。膨張剤は、噴霧乾燥過程に実質的に蒸発せられ、したがって、痕跡量以上には最終的な噴霧乾燥粉中には存在しない。

【0045】

水性前駆物質溶液は好ましくは親水性のモノマーもしくはポリマーまたはその組合せを含有する。これは、界面活性剤溶液と合わせてもよく、あるいは好ましくは別の溶液として作製し、噴霧乾燥の直前に界面活性剤溶液と合わせる。親水性の部分は、例えばグルコース、乳糖、澱粉のような炭水化物でもよい。PVA や PVP のようなポリマーも、本発明での使用が考えられる。様々な澱粉および澱粉誘導体が特に適していることが判明している。微小泡の形成に特に好適な澱粉は、50 万ダルトン程度以上の分子量を持つかデキストロース等量 (DE) がおよそ 12 以下のものである。DE 値は澱粉ポリマーが加水分解される程度を定量的に測定するものである。デキストロースを標準値 100 とした場合の還元力 (reducing power) 値である。DE 値が高いとそれだけ澱粉の加水分解の程度が高いことになる。この様な好適な澱粉には、食品工業において商業的に利用することが可能な、食品等級の植物澱粉、商標名で言うと、National Starch and Chemical 社 (Bridge 40 50

Water、ニュージャージー州)のN-L O KとC A P S U L E、およびヒドロキシエチル澱粉のような澱粉誘導体 (du Pont Pharmaceu- ticals社のH E T A S T A R C HとH E S P A N、味の素 (東京、日本)のM-H y d r o x y e t h y l s t a r c hという商標名のものが入手可能)が含まれる。(短鎖の澱粉は噴霧乾燥が良好にでき、微小泡作製に使用可能であるが、分子量がおおよそ50万以下のものは、微小泡の安定化には寄与しないために好ましくないことを注意すべきである。しかしながら、付加的な安定化が必要とされない場合においては、本発明において使用することが可能である。)前駆物質溶液の本実施態様においては、親水性のモノマーあるいはポリマーは、溶液の約0.1%~10%w/vの範囲で存在しており、おおよそ1%~5%w/vが特に好適であることが知られている。

10

【0046】

前駆物質溶液の本実施態様において他の任意の成分としては、水相中に含まれる様々な塩あるいは他の物質がある。このような物質には、一般的な粘度調節剤、リン酸緩衝剤や他の一般的な生体適合性の緩衝剤などの緩衝剤、酸や塩基などのpH調節剤、(等張性、高張性、低張性をもたらすために用いる)浸透圧物質が有用なものとして含まれる。好ましい溶液はpHがおおよそ7で等張のものである。これらの添加成分は、典型的にはそれぞれ溶液の5%w/v以下で含有させる。好適な塩には、リン酸ナトリウム(1塩基、2塩基の両者)、塩化ナトリウム、リン酸カルシウム、それに他の生理学的に許容可能な塩が含まれる。

20

【0047】

II. 噴霧乾燥

界面活性剤/膨張剤エマルジョンは、好ましくは、上記したタイプの親水性モノマー/ポリマーの溶液及び塩と合わされ、乾燥した中空でほぼ微小球状の構造を形成させるために噴霧乾燥させられる。市販されている噴霧乾燥器は当業者にはよく知られたものであり、具体的な前駆物質溶液に適したセッティングが、以下の例を参照して経験的な標準試験を通じて容易に決定されうる。例I~VIIおよびIX~XIIで使用される、「Niroポータブル噴霧乾燥器」は、水性界面活性剤溶液を直径2~20ミクロンの範囲の小滴に粉碎するために圧縮した空気の高速度噴射を使用し、二つの流動性圧縮空気ノズルで界面活性剤含有溶液を霧に吹くことによって機能する。その後、それらの小滴は乾燥室の上部で熱い空気(典型的には200~375℃)の流れの中に注入される。それから、界面活性剤溶液の小滴は、約100℃の沸点までほとんど即時に熱せられる。蒸気冷却が温度がより以上に上昇することを防ぐが、温度はリン脂質のガラス転移温度よりもまだ高く、Poloxamer 188やサッカロースステアリン酸のような他の多くの界面活性剤の融点よりも高い。

30

【0048】

小滴の表面の水は非常に早く蒸発し、霧状にした溶液中に溶解した成分の蓄積(buildup)を引き起こす。溶液がヒドロキシエチル澱粉(HES)のような親水性ポリマーを含有するとき、ゲル層が表面に形成される。ゲル層の下に蒸気の小滴が生成され、ゲル球が膨張する。先に簡単に記したように、わずかに溶解している塩化メチレンのような揮発性溶媒あるいはフレオン113のような揮発性不混和溶媒は、初期の蒸気泡形成の核部位を提供し、蒸気をより膨張させ、中空の球の壁をより薄くする。

40

【0049】

乾燥過程の間、水は、ゲル層の穴と通じて液体として球の表面に移行するか、あるいは同じゲルの穴を通じて蒸気として球から逃げる。最終的に、水はHESゲルの蒸発乾燥物中に捉えられる。乾燥過程のこの段階中は、蒸発と蒸発冷却はゆっくりであり、球の温度は、噴霧乾燥室と同じ温度、典型的には100~120℃に釣り合うまで上昇する。ゲル球は、脱水のために縮み、殻の厚みが約0.2μmで直径が約1~10μmの中空で多孔性の球となる。噴霧乾燥器をでた気流は、遠心力によって粉を気流から分離し製品の容器へと移動させるサイクロン分離機へ微小球を運ぶ。

【0050】

50

いくつかの理由から、乾燥した球状界面活性剤／ポリマー組成物の複合構造は、薄層形態を実質的に取らないことから、ランダムであるという特徴を有する。第一には、噴霧乾燥する前に行う、膨張剤を含むエマルジョンを生成するためのホモゲナイゼーションは、界面活性剤を単分子層に沈着させる。乾燥は1秒以内のわずかな時間に行われるので、界面活性剤を濃縮したポリマー（例えばHES）ゲル中に迅速に捉えることは、界面活性剤を乾燥前の物理的な状態にほとんど維持する。さらに、噴霧乾燥過程に、水により溶解しにくい界面活性剤（サッカロースステアリン酸、長鎖リン脂質等）は、水により溶解しやすい界面活性剤の存在下で融点またはガラス転移温度以上に熱せられ、従って、親水性ポリマーのマトリックス中に入り込む。これは、よりランダムな界面活性剤の構造の助けとなる。

10

【0051】

気体で満たされた中空の微小球を含むこの噴霧乾燥された組成物は、本発明の重要な製品である。この製品は、前駆物質を含有する凍結乾燥したリポソーム以上の重要な有利性を有する。この微小泡前駆物質材料の球状構造は、本発明の好ましい微小泡の特徴である比較的不溶性で、比較的圧縮できない非ニュートン粘弾性界面活性剤膜を、一様にすぐに形成すると考えられる。

【0052】

噴霧乾燥の終了後、微小球は適当な気体と共に容器に入れられる。この気体は微小球を満たし、再構築時に微小泡中に捕捉される。

【0053】

微小球の様々な個々の成分は、噴霧乾燥された最終産物中において以下の重量百分率の比率であることが好ましい。

20

第一リン脂質界面活性剤	0.05%～90%
第二界面活性剤	0.05%～90%
親水性構造物質	1%～99%
塩、緩衝液質、等	0%～90%

【0054】

特に好ましい実施態様における成分は以下の重量百分率による比率を有する。

第一リン脂質界面活性剤	0.1%～10%
第二界面活性剤	0.1%～10%
親水性構造物質	10%～60%
塩、緩衝液質、等	10%～60%

30

【0055】

最も好ましくは、第一界面活性剤（有利にはリン脂質）の量は、全体の界面活性剤の少なくともおよそ1%、好ましくは少なくとも約3%、4%、5%、最も好ましくは少なくともおよそ7%、8%あるいは10%（w/w）である。第一界面活性剤は、全体の界面活性剤の重量百分率で25%、50%、75%あるいは95%を構成してもよく、また好ましくはないが、第二界面活性剤を使用しない態様も考えられる。

【0056】

本発明の他の実施態様では、前駆物質溶液の組成は、リポソームを形成する噴霧乾燥された粉末が調製されるものである。そのような前駆物質溶液は例えばここで引用している、Schneiderらの米国特許第5,380,519号の組成を有することができる。我々は、ここで記載したリン脂質を含有する溶液の微小泡の前駆物質を生成するための噴霧乾燥の技術が、Schneiderらの凍結乾燥法よりも優れていること、および形成された微小泡は、凍結乾燥法で形成されたものから作られたものよりもずっと安定であることを発見した。従って、本発明の一つの観点からすると、Schneiderらの特許に示されたような、エコー画像造影法への使用のために微小泡を形成するように再構築される前駆物質を作製する乾燥リポソームを調製するのにも噴霧乾燥法が使用可能であると考えられる。

40

【0057】

III. 再構築と気体の選択

50

水性媒体に再構築する際に、いくつかの好ましい実施態様において親水性モノマーあるいはポリマーは殻としての構造を提供し、存在するかも知れない塩や緩衝液等と同様に、迅速に溶解して消失し、残された界面活性剤の層によって取り囲まれた気泡を含む気体エマルジョンあるいは分散体を残す。第一リン脂質界面活性剤、および、より親水性の共界面活性剤は異なる機能をはたすと仮定されている。

【0058】

作用に関する特定の理論に拘束されないが、第二界面活性剤（あるいは共界面活性剤）は、水溶性構造材料の溶解の目的には明かに有用であり、殻溶解中に存在する界面活性剤のない裂け目を「癒す」ために、再構築の際に、速く、十分にすぐに拡散するかも知れない。より疎水性の界面活性剤と共に比較的水溶性の界面活性剤を一部含有する微小球粉末の再構築は、一種の疎水性界面活性剤のみを含有する再構築された粉末よりも、増強剤のミリリットル当たり非常に多くの泡を産生することが判明した。比較的亲水性の第二界面活性剤は、乾燥した中空の球から界面活性剤で覆われた気泡への転換に明かに重要であるが、より疎水性の第一界面活性剤が、泡が形成された後の安定剤として最も有効である。

10

【0059】

この様にして作られた気体拡散体は、したがって、リン脂質を含有する従来のコントラスト増強組成物とは根本的に異なっている。上記したように、RyanやUngerの気体含有リポソームは、泡の気体／液体界面の界面活性剤層に関係せず、リポソームの水性コア中に捉えられた基本的にむき出しの泡に関係する。これは、本発明の気体エマルジョンあるいは微小泡分散体とは異なるものであろう。その点で（作用に対する特定の理論に拘束されるものではない）、小さな気泡は、親水性頭グループが水性液体と会合し疎水性尾グループが分散した気泡と会合している様な方向となっている、比較的丈夫で消失しない界面活性剤層によって囲まれていることが明かとなっている。

20

【0060】

さらに、Schneiderらと比較して、本発明の気体分散体は、リポソーム構造あるいは他の薄層界面活性剤構造の溶液での存在は必要でない。事実、使用した界面活性剤がリポソームを形成するのが不可能であっても、優れた生体内での安定性を持つ気体分散体が、本発明に従って調製される。溶液中の薄層界面活性剤構造の不在は、本発明の造影剤の有効性に有意には影響しない。加えて、泡中のフルオロカーボン浸透性安定剤の気体の存在は、本発明の気体分散体の安定性を増加させるが、一方、フルオロカーボン浸透性安定剤は凍結乾燥したリポソームから産生された微小泡の安定性には殆ど影響しない。挙動の相違は、さらに、（再び作用の特別な説により拘束されるものではないが）本発明の泡中の気体は、親水性頭グループが水性液体と会合し疎水性尾グループは分散した気泡と会合している様な方向となっている、比較的丈夫で消失しない界面活性剤層によって囲まれていることを示唆する。

30

【0061】

空気、窒素、あるいは血中に自然に存在する他の気体を含有する適切な泡は、水性媒体中に上記した噴霧乾燥微小球を再構築することによって作られる。また、フルオロカーボンの様な比較的水に不溶性の気体を再構築前に乾燥した微小球に充満させたときに、泡の寿命が改良されることが判明している。この場合、本発明は、第一気体すなわち正常な血中あるいは血清中に通常存在する任意の気体（「主要調節気体(primary modifier gas)」）を、泡中の浸透圧を調節するために作用する一種あるいはそれ以上の付加的な第二気体（「気体浸透剤(gas osmotic agent)」または「第二気体」）と組合せた気体を利用する。小泡の浸透圧を調節することによって、気体の浸透圧物質（ここでは、単一のあるいは化学物質の混合物として定義される）は、小泡内に圧力を及ぼし、脱気の防止に役だっている。他の選択肢としては、調節気体は通常血中あるいは血清中に存在しない気体でもよい。しかしながら、調節気体は、血液あるいは他の周囲の液体中の気体が小泡中に拡散してきたときに、気体浸透物質の蒸気圧以下の分圧においても、気体浸透物質の希釈と維持ができなければならない。水性媒体中において、水蒸気は対象となる「気体」とはみなされない。同様に、微小泡が水系でない液体媒体中に存在する場合は、その培地の蒸気は「

40

50

気体」の一つとはみなされない。

【0062】

本発明者らは、小泡表面の膜透過性が低く、小泡外の連続した液相中への溶解性の低い気体浸透剤を添加することによって、それを用いて作製した小泡の寿命が延長することを発見した。

【0063】

この結果は、気体の組合せ、好ましくは調節気体が外部の媒体中に通常存在する気体と交換するまで、気体浸透剤の蒸気圧よりも低い分圧に気体浸透物質を希釈し得るような主要調節気体または気体の混合物を、選択した気体エマルジョン中に捕捉したことによって成し遂げられた。単一あるいは複数の気体浸透剤は、一般的に比較的疎水性で、比較的小泡膜に非透過性であり、さらに気体浸透圧を50、75、あるいは100 Torr以上まで高める能力を有している。好ましい一実施態様において、気体浸透剤の気体蒸気圧は、好ましくは37℃で約760 Torr未満であり、好ましくは約750、740、730、720、710、あるいは700 Torr未満であり、さらに他の実施態様においては、約650、600、500、あるいは400 Torr未満である。好ましい実施態様においては、主要調節気体の蒸気圧は37℃で少なくとも660 Torrであり、気体浸透剤の蒸気圧は37℃で少なくとも100 Torrである。

10

【0064】

第一気体と第二気体はそれぞれモル比で約1:100、1:75、1:50、1:30、1:20、あるいは1:10から、約1000:1、500:1、250:1、100:1、75:1、50:1までで存在し、第二気体の37℃での蒸気圧をxとした場合に、第一気体は37℃での蒸気圧が少なくとも約(760-x) mmHgとなり、また第一気体と第二気体の37℃での蒸気圧がそれぞれ約75あるいは100 mmHgを超えるように存在する。

20

【0065】

本発明の好ましい一実施態様にしたがって作製された気体エマルジョンあるいは気体分散体小泡は、さらに付加的に有利な特性を持つ。そのような一実施態様において、非浸透性の気体と浸透性の安定化ガス（あるいは気体浸透剤）の混合物が、結果としてできる小泡の大きさの分布を作成中および作成直後に安定化させるために用いられる。小泡の作成に当り、小さい泡における、より高いラプラス圧は、液層を通して、より低いラプラス圧を持つ大きな泡へ拡散する原因になる。これは、時間の経過により毛細管限界である5ミクロン以上への平均粒子径分布の上昇を招く。これは不均衡(disproportionation)と呼ばれる。非浸透性の気体（例えば空気）の混合物が浸透性の蒸気（たとえばC₆F₁₄）と一緒に用いられる場合、空気が小泡を離れるために小さい泡の大きさが少し小さくなり、浸透性の気体を濃縮しその浸透圧を上昇させる、それでさらに小さくなるのが遅延される。一方、より大きい泡は容量が少し大きくなり、浸透性気体が希釈されさらに成長するのを遅延させる。

30

【0066】

極めて血液に溶解性の気体（例えば容量で87.5%炭酸ガス）と浸透性の気体の混合物（例えば28% C₆F₁₄蒸気+72%空気）との混合物を使用することの付加的な利点は、注射されたときに血液中に炭酸ガスが逃げるためにこれらの小泡が直ちに縮むことである。小泡は、注射されると炭酸ガスの消失によって87.5%だけ容量が減少することになる。この炭酸ガスの消失は小泡径の半減に相当する。従って、単純な機械的な手段によって、注射後に5ミクロン以下に縮む、より大きい径の小泡（例えば9 μm）を調製することができる。一般的に、このような気体エマルジョンは、初めに第一気体が第二気体に対して少なくとも比が1:1、好ましくは少なくとも3:2、2:1、3:1、4:1、5:1、あるいは10:1の場合に作成される。微小泡の膜が第二気体よりも第一気体に対して透過性の場合（例えば2つの気体に対してそれぞれ少なくとも約2:1、3:1、4:1、5:1あるいは10:1の比率で透過性を示す場合、好ましくはさらに高比率、例えば20:1、40:1、あるいは100:1の場合）、有利なことに、小泡は元々の

40

50

第一の直径から、その最初の直径の平均で75%以下である第二の直径へ非常に迅速に（例えば1、2、4、あるいは5分以内に）縮む。それから、気体エマルジョンの連続相を構成する水性媒体中に比較的膜透過性の良い気体が少なくとも一種含まれている場合、小泡径は最低でも1分間、好ましくは2、3、4、あるいは5分間、2番目の直径に、あるいはその辺りに安定化する。好ましい実施態様において、小泡は、5あるいは6ミクロンから1ミクロンの間の大きさを、浸透圧差によって安定化して少なくとも1、2、3、4、あるいは5分間維持する。外部の液体中の気体張力は、好ましくは少なくとも700 mmHgである。さらに、比較的膜不透過性の気体は、微小泡中においてこの様な浸透圧差を生成するように働く。

【0067】

上記のように、気体浸透剤は好ましくは調節剤よりも小泡膜表面に不透過性の気体が良い。また、気体浸透剤は血液および血清中への溶解性が低いことも好ましい。従って、気体浸透剤は、望まれる浸透圧効果を発揮する温度において十分な部圧あるいは蒸気圧を有する限りにおいては、室温あるいは体温において気体でも良く、体温において一般的には液体でもよいということが現在では理解されている。

【0068】

それ故、もし体温において好ましくは少なくとも約50あるいは100 Torr、あるいはより好ましくは少なくとも約150あるいは200 Torrの十分な蒸気圧があれば、室温あるいは体温において気体でないフルオロカーボンあるいは他の化学物質も用いることができる。気体浸透剤が気体の混合物の場合、蒸気圧の適切な測定値は混合気体の蒸気圧であって、必ずしも気体浸透剤のそれぞれの成分の蒸気圧であるわけではないことを注意すべきである。

【0069】

小泡中の浸透物質としてフルオロカーボンが用いられる場合、特定のフルオロカーボンは小泡中に存在する分圧および体温においては凝縮しないことも重要である。主要調節気体と気体浸透剤の相対的な濃度に依存して、主要調節気体は小泡を直ちに離れ、小泡の縮小と、第二気体調節剤の濃縮を引き起こす。この様な縮小は、気体浸透圧が小泡に掛かる外部の圧力（実際の最大動脈圧）と小泡のラプラス圧の総和から血液中の空気圧あるいは飽和空気圧（本来的には1気圧）を差し引いた値に等しくなるまで起こり続ける。従って、37℃において結果として生じる混合気体の分圧は、先に議論した浸透剤の平衡分圧よりも高くなければならない。

【0070】

好ましい溶解性と蒸気圧の基準を満たすいくつかの化合物のリストを第I表に示す。

【0071】

第I表

パーフルオロプロパン、 C_3F_8
 パーフルオロブタン、 C_4F_{10}
 パーフルオロシクロブタン、 C_4F_8
 パーフルオロペンタン、 C_5F_{12}
 パーフルオロシクロペンタン、 C_5F_{10}
 パーフルオロメチルシクロブタン、 C_5F_{10}
 パーフルオロヘキサン、 C_6F_{14}
 パーフルオロシクロヘキサン、 C_6F_{12}
 パーフルオロメチルシクロヘプタン、 C_6F_{12}
 パーフルオロジメチルシクロブタン、 C_6F_{12}
 パーフルオロヘプタン、 C_7F_{16}
 パーフルオロシクロヘプタン、 C_7F_{14}
 パーフルオロメチルシクロヘキサン、 C_7F_{14}
 パーフルオロジメチルシクロペンタン、 C_7F_{14}
 パーフルオロトリメチルシクロブタン、 C_7F_{14}

10

20

30

40

50

パーフルオロトリエチルアミン、 $N(C_2F_5)_3$

【0072】

当業者が、上記したように、本発明において適切に機能し得る、溶解性と蒸気圧の両方の基準を満たしていない、他の化合物を容易に決定することができることは理解されるであろう。むしろ、もしそのような化合物が他の範疇で外れていることを補い、優れた不溶性あるいは高い蒸気圧を提供するならば、溶解性あるいは蒸気圧のどちらかが好ましい範囲外である化合物も考慮されうることを理解されるであろう。

【0073】

医療用に用いる場合は、調節気体と気体浸透剤の両者の気体はどちらも生体適合性であり、生理学的に有害であってはならないことも特筆すべきことである。最後に、気相を含む有する微小泡は、崩壊していき、気相は血液中に、溶存ガスとして凝縮液体の1ミクロン以下の小滴としてのいずれかで放出される。気体は、体内から主に肺呼吸を介して、あるいは呼吸と細網内皮系の他の経路の組合せで除去されることも理解される。

10

【0074】

PFCの混合物、例えば C_6F_{14} 蒸気（主要な気体浸透剤として）で飽和させた C_4F_{10} （組合せ調節気体と気体浸透剤として）は、それぞれの成分を単独で使用するよりも小泡をより長時間に渡って安定化させることができることは、驚くべき発見であった。これは、 C_4F_{10} が体温において気体で（従って調節気体と気体浸透剤の両者として働くことができる）、幾分膜透過性が低く、体温において C_6F_{14} にほとんどわずかしき溶解性を示さないことによる。この立場において両方の物質の気体浸透圧はお互いに加算され、小泡の持続性が空気と C_6F_{14} のみのものに比べて延長することになる。より長く持続し、より高分子量である C_6F_{14} 成分の縮合点が上昇すると、より大きな最大気体浸透圧が発揮されるようになる可能性がある。他のPFCの混合物も同様に機能する。PFCの好ましい混合物は、比率で1:10から10:1で、パーフルオロブタン／パーフルオロヘキサンとパーフルオロブタン／パーフルオロペンタンなどの混合物を含む。この様な好ましいフッ素化合物は、分岐鎖のものでも直鎖のものでも良い。

20

【0075】

先に議論したように、本発明者らは、気体浸透剤との組合せにおいて非浸透性の気体の混合物は注射前後での小泡の大きさの分布を安定化させるように働くことを発見した。小泡の発生に際して、より小さい小泡の持つより高いラプラス圧が、液相を介した、より低いラプラス圧を持つ、より大きな小泡への拡散を引き起こす。これは、時間とともに毛細管限界である5ミクロン以上への平均粒子径分布の上昇を招く。これは不均衡と呼ばれる。

30

【0076】

しかしながら、調節気体（例えば空気あるいは炭酸ガス）の混合物が気体浸透剤（例えば C_6F_{14} ）と共に用いられた場合、調節用気体の一種が小泡を離れるためによるより小さな小泡の容量のわずかな減少が、浸透性の気体を濃縮させその浸透圧を上昇させる。それによって、さらなる縮小が遅延する。その一方、より大きな小泡は容量をわずかに上昇させ浸透性気体が希釈され、同様にさらなる成長が遅延する。

【0077】

従って、比較的疎水性で比較的低い膜透過性を有する気体を使用することで、小泡の崩壊率が減少することを本発明者らは発見した。このように小泡の崩壊率の減少を通じて、微小泡の半減期が増加し、コントラストの増強能力も延長する。

40

【0078】

所望の気体は、空気を排出させるために真空チャンバーに置かれたバイアル中に微小泡を置くことによって、乾燥した微小泡中に浸透するようにされる。それから空気が所望の気体あるいは混合気体（好ましい気体の組合せは、13℃でパーフルオロヘキサンの飽和した窒素ガス）と置き換えられる。気体はそれから粒子の空間に拡散していく。拡散は、加圧と真空のサイクルを繰り返すことによって促進される。バイアルはそれからクリンプシールされ、好ましくはガンマー線照射によって滅菌される。

50

【0079】

本発明に基づいた微小泡の調製に用いるためのキットを作製し得ることは理解されるであろう。これらのキットには微小泡を作成するために用いる上記の単一あるいは複数の気体を充填した容器と液体と界面活性剤とを含ませることができる。容器は、無菌の乾燥した成分と気体の全てを一つのチャンバーに、同じ容器の別のチャンバーに無菌の水性液体を収めることができる。好適な二チャンバー式のバイアル容器が入手可能であり、例えば WHEATON Glass社 (Millville、ニュージャージー州) の W H E A T O N R S 1 7 7 F L WあるいはS-1702FLという商品名のものである。この様な容器を図1～4に示した。図1および2を参照すると、図示したWheaton容器5は、水性溶液25を入れることができる上部チャンバー20と固体成分35と所望の気体を入れることができる下部チャンバー30を備える。ストッパー10は上部チャンバーを外部環境から分離するためにあり、シール15は噴霧乾燥した(粉末の)中空の微小球35と気体浸透剤を入れた下部チャンバー30から上部チャンバー20を隔離している。ストッパー10を押し下げると、比較的圧縮されない液体が加圧され、シール15を下部チャンバー30方向へ押すことになる。これによって水性溶液25が下部チャンバー30に放出され、粉末35を溶解し気体浸透剤を捕捉した安定化された微小泡45を形成することになる。過剰の気体浸透剤40は下部チャンバー30から上部チャンバー20へ放出される。この配置は、使用者にとって便利で、尚且つ、厚い(0.5～1.25インチ)水性溶液の層によりチャンバー間のシールで覆うことによって、下部チャンバー中の少量の水不溶性の気体浸透剤を密封するという予期しない利点と、粉末チャンバーの圧力を約10%以上上昇させずに、水溶液を下部チャンバーに導入できるという利点をもたらす。従って、圧力ベントは必要ない。(これに対して、ベントなしに注射針と注射器を用いて単一チャンバーのバイアル中で再構築する通常の方法では、チャンバー内にかなりの圧力が発生し、微小泡をつぶしてしまう可能性がある。)

【0080】

あるいは、微小泡の作成に逆さまにした2つのチャンバー方式も使用することが可能である。図3および4を参照すると、ストッパー50が、押されたときに内部のシール15を除去する様に延長されたこと以外は、上記のような同じチャンバーを使用する。この微小泡作成法では、噴霧乾燥された中空の微小球35と気体浸透剤40は上部チャンバー20に入っている。水性溶液25と気体浸透剤40は下部チャンバー30に入れられている。ストッパー50が押し下げられると、シール15を除去し、噴霧乾燥された中空の微小球が、気体浸透剤40の存在下に水溶液25と混合できるようになる。この微小泡作成法の一つの利点は、水層を最初に充填することができ、オートクレーブかそれ以外の方法で滅菌した後に、噴霧乾燥した微小球を入れることができることである。これによって滅菌する前に水層中で微生物が増殖することを防止することができる。

【0081】

一つの特定の二チャンバー式の容器を説明してきたが、他の好適な装置も知られており購入可能である。例えば、B・D HYPACK 液体/固体5+5ml充填済み注射器システム(Becton Dickinson社、Franklin Lakes、ニュージャージー州；米国特許第4,613,326号に記載)の様な、2つの隔室式のガラス注射器も噴霧乾燥した粉末を再構築するために用いることができる。このシステムの利点は以下の通りである。

【0082】

1. 使用の簡便さ。
2. 水不溶性の気体浸透剤は、片側が水性溶液のチャンバーにより、他の側が針を密封するためのエラストマーの非常に狭い領域によって密閉される。
3. Monoject #305 (Sherwood Medical、St.Louis、MO) のような過針を、不溶性の固体を注入しないことを保証するために、製造の際にシリンジに付けることができる。

【0083】

微小泡を作成するための二チャンバーシリンジの使用については、例XIVに記載する

。

【0084】

滅菌状態で噴霧乾燥粉末と水性溶液を組合せることのできる他の二チャンバー再構築システムもまた、本発明の範囲内であることは当業者に理解されよう。そのようなシステムにおいて、もし水相を、水に不溶性の浸透性気体と周囲の間に挿入することができるならば、製品の貯蔵寿命を伸ばすのに特に有益である。微小泡を形成するために必要な材料を容器中に予め入れない場合には、キットの他の成分と共に、好ましくはキットの他の成分と組合せを容易にするのに適合した形態であるいは容器中に梱包されうる。

【0085】

本発明の微小泡の具体的な使用例には、心臓および心臓組織の灌流画像化、ストレスや運動試験中の心臓やその組織の灌流特性の測定、心筋梗塞による灌流欠損や変化の測定が含まれる。同様に、組織への血流を増加させる目的の薬剤の経口あるいは静脈内投与後に心臓組織を見ることができる。また冠状組織静脈移植(coronary tissue vein grafting)、環状動静脈血管形成(coronary angioplasty)、あるいは血栓崩壊剤(TPAあるいはストレプトキナーゼ)の使用のような様々な介入による、あるいはその間の心臓組織の変化を画像化することも増強できる。また、全循環システムの画像化を増強するために末梢静脈を通して簡便にこの様な造影剤を投与することができるので、一般的な血管病理の診断や超音波で胎盤組織の生活能を監視することが容易になる。

【0086】

しかし、超音波画像化の範囲を越えてこれらの原理が適用できることを強調するべきである。事実、本発明は、非生物的適用を含むいかなるシステムにおいてリン脂質を含有する気体エマルジョンの使用を含む程十分にひろいものである。

【0087】

本発明の微小泡調製品に他の化合物が含まれ得ることも理解されるであろう。例えば、浸透剤、安定剤、キレート剤、緩衝剤、粘性調整剤、空気溶解性改変剤、塩および糖が、最長寿命やコントラスト増強効果のために微小泡懸濁液を改変するために加えることが可能である。無菌状態、等張性、生体適合性の考慮は、注入できる組成物への従来の添加物の使用の基準となり得る。そのような薬剤の使用は当業者に理解され、薬剤の具体的量、比率およびタイプが不当な実験なしに経験的に決定されうる。

【0088】

本発明の様々な実施態様は、驚くべき有利性を提供する。噴霧乾燥澱粉は、特に澱粉の分子量が約500,000以上のときに、バイアル中の安定性を延長させる。Pluronic F-68(12以上のHLBと共に)のようなブロックコポリマー、および、スクロースモノステアリン酸の様な糖の脂肪酸エステルは、それらが再水和すると同時に粉末に泡を形成させる。澱粉、澱粉誘導体、あるいはデキストリンのような構造剤(structural agent)を用いた噴霧乾燥は、相当する音波粉碎調製品よりも界面活性剤の全量を有意に低くする。気体浸透剤のために付加的な密封を提供する水を用いた二チャンバーバイアルの使用は、貯蔵寿命を長くし、使用の便利性を高める。構造剤(澱粉やデキストリンなど)、疎水性リン脂質、および、より可溶性の共界面活性剤を用いた噴霧乾燥は、生体内での寿命半減期が非常に増加した気体エマルジョンを提供する。

【0089】

本発明の微小泡調製品は、脊椎動物の超音波画像化部分の造影剤として、鳥類やほ乳動物等の脊椎動物に適用される。好ましくは、脊椎動物はヒトであり、画像化する場所は脊椎動物の血管系である。この実施態様において、少量の微小泡(例えば脊椎動物の体重に基づいて0.1ml/Kg[2mg/kg噴霧乾燥粉末])が動物へ静脈内投与される。約0.005ml/Kgから約1.0ml/Kgのような異なる量の微小泡を使用することが可能である。心臓、動脈、静脈、肝臓や腎臓などの血液に富んだ臓器が、この技術によって超音波で画像化されることが可能である。

【0090】

前述したことは、以下の実施例を参照することにより十分に理解されるであろう。しか

し、そのような実施例は、本発明を実施する好ましい方法の典型的な例であり、発明の範囲や添付の請求の範囲を限定するものではない。

【実施例 1】

【0091】

リン脂質含有溶液の噴霧乾燥

2. 0 % w / v Maltrin M-100 マルトデキストリン (Grain Processing Corp., Muscatine, IA)、0. 9 5 % w / v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)、1. 0 % Superonic F-68 (Serva, Heidelberg, Germany)、1. 0 % w / v Ryoto Sucrose Stearate S-1670 (三菱化成食品 (株)、東京、日本)、及び 0. 5 % Lipoid E-100-3 水素化リン脂質 (Lipoid, Ludwigshafen, Germany) の溶液 (1 L) を注射用水中で調製した

10

【0092】

次にこの溶液を、下記の設定で、液体噴霧器を二つ備えた Niro Atomizer Portable Spray Dryer (Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark) で噴霧乾燥した。

【0093】

加熱空気流速	3 9 . 5 C F M
入口空気温度	2 4 5 °C
出口空気温度	1 0 0 °C
噴霧器空気流速	3 5 0 L / 分
液体供給速度	1 L / 時間

20

【0094】

この乾燥した中空粒子生成物は直径が約 1 μm ~ 約 1 5 μm であり、この乾燥機の標準であるサイクロン分離機で回収された。粉体の一部 (2 5 0 m g ずつ) を、1 0 m L の管型のバイアル中に量り入れ、真空にし、1 3 °C でパーフルオロヘキサンを飽和させた窒素を入れ、そして封をした。窒素は、1 3 °C の水浴に浸けた 3 本のパーフルオロヘキサンを充填した気体洗浄瓶中を通すことによって、パーフルオロヘキサンで飽和させた。

【0095】

注射用水 (5 m L) で再構成すると、光学顕微鏡で大きさが 1 ~ 2 0 ミクロンの無数の泡が観察された。多数の約 1 ミクロンの泡が相当な時間にわたって観察された事実から、付加的な非ニュートン粘弾性界面活性剤として処方中にリン脂質を含むことによって、安定性が向上したことが示される。

30

【実施例 2】

【0096】

リン脂質とスクロースエステルとの気体エマルジョンの比較

下記の 4 種類の溶液 (1 L) をそれぞれ注射用水で調製した。

【0097】

溶液 1

3. 9 % w / v	m-H E S ヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)
3. 2 5 % w / v	塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
2. 8 3 %	リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
0. 4 2 % w / v	リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)

40

【0098】

溶液 2

2. 1 1 % w / v	Poloxamer 188 (BASF, Parsipany, NJ)
0. 3 2 % w / v	Ryoto Sucrose Stearate S-1670 (三菱化成食品 (株)、東京、日本)
0. 1 6 % w / v	Ryoto Sucrose Stearate S-570 (三菱化成食品 (株)、東京、日本)

【0099】

溶液 3

3. 6 % w / v	m-H E S ヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)
--------------	----------------------------------

50

3. 0 % w / v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 2. 6 % リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 0. 3 9 % w / v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 【0100】

溶液4

0. 1 5 % w / v Poloxamer 188 (BASF, Parsipany NJ)
 0. 4 5 % w / v 水素化卵ホスファチジルコリン EPC-3 (Lipoid, Ludwigshafen, Germany)
 【0101】

溶液2及び4を高せん断ミキサーに添加し、氷浴中で冷却した。3. 0 % v / v の1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン133; EM Science, Gibbstown, NJ) の粗懸濁液を、溶液2及び4 (1 L) 中で調製した。これらの懸濁液を、Microfluidizer (Microfluidics Corporation, Newton, MA; モデルM-110F) を使用して、10,000 psi、5℃で5パスさせて、乳化した。得られたエマルジョン4を溶液3に加え、得られたエマルジョン2を溶液1に加えた。続いて、処方1及び2の混合物 (スクロースエステル界面活性剤を含む) 及び処方3及び4の混合物 (リン脂質界面活性剤を含む) を、下記の設定で、液体噴霧器を二つ備えたNiro Atomizer Portable Spray Dryer (Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark) で噴霧乾燥した。

【0102】

処方1及び2の混合物

- 加熱空気流速 31 CFM
 入口空気温度 370℃
 出口空気温度 120℃
 噴霧器空気流速 290 L / 分
 エマルジョン供給速度 1.5 L / 時間

【0103】

処方3及び4の混合物

- 加熱空気流速 31 CFM
 入口空気温度 325℃
 出口空気温度 120℃
 噴霧器空気流速 290 L / 分
 エマルジョン供給速度 1.5 L / 時間

【0104】

この乾燥した中空粒子生成物は直径が約1 µm～約15 µmであり、この乾燥機の標準であるサイクロン分離機で回収された。粉体の一部 (250 mg ずつ) を、10 mL の管型のバイアル中に量り入れ、13℃でパーフルオロヘキサンで飽和させた窒素を入れ、そして封をした。窒素は、13℃の水浴に浸けた3本のパーフルオロヘキサンを充填した気体洗浄瓶中を通すことによって、パーフルオロヘキサンで飽和させた。

【0105】

バイアルは水の注入に伴う圧力を抜くための通気孔として、18ゲージの針を挿入した後、注射用水 (5 mL) で再構成した。得られた微小泡の懸濁液 (1 mL) を、頸動脈のドップラー超音波シグナルをモニターする機械を取り付けた、約3 kg のウサギに静脈内注射した。システム6ドップラーフローモジュール (Triton Technology Inc., San Diego, CA) に接続した10 MHz フローカフ (Triton Technology Inc.; モデルES-10-20) によって、LeCroy 9410オシロスコープ (LeCroy, Chestnut Ridge, NY) へRFドップラーシグナルを送った。オシロスコープによって計算されたシグナルの2乗平均 (RMS) 電圧はコンピュータに送られ、得られた曲線から、ピーク反響性 (echogenic) シグナル強度及び血液中の微小泡の半減期を得た。コントラスト前のシグナルは、0.1 ボルト RMS 未満であった。

【0106】

10

20

30

40

50

スクロースエステル処方、微小泡が高濃度であるために、リン脂質の処方シグナルよりも29%高い初期の超音波散乱シグナルを生成した一方で、驚くべきことには、リン脂質の処方では実質上、より長く持続した。スクロースエステルの処方のシグナルは、140秒で元来のシグナルの30%に減衰し、一方リン脂質の処方では、30%のシグナルレベルに減衰するまで550秒持続したことから、非ニュートン粘弾性界面活性剤として、リン脂質を使用した処方の持続性がより優れていることが示された。

【実施例3】

【0107】

非水溶性リン脂質と非水溶性リン脂質／水溶性界面活性剤 (Poloxamer 188) との微小泡の比較

10

下記のエマルジョン (1 L) をそれぞれ、実施例2に記載した通りの噴霧乾燥のために調製した。

【0108】

処方A：非水溶性リン脂質処方

3.6% w/v m-HES ヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)

3.0% w/v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)

2.6% リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.45% w/v 水素化卵ホスファチジルコリン EPC-3 (Lipoid, Ludwigshafen, Germany)

20

3.0% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン 133; EM Science, Gibbstown NJ)

【0109】

処方B：非水溶性リン脂質／水溶性 (Poloxamer 188) 処方

3.6% w/v m-HES ヒドロキシエチルスターチ (味の素、日本、東京)

3.0% w/v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)

2.6% w/v リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.45% w/v 水素化卵ホスファチジルコリン EPC-3 (Lipoid, Ludwigshafen, Germany)

30

0.45% w/v Poloxamer 188 (BASF, Parsipany NJ)

3.0% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン 133; EM Science, Gibbstown NJ)

【0110】

処方Aの噴霧乾燥した粉体 (100 mg) を水 (5 mL) で再構成すると、大きさが1~20 μmの泡が1 mL当たり約20百万個観察された。処方Bの噴霧乾燥した粉体 (100 mg) を水 (5 mL) で再構成すると、大きさが1~20 μmの泡が1 mL当たり約315百万個 (処方Aより1575%多い) 観察された。

【0111】

微小泡の処方において、非水溶性の界面活性剤に比較的水溶性の界面活性剤 [HLB (Poloxamer 188) = 29.0] を添加することによって、形成される泡の濃度が有意に増加し、より効果の高い超音波造影剤となった。HLBは乳化剤及び乳化される物質に付与される0~40の数である。HLBは乳化の挙動を示す指標であり、分子の親水性及び親油性部分のバランスに関連する (Rosen, M., (1989), Surfactants and Interfacial Phenomena, Second Edition, John Wiley & Sons, New York, pp.326-329)。

40

【実施例4】

【0112】

非水溶性リン脂質と非水溶性リン脂質／水溶性 (Polysorbate 20) との微小泡の比較

下記のエマルジョン (1 L) をそれぞれ、実施例2に記載した通りの噴霧乾燥のために調製した。

50

【0113】

処方A：非水溶性リン脂質処方

- 3. 6 % w / v m-H E S ヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)
- 3. 0 % w / v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 2. 6 % w / v リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0. 3 9 % w / v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0. 4 5 % w / v 水素化卵ホスファチジルコリン EPC-3 (Lipoid, Ludwigshafen, Germany)
- 3. 0 % v / v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン 133; EM Science, Gibbstown NJ)

10

【0114】

処方B：非水溶性リン脂質／水溶性 (Polysorbate 20) 処方

- 3. 6 % w / v m-H E S ヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)
- 3. 0 % w / v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 2. 6 % w / v リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0. 3 9 % w / v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0. 4 5 % w / v 水素化卵ホスファチジルコリン EPC-3 (Lipoid, Ludwigshafen, Germany)
- 0. 1 5 % w / v Polysorbate 20 (ICI, Wilmington, DE)
- 3. 0 % v / v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン 133; EM Science, Gibbstown NJ)

20

【0115】

処方Aの噴霧乾燥した粉体 (100 mg) を水 (5 mL) で再構成すると、大きさが 1 ~ 20 μ m の泡が 1 mL 当たり約 20 百万個観察された。処方Bの噴霧乾燥した粉体 (100 mg) を水 (5 mL) で再構成すると、大きさが 1 ~ 20 μ m の泡が 1 mL 当たり約 250 百万個 (処方Aより 1150 % 多い) 観察された。

【0116】

その結果、微小泡の処方において、非水溶性の界面活性剤である水素化ホスファチジルコリンに、比較的水溶性の界面活性剤である Polysorbate 20 [HLB = 16.7] を添加することによって、形成される泡の濃度が有意に増加し、より効果の高い超音波造影剤となった。

30

【実施例5】

【0117】

リン脂質と組み合わせて調製した気体エマルジョン

下記のエマルジョン (1 L) を、実施例2に記載した通りの噴霧乾燥のために調製した。

【0118】

- 3. 6 % w / v m-H E S ヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)
- 3. 0 % w / v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 2. 6 % リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0. 3 9 % w / v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0. 2 2 % w / v ジパルミトイルホスファチジルコリン (Genzyme, Cambridge, MA)
- 0. 3 1 % w / v ジオクタノイルホスファチジルコリン (Avanti Polar Lipids, アメリカ、アラバマ州、アラバスター)
- 3. 0 % v / v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン 133; EM Science, Gibbstown NJ)

40

【0119】

水 (5 mL) で再構成すると、大きさが 1 ~ 20 ミクロンの泡が 1 mL 当たり約 51 百万個観察された。この微小泡の処方について、反響性シグナルの減衰定数は、. 0029 (1 / 秒) と測定された。

50

【0120】

この処方（1 mL）を2.5 kgのニュージーランドシロウサギの耳静脈に注射した。次いで、このウサギは5 MHz変換器を備えたAcuson 128XP-5超音波スキャナーで画像化した。注入すると、血管及び心室・心房の反響性は強く、数分間持続した。加えて、心筋層及び肝臓や腎臓などの固形組織の反響性は均一に強く、数分間持続した。特に、門脈及び肝静脈の反響性が同等に強いことから、肝の網内系食細胞による取り込みが最小であることが示され、その結果、血管の持続性が延長した。

【実施例6】

【0121】

長鎖／短鎖混合リン脂質から調製した気体エマルジョンの生体適合性

10

下記のエマルジョン（1 L）を、実施例2に記載した通りの噴霧乾燥のために調製した。

【0122】

3.6% w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ（味の素、東京、日本）
 3.0% w/v 塩化ナトリウム（Mallinckrodt, St.Louis, MO）
 2.6% w/v リン酸ナトリウム、二塩基性（Mallinckrodt, St.Louis, MO）
 0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性（Mallinckrodt, St.Louis, MO）
 0.22% w/v ジパルミトイルホスファチジルコリン（Syngenta Ltd., Cambridge, MA）

0.31% w/v ジオクタノイルホスファチジルコリン（Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL）

20

3.0% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン（フレオン 133; Em Science, Gibbstown NJ）

【0123】

ジオクタノイルホスファチジルコリンに対するジパルミトイルホスファチジルコリンのこれらの割合において、界面活性剤は混合ミセルのみを生成する。水（5 mL）で再構成すると、大きさが1～20ミクロンの気体エマルジョンの小滴が、1 mL当たり約51百万個観察された。投与量5 mg/kgのウサギにおいて、気体エマルジョンの反響性シグナルの一次減衰定数は、 0.0029 秒^{-1} と測定された。これは、血管内半減期の4分に相当する。

30

【0124】

気体エマルジョンはQuidel Corp. (San Diego, CA) のインビトロのC3a診断キットを使用して、補体の活性化についてアッセイした。気体エマルジョンと陰性コントロール（食塩水）との間に差が見られなかったことから、気体エマルジョンは補体を活性化しないことが示された。むき出し(naked)の微小泡が補体を活性化することはよく知られている。

【0125】

【表1】

被検サンプル	[C3a] (ng/mL)
チモサン（陽性コントロール）	43403
食塩水（陰性コントロール）	604
気体エマルジョン	412

40

【0126】

また、気体エマルジョンは麻酔下のイヌにおいて、投与量20 mg/kgでの血行力学的変化についてもアッセイした。平均動脈圧または肺動脈圧において、変化は観察されなかった。これらの結果から、臨床的に適切な投与量の10～100倍の気体エマルジョンでは、血行力学的な効果は見られないことが示される。

50

【0127】

【表2】

時間 (分)	平均動脈圧 (mmHg)	肺動脈圧 (mmHg)
0	109.4	13.3
1	109.2	14.2
2	110.4	14.1
5	115.0	14.3
10	117.9	15.7
60	111.0	13.2
90	120.9	13.6

10

【0128】

従って、同一の気体エマルジョンにおいて、優れた効果及び生体適合性が提供される。

【実施例7】

【0129】

コレステロールを補ったリン脂質を含む気体エマルジョン

下記の溶液 (0.5 L) をそれぞれ注射用水中で調製した。溶液1はでんぷん及び塩類を含み、溶液2は、フレオン113とエタノールとの混合物中に溶解したリン脂質及びコレステロールを含んだ。溶液2は高せん断ミキサーに添加し、氷浴中で冷却した。0.5 Lの水を激しく攪拌しながら加えて、1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン133) の粗懸濁液を調製した。これらの懸濁液を実施例2に記載した通りに溶液2で乳化した。得られたエマルジョンを溶液1に添加して、噴霧乾燥する下記の処方物を製造した。

20

【0130】

3.6% w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)
 3.0% w/v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 2.6% リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 0.22% w/v ジパルミトイルホスファチジルコリン (Genzyme, Cambridge, MA)
 0.31% w/v ジオクタノイルホスファチジルコリン (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)
 0.05% w/v コレステロール (Sigma, St.Louis, MO)
 2.4% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (EM Science, Gibbstown NJ)
 0.6% v/v エタノール (Spectrum Chemical, アメリカ、カリフォルニア州、Gardena)

30

【0131】

次にこのエマルジョンはおおよそ下記の設定で、液体噴霧器を二つ備えたNiro Atomizer Portable Spray Dryer (Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark) で噴霧乾燥した。

40

【0132】

加熱空気流速 31 CFM
 入口空気温度 325℃
 出口空気温度 120℃
 噴霧器空気流速 290 L/分
 エマルジョン供給速度 1.5 L/時間

【0133】

この乾燥した中空球形生成物は直径が約1 μm～約15 μmであり、この乾燥機の標準

50

であるサイクロン分離機で回収された。粉体の一部（100mgずつ）を10mLの管型のバイアル中に量り入れ、実施例2と同様に、13℃でパーフルオロヘキサンで飽和させた窒素を入れ、そして封をした。バイアルは水の注入に伴って圧力を抜くためのベントとして、18ゲージの針を挿入した後、注射用水（5mL）で再構成した。得られた微小泡の懸濁液を0.25mg/kgの投与量で、実施例2と同様に、頸動脈のドップラー超音波シグナルをモニターする機械を取り付けた、約3kgのウサギに静脈内注射した。注射1分後のシグナルは0.71Vであり、減衰定数は0.010/秒⁻¹であった。血液学的サンプルは注射後、初めの60分間に採取した。血小板数の減少は検出されず、実施例6に示された通り補体の活性化も検出されなかった。

【実施例8】

10

【0134】

再溶解した凍結乾燥リポソームのインビボでの効果

総脂質濃度が50mg/mLであるリポソーム形成溶液を、モル比9:1の水素化大豆レシチン（S PC-3, Lipoid, Ludwigshafen, Germany）及びリン酸ジセチル（Sigma, St. Louis, MO）で調製した。Szoka及びPapahadjopoulosの逆相蒸発法（Proc. Nat. Acad. Sci. 75 USA (1978), 4194）に従って、界面活性剤をジエチルエーテル/クロロホルムの1/1v/v溶液120mLに溶解した。脱イオン水40mLを加えた。混合物は3mmプローブソニケーター（50 W Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., Danbury CT）を使用して、0~4℃で10分間超音波処理し、エマルジョンを生成した。リポソーム分散液はロータリーエバポレーターで減圧下に溶媒を除去し、溶液を1.0µmポリカーボネートフィルターで、65℃で濾過することによって生成した。リポソーム溶液の分画（1mL）を、10mLの超音波バイアル中で、15%w/vマルトース（Sigma, St. Louis）（4mL）と混合し、-30℃で凍結させ凍結乾燥した（FTS Systems, Stone Ridge NY）。バイアルは窒素または13℃でパーフルオロヘキサンで飽和させた窒素で処理した。凍結乾燥した粉体は水（5mL）で再構成し下記の濃度とした。

20

【0135】

12.0%w/v マルトース（Sigma, St. Louis）

0.928%w/v 水素化大豆レシチン S PC-3（Lipoid, Ludwigshafen, Germany）

0.072%w/v リン酸ジセチル（Sigma, St. Louis）

【0136】

30

得られた微小泡の懸濁液（1mL）を、頸動脈のドップラー超音波シグナルモニターを取り付けた、約3kgのウサギの静脈内に注射した。システム6ドップラーフローモジュール（Triton Technology Inc., San Diego, CA）に接続した10MHzフローカフ（Triton Technology Inc.; モデルES-10-20）によって、LeCroy 9410オシロスコープ（LeCroy, Chestnut Ridge, NY）へRFドップラーシグナルを送った。オシロスコープによって計算されたシグナルの2乗平均（RMS）電圧はコンピュータに送られ、得られた曲線から、ピーク反響性シグナル強度及び血液中の微小泡の半減期を得た。コントラスト前のシグナルは0.1ボルトRMS未満であった。

【0137】

窒素またはパーフルオロヘキサン飽和窒素で処理した、処方を含むリポソームは、いずれも、ウサギモデルにおいて、有意なまたは継続する反響性は示さなかった。

40

【実施例9】

【0138】

凍結乾燥リポソーム処方と噴霧乾燥気体エマルジョン処方との超音波効果に対するパーフルオロヘキサン処理の効果

下記のエマルジョン（1L）をそれぞれ、実施例2に記載した通りの噴霧乾燥のために調製した。

【0139】

処方A：スクロースエステル微小泡処方

3.6%w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ（味の素、東京、日本）

50

3. 0 % w / v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 2. 6 % w / v リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 0. 3 9 % w / v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 0. 4 5 % w / v 蔗糖エステル 11025003 (Alliance Pharmaceutical Corp., San Diego, CA)
 1. 9 5 % w / v Poloxamer 188 (B A S F, Parsipany NJ)
 3. 0 % v / v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン 133; EM Science, Gibbstown NJ)

【0140】

処方B：リン脂質微小泡処方

3. 6 % w / v m-H E S ヒドロキシエチルスターチ (味の素、東京、日本)
 3. 0 % w / v 塩化ナトリウム (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 2. 6 % w / v リン酸ナトリウム、二塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 0. 3 9 % w / v リン酸ナトリウム、一塩基性 (Mallinckrodt, St.Louis, MO)
 0. 4 5 % w / v ジパルミトイルホスファチジルコリン (Genzyme, Cambridge, MA)
 0. 1 5 % w / v Poloxamer 188 (B A S F, Parsipany NJ)
 3. 0 % v / v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン 133; EM Science, Gibbstown NJ)

【0141】

処方C：凍結乾燥リポソーム処方

水中、総脂質濃度が50 mg / mLで、水素化大豆レシチン及びリン酸ジセチル (モル比9 : 1) を含有するリポソーム分散液 (約40 mL) を、Szoka及びPapahadjopoulosの逆相蒸発法 (実施例8参照) を用いて調製した。処方を下記に要約する。

【0142】

【表3】

	乾燥粉体処方 (%, w / w)	注射用再構成 (%, w / v)
水素化大豆レシチン (Lipoid S PC-3, Lipoid, Ludwigshafen, Germany)	7. 1 4	0. 9 2 8
リン酸ジセチル (Sigma, St. Louis)	0. 5 5	0. 0 7 2
マルトース (Sigma, St. Louis)	9 2. 3	1 2. 0
注射用水		5. 0 mL

【0143】

上記の組成の2本のバイアルをそれぞれ調製した。1本はパーフルオロヘキサン-窒素混合物で処理し、もう1本は窒素のみ含有した。サンプル (全6例) は水 (5 mL) で再構成し、パルス標識したドップラーシグナル増強ウサギモデルを使用して効果を評価した。処方A、B及びCのウサギへの投与量は、乾燥粉体でそれぞれウサギの体重1 kg 当たり5 mgであった。

【0144】

パーフルオロヘキサンを含まない処方A、B及びCの60秒での反響性シグナルは、それぞれ0. 040、0. 124及び0. 005 Vであり、また、それぞれのパーフルオロヘキサンを含む処方の60秒での反響性シグナルは、1. 232、0. 826及び0 Vであった。結果として、パーフルオロヘキサン処理工程を付加することによって、凍結乾燥

10

20

30

40

50

リポソーム処方の超音波の効果（ここでは60秒での反響性シグナルと規定する）は有意に増加しなかった。一方、パーフルオロヘキサンを含む噴霧乾燥したスクロースエステルの微小泡及びリン脂質の微小泡の処方では、それぞれ2980%及び482%増加した。従って、本発明の気体エマルジョンと凍結乾燥したリポソームから調製した微小泡製剤生成物との間には、構造及び挙動における本質的な差が存在する。

【実施例10】

【0145】

Schneiderらの米国特許第5,380,519号の実施例4に記載の非水溶性リン脂質を含む噴霧乾燥分散剤の効果

Schneiderらの米国特許第5,380,519号の実施例4に記載の割合でリン脂質及びリン酸ジセチルを含有する処方を、下記のエマルジョンを噴霧乾燥することによって調製した。Schneiderの実施例のように、界面活性剤を薄層としなかった（リポソームに変換しなかった）。 10

【0146】

下記の溶液（1L）をそれぞれ注射用水で調製した。溶液1はでんぷん及び塩類を含有し、溶液2は界面活性剤を含有した。溶液2は、高せん断ミキサーに添加し、氷浴中で冷却した。1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン（フレオン133）の粗懸濁液を、溶液2（1L）中で調製した。この懸濁液を、マイクロフルイドダイザーMicrofluidizer（Microfluidics Corporation, Newton, MA；モデルM-110F）を使用して、10,000 p s i、5℃で5パスさせて、乳化した。得られたエマルジョンを溶液1に加え、噴霧乾燥する下記の処方を調製した。 20

【0147】

3. 6% w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ（味の素、東京、日本）
3. 0% w/v 塩化ナトリウム（Mallinckrodt, St.Louis, MO）
2. 6% w/v リン酸ナトリウム、二塩基性（Mallinckrodt, St.Louis, MO）
0. 39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性（Mallinckrodt, St.Louis, MO）
0. 058% w/v リン酸ジセチル（Sigma, St.Louis, MO）
0. 742% w/v リン脂質PC-3（Lipoid, Ludwigshafen, Germany）
3. 0% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン（EM Science, Gibbstown NJ） 30

【0148】

次にこのエマルジョンをおよそ下記の設定で、液体噴霧器を二つ備えたNiro Atomizer Portable Spray Dryer（Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark）で噴霧乾燥した。

【0149】

加熱空気流速 31 CFM
入口空気温度 325℃
出口空気温度 120℃
噴霧器空気流速 290 L/分
エマルジョン供給速度 1.5 L/時間

【0150】

この乾燥した中空球状生成物は直径が約1μm～約15μmであり、この乾燥機の標準であるサイクロン分離機に回収された。粉体の一部（100mgずつ）を、上記の実施例と同様に10mLの管型のバイアル中に量り入れ、窒素のみまたは窒素とパーフルオロヘキサン（PFH）を入れ、そして封をした。 40

【0151】

バイアルは水の注入に伴って圧力を抜くためのベントとして、18ゲージの針を挿入した後、注射用水（5mL）で再構成した。得られた微小泡の懸濁液（1mL）を前記実施例と同様に、頸動脈のドップラー超音波シグナルをモニターする機械を取り付けた、約3kgのウサギに静脈内注射した。

【0152】

P F H使用または非使用のいずれでもシグナルが観察された。P F H含有製剤では、60秒に0.08Vのシグナル、200秒に0.02Vのシグナルが発生した。窒素のみの製剤では60秒に0.2Vのシグナル、200秒に0.04Vのシグナルが発生した。この処方にはより水溶性の界面活性剤は含まれていないので、シグナルは前の実施例よりかなり小さくなった。しかし、上記の実施例8で示したように、実施例4でSchneiderらの薄層で覆った処方とは異なり、噴霧乾燥工程では、この薄層で覆わない界面活性剤混合物は検出可能なシグナルを製造する物理的状态であった。またこの処方はパーフルオロヘキサンの添加によって、得られるシグナルが著しく増強するよりむしろ低減したことについて、この出願の他の実施例とは異なるものである。

【実施例11】

10

【0153】

非フルオロカーボン含有微小泡

下記のエマルジョンを同様の方法で噴霧乾燥することによって、2種の処方を調製した(A:混合リン脂質、B:リン脂質+Poloxamer 188)。

【0154】

下記の溶液(1L)をそれぞれ注射用水で調製した。溶液1はでんぷん及び塩類を含有し、溶液2は界面活性剤を含有した。溶液2は高せん断ミキサーに添加し、氷浴中で冷却した。1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン(フレオン133)の粗懸濁液を、溶液2(1L)中で調製した。この懸濁液をマイクロフルイダイザーMicrofluidizer(Microfluidics Corporation, Newton, MA; モデルM-110F)を使用して、10,000psi、5℃で5パスさせて乳化した。得られたエマルジョンを溶液1に加え、噴霧乾燥するための下記の処方を調製した。

20

【0155】

処方A(混合リン脂質)

- 3.6% w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ(味の素、東京、日本)
- 3.0% w/v 塩化ナトリウム(Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 2.6% w/v リン酸ナトリウム、二塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0.22% w/v ジパルミトイルホスファチジルコリン(Genzyme., Cambridge, MA)

30

0.31% w/v ジオクタノイルホスファチジルコリン(Genzyme, Cambridge, MA)
3.0% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン(EM Science, Gibbstown NJ)

【0156】

処方B(リン脂質+Poloxamer 188)

- 3.6% w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ(味の素、東京、日本)
- 3.0% w/v 塩化ナトリウム(Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 2.6% w/v リン酸ナトリウム、二塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)
- 0.15% w/v Poloxamer 188(BASF, Parsipany NJ)
- 0.45% w/v リン脂質PC-3(Lipoid, Ludwigshafen, Germany)
- 3.0% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン(EM Science, Gibbstown NJ)

40

【0157】

次にこのエマルジョンをおよそ下記の設定で、液体噴霧器を二つ備えたNiro Atomizer Portable Spray Dryer(Niro Atomizer, Copenhagen, Denmark)で噴霧乾燥した。

【0158】

加熱空気流速 31CFM
入口空気温度 325℃
出口空気温度 120℃

50

噴霧器空気流速 290 L/分

エマルジョン供給速度 1.5 L/時間

【0159】

この乾燥した中空球形生成物は直径が約1 μm ～約15 μm であり、この乾燥機の標準であるサイクロン分離機に回収された。粉体の一部(100mgずつ)を10mLの管型のバイアル中に量り入れ、窒素のみを入れ、そして封をした。

【0160】

バイアルは水の注入に伴って圧力を抜くためのベントとして、18ゲージの針を挿入した後、注射用水(5mL)で再構成した。得られた微小泡の懸濁液(1mL)を、頸動脈のドップラー超音波シグナルモニターを取り付けた、約3kgのウサギに静脈内注射した。システム6ドップラーフローモジュール(Triton Technology Inc., San Diego, CA)に接続した10MHzフローカフ(Triton Technology Inc.; モデルES-10-20)によって、LeCroy 9410オシロスコープ(LeCroy, Chestnut Ridge, NY)へRFドップラーシグナルを送った。オシロスコープによって計算されたシグナルの2乗平均(RMS)電圧は、コンピュータに送られ、得られた曲線から、ピーク反響性シグナル強度及び血液中の微小泡の半減期を得た。

10

【0161】

両処方では有意なシグナルが観察された。処方Aでは60秒に0.25Vのシグナル、200秒に0.13Vのシグナルが発生した。処方Bでは60秒に0.3Vのシグナル、200秒に0.2Vのシグナルが発生した。非リン脂質の処方では同じ方法で処理した場合、バックグラウンドのシグナルのみ発生した。

20

【0162】

上述したように、これは、界面活性剤及び構造剤が溶解することによって浸透した水が、粒子の空洞(直径0.5～1ミクロン)の内側表面に最初に接触し、界面活性剤飽和溶液によって最初に囲まれた所望のサイズ(空洞のサイズ)の泡を形成し、従って最適にパックされた界面活性剤を有し、気体の取り込みを増強することの結果であろう。このような泡は水溶性の気体(例えば空気または窒素)を封入している場合であっても、インビボで非常に安定である。

【実施例12】

【0163】

超音波反響効果に対するリン脂質のアシル鎖の長さの効果

30

下記のエマルジョン(1L)をそれぞれ、実施例2に記載した通りの噴霧乾燥のために調製した。

【0164】

処方A: ジミリストイルホスファチジルコリン処方

3.6% w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ(味の素、東京、日本)

3.0% w/v 塩化ナトリウム(Mallinckrodt, St.Louis, MO)

2.6% w/v リン酸ナトリウム、二塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.45% w/v ジミリストイルホスファチジルコリン(Genzyme, Cambridge, MA)

40

0.15% w/v Poloxamer 188(BASF, Parsippany NJ)

3.0% v/v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン(フレオン

133; EM Science, Gibbstown NJ)

【0165】

処方B: ジステアロイルホスファチジルコリン処方

3.6% w/v m-HESヒドロキシエチルスターチ(味の素、東京、日本)

3.0% w/v 塩化ナトリウム(Mallinckrodt, St.Louis, MO)

2.6% w/v リン酸ナトリウム、二塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.39% w/v リン酸ナトリウム、一塩基性(Mallinckrodt, St.Louis, MO)

0.45% w/v ジステアロイルホスファチジルコリン(Genzyme, Cambridge, MA)

50

0. 15 % w / v Poloxamer 188 (BASF, Parsipany NJ)
 3. 0 % v / v 1, 1, 2-トリクロロトリフルオロエタン (フレオン
 133; EM Science, Gibbstown NJ)

【0166】

水 (5 mL) で再構成した後、2種の処方パルス標識したドップラーシグナル増強ウサギモデルを使用して効果を評価した。ウサギへの投与量は乾燥粉体でウサギの体重 1 kg 当たり 5 mg であった。

【0167】

【表4】

		時間 (秒)							
		20	60	100	200	300	400	500	600
処方A	反響性シグナル V	0.8	0.6	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.2
処方B	反響性シグナル V	0.5	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1

10

【0168】

時間の関数としての反響性シグナルは、ジステロイルホスファチジルコリン (DSPC) を含有する処方よりも、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) を含有する処方の方が平均して大きかった。DMPCの両脂肪酸エステル鎖は14個の炭素を含有し、一方、DSPCでは両脂肪酸エステル鎖は18個の炭素を含有する。2種のリン脂質化合物の間のこの鎖長の違いによって、液晶相転移温度の異なるゲルとなる。上記のこの転移温度以上において炭化水素鎖は融解状態であり、リン脂質は液晶相を生成する。この転移温度は水中、DSPCが55.5℃であり、DMPCが23.5℃である。

20

【0169】

従って、注射後 (ウサギの体温 = 約 37.5℃) 液晶状態となるリン脂質の第一の界面活性剤の使用は有利であるといえる。

【実施例13】

【0170】

二チャンバーのバイアルを使用する微小泡の処方物

噴霧乾燥粉体 (800 mg) を、20 mL のWheaton RS-177FLWの二チャンバーのバイアル (図1) の下のチャンバーに量り入れた。バイアルはチャンバー間の封止材を挿入する前に、13℃でパーフルオロヘキサンで飽和させた窒素でフラッシュした。上のチャンバーは注射用滅菌水 (10 mL) で満たした。上のチャンバーのストッパーを挿入し、上のチャンバー内の全ての空気の泡を除去した。上のストッパーを押して、チャンバー間の封止材を下のチャンバー内に落とし、水を下のチャンバーに流し入れ、粉体を再構成した (図2)。光学顕微鏡で示されるように、無数の安定な微小泡が形成された。この方法によって、パッケージのこの形態が便利であること、及び水相を粉体に加えたときの圧力の上昇を除くためのベントを設ける必要が無くなることが示される。

30

【実施例14】

【0171】

二チャンバーのシリンジを使用する微小泡の処方物

噴霧乾燥粉体 (100 mg) を、5 mL + 5 mL のHYPAK液体 / 乾燥デュアルチャンバーシリンジ (Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ) 中に量り入れ、粉体チャンバー (針状末端) に振り入れた。次に、チャンバー間の封止材をバイパスチャネルの直ぐ上に配置した。次に、5 μMのフィルターを含有する針をシリンジの上に取り付けた。次に、粉体を含有するチャンバーは、真空チャンバー内に器具を設置し、真空にし、13℃で気体浸透圧剤であるパーフルオロヘキサンで飽和させた窒素でチャンバーを再充填することによって、気体浸透圧剤で満たした。フィルター針によって、粉体含有チャンバー内の雰囲気真空化し、再充填した。次に、封止針のカバーを針の上にかぶせた。次に、液体チャンバーを注射用水 (4 mL) で満たし、一時的なベント (全ての気泡を取り除くために、

40

50

ガラスのシリンジとプランジャとの間に挿入した針金)を使用して、プランジャを固定した。

【0172】

再構成するために針の封止カバーを外して、粉体チャンバー内に生じた圧力を除いた。次にプランジャを下げ、チャンバー間の封止材をバイパス位置に進め、水を粉体含有チャンバー内のチャンバー間の封止材の周囲へ流した。プランジャは全ての水が粉体チャンバーに入ったときに元に戻した。シリンジを振り動かして、粉体を溶解した。過剰の気体及び全ての大きな泡は、シリンジを固定し、針の末端を上げて、プランジャをさらに下げることで追い出した。次に、無数の安定化した微小泡(光学顕微鏡で観察される)を含有する溶液は、プランジャを限界まで下げることによってシリンジから出した。

10

【0173】

以上の記述は、本発明のいくつかの好ましい具体例を詳述し、予想される最良の形態を述べるものである。しかしながら、以上の記述が本文中で如何に詳細に見えても、本発明は多くの方法で実施することが可能であり、本発明は添付の請求の範囲及びあらゆる等価物に従って解釈されるべきであると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0174】

【図1】上のチャンバーに水性溶液を、下のチャンバーに固体とガス状成分を入れた、微小泡形成調製品を含む2チャンバー式のバイアルの透視図である。

【図2】患者に投与するための微小泡を形成するために、水性溶液を固体成分と混合した図1のバイアルを示す。

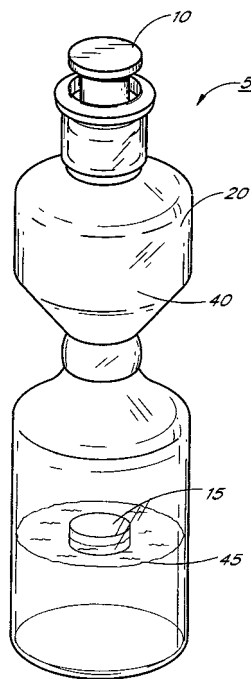
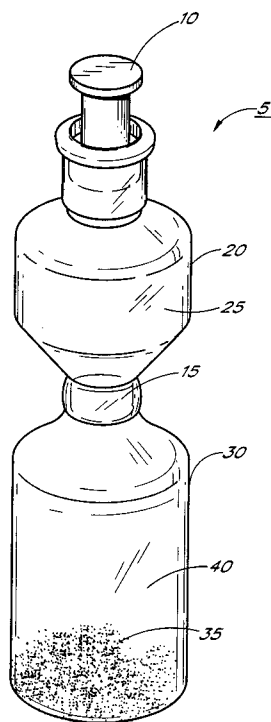
20

【図3】下のチャンバーに水性溶液を、上のチャンバーに固体とガス状の成分を入れた微小泡形成調製品を含む逆2チャンバー式のバイアルの透視図である。

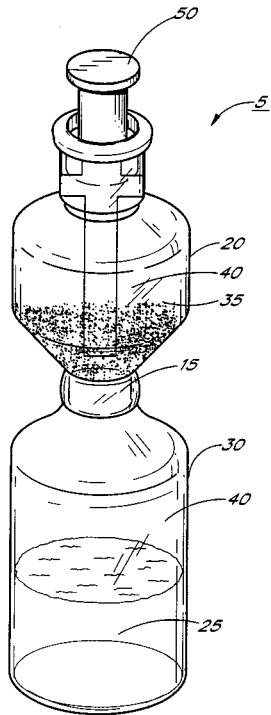
【図4】患者に投与するための微小泡を形成するために、水性溶液を固体成分と混合した図3のバイアルを示す。

【図1】

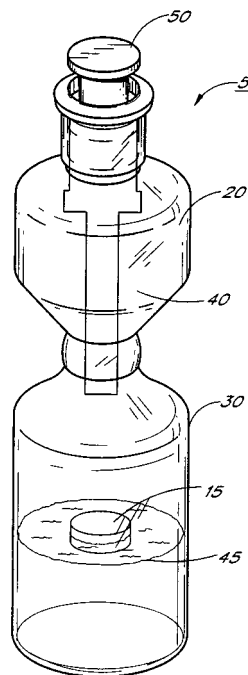
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(72)発明者 レオ エー.トレビノ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 2 サン ディエゴパルミラ ドライブ 7 6 6 5
アパートメント 5 2 1 0

(72)発明者 アーネスト ジョージ シュット

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 9 サン ディエゴ ラグウィード
ストリート 1 2 1 3 9

(72)発明者 デビッド エイチ. クライン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 8 カールスバット バッキンガム レーン 4 6 1
5

(72)発明者 トーマス イー. タララ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 2 サン ディエゴ エー ストリート 3 0 7 2

(72)発明者 ジェフェリー ジー. ウィアーズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 9 サン ディエゴ サリックス ウェイ 1 2 1 9
1

(72)発明者 アレクセイ カバルノブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0 サン ディエゴ ナンバー 3 9 3 トレイ バ
ルブ ドライブ 1 2 6 0 4

Fターム(参考) 4C076 AA19 BB12 DD63 EE41 FF43 GG16

4C085 HH09 JJ05 JJ16 KB07 KB30 LL07

专利名称(译)	含有磷脂的稳定气体乳液，用于超声波的对比度增强		
公开(公告)号	JP2005263804A	公开(公告)日	2005-09-29
申请号	JP2005077072	申请日	2005-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	Hayem SHIO伯爵制药公司		
申请(专利权)人(译)	Hayem SHIO伯爵制药公司		
[标]发明人	レオエートレビノ アーネストジョージシュット デビッドエイチクライン トーマスイータララ ジェフェリージーウィアーズ アレクセイカバルノブ		
发明人	レオ エー.トレビノ アーネスト ジョージ シュット デビッド エイチ.クライン トーマス イー.タララ ジェフェリー ジー.ウィアーズ アレクセイ カバルノブ		
IPC分类号	A61K9/127 A61B8/00 A61K49/00 A61K49/22		
CPC分类号	A61K49/223 A61K49/227		
FI分类号	A61K49/00.C A61K9/127 A61K47/24 A61K47/34 A61K49/00 A61K49/22		
F-TERM分类号	4C076/AA19 4C076/BB12 4C076/DD63 4C076/EE41 4C076/FF43 4C076/GG16 4C085/HH09 4C085/JJ05 4C085/JJ16 4C085/KB07 4C085/KB30 4C085/LL07		
代理人(译)	川口义行 永田豊 远山 勉		
优先权	08/395680 1995-02-28 US		
其他公开文献	JP4229918B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供长寿命对比增强剂，它具有生物相容性，易于制备，并在超声成像中提供出色的对比度增强。溶液：含有选自N₂，CO₂和O₂的气体的第一气体第二种气体是全氟化碳，气体混合物被成膜材料包围，稳定的充气微泡制剂在液体介质中包含第一种气体和第二种气体气体以约1：100至1000：1的摩尔比存在，第一气体在37°C具有至少约(760-x) mmHg的蒸气压，x是第二气体在37°C的蒸气压。其中第一气体和第二气体中的每一种的蒸气压在37°C下大于约75mm Hg，并且第一气体和第二气体不是水蒸气。【选择图】无

