

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-510759

(P2019-510759A)

(43) 公表日 平成31年4月18日 (2019.4.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	2 G 0 4 3
A 6 1 K 49/12 (2006.01)	A 6 1 K 49/12	4 C 0 7 6
A 6 1 K 49/06 (2006.01)	A 6 1 K 49/06	4 C 0 8 5
A 6 1 K 49/22 (2006.01)	A 6 1 K 49/22	4 C 6 0 1
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-547899 (P2018-547899)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月13日 (2017.3.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月5日 (2018.11.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/055827
 (87) 国際公開番号 WO2017/153605
 (87) 国際公開日 平成29年9月14日 (2017.9.14)
 (31) 優先権主張番号 16159884.2
 (32) 優先日 平成28年3月11日 (2016.3.11)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 516015244
 スティヒティング カトリーケ ユニヴェ
 ルシテイト
 オランダ エヌエルー6525 ヘーアー
 ネイメーヘン ヘールト フローテブレ
 イン 9
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 スリニヴァス マンガラ
 オランダ 6525 エーゼット ネイメ
 ーヘン ヘールト フローテブレイン 9
 (72) 発明者 コシキナ オルガ
 オランダ 6525 エーゼット ネイメ
 ーヘン ヘールト フローテブレイン 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イメージングのためのビーズの調製のための方法

(57) 【要約】

本発明は、a) ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を極性溶媒中の生体適合性疎水性ポリマーの溶液に加え、第1の液体混合物を提供するステップ、b) 第1の液体混合物を、ポリビニルアルコールを含む生体適合性界面活性剤の水溶液に超音波処理下に加え、第2の液体混合物を得るステップ、c) 冷却しながら第2の液体混合物の超音波処理を維持するステップ、d) 第2の液体混合物から極性溶媒を蒸発させ、生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を含むビーズの懸濁液を得るステップ、e) 懸濁液からビーズを分離し、ビーズの水懸濁液を調製するステップ、および f) 水懸濁液を凍結乾燥し、ビーズを得るステップを含む、生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボン、ポリビニルアルコールおよび任意選択で金属化合物を含むビーズの調製のための方法に関し、ステップb) における生体適合性界面活性剤への第1の液体混合物の添加は、最大で10秒の期間以内で行われ、ステップb) における超音波処理およびステップc) における超音波処理は、例えば、プローブまたは

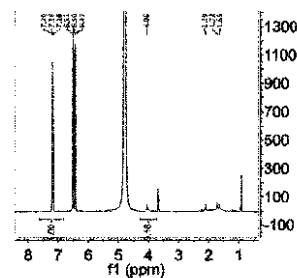


Figure 1

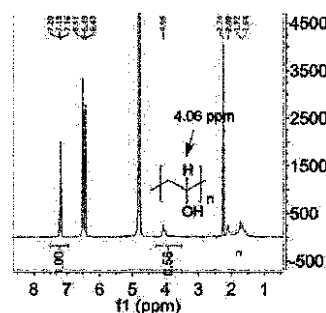


Figure 1 (continuation)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボン、ポリビニルアルコール（PVA）および任意選択で金属化合物を含むビーズの調製のための方法であって、

- a) 前記ペルフルオロカーボンおよび任意選択で前記金属化合物を極性溶媒中の前記生体適合性疎水性ポリマーの溶液に加え、第 1 の液体混合物を提供するステップ、
- b) 前記第 1 の液体混合物を PVA の水溶液および任意選択で生体適合性界面活性剤に超音波処理下に加え、第 2 の液体混合物を得るステップ、
- c) 冷却しながら前記第 2 の液体混合物の前記超音波処理を維持するステップ、
- d) 前記第 2 の液体混合物から前記極性溶媒を蒸発させ、前記生体適合性疎水性ポリマー、前記ペルフルオロカーボンおよび任意選択で前記金属化合物を含むビーズの懸濁液を得るステップ、
- e) 前記懸濁液から前記ビーズを分離し、前記ビーズの水懸濁液を調製するステップ、および
- f) 前記水懸濁液を凍結乾燥し、前記ビーズを得るステップ

を含み、

ステップ b) における前記生体適合性界面活性剤への前記第 1 の液体混合物の前記添加は、最大で 10 秒の期間以内で行われ、

ステップ b) における前記超音波処理およびステップ c) における前記超音波処理は、少なくとも $120\text{ }\mu\text{m}$ の振幅で 0.01 ~ 10 分間、前記液体混合物へと直接行われ、前記生体適合性界面活性剤と前記生体適合性疎水性ポリマーの重量比は、少なくとも 3 : 1 である、方法。

【請求項 2】

ステップ a) が、前記ペルフルオロカーボンおよび前記金属化合物を前記生体適合性疎水性ポリマーの前記溶液に加えることが関与し、前記金属化合物が、従前の希釈を伴わずに、または 1 mL の前記溶液当たり少なくとも 100 mg の前記金属化合物を含む溶液として加えられ、得られた前記第 1 の液体混合物が、エマルジョンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ a) が、好ましくは、プローブまたはフロー型超音波処理器を使用して、直接の超音波処理下で行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記生体適合性疎水性ポリマーが、ポリ（乳酸 - グリコール酸）共重合体、ポリ（乳酸）、ポリ（カプロラクトン）、ポリジメチルシロキサンおよびこれらの組合せ、好ましくは、ポリ（乳酸 - グリコール酸）共重合体からなる群から選択されるポリマーを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記極性溶媒が、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチルおよびこれらの組合せ、好ましくは、ジクロロメタンからなる群から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ペルフルオロカーボンが、ペルフルオロクラウンエーテル、ペルフルオロオクチルブロミド、ペルフルオロオクタン、ペルフルオロポリエーテル、ならびにその組合せおよび修飾からなる群から選択される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記金属化合物が、ガドリニウムを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

生体適合性界面活性剤として、PVA が存在し、任意選択で、ポリソルベートおよびポリビニルピロリドンからなる群から選択される界面活性剤が存在し、好ましくは、前記界

10

20

30

40

50

面活性剤が、ポリビニルアルコールである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 の液体混合物中の前記生体適合性疎水性ポリマーに対する前記第 1 の液体混合物中の前記ペルフルオロカーボンの重量比が、10 : 1 ~ 25 : 1、例えば、12 : 1 ~ 20 : 1、例えば、14 : 1 ~ 18 : 1 である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 の液体混合物中の前記生体適合性疎水性ポリマーに対する前記第 1 の液体混合物中の前記金属化合物の重量比が、1 : 1000 ~ 1 : 100、例えば、1 : 500 ~ 1 : 150、例えば、1 : 300 ~ 1 : 180 である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記生体適合性疎水性ポリマーに対する前記生体適合性界面活性剤の重量比が、4 : 1 ~ 10 : 1、例えば、4.5 : 1 ~ 8 : 1 または 4.8 : 1 ~ 6 : 1 である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができるか、または得られるビーズ。

【請求項 13】

生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボン、少なくとも 10 重量 % の PVA および任意選択で金属化合物を含むビーズであって、850 MHz 分光計で測定した乾燥状態での T1D および水膨潤状態での T1W の、10 kHz MAS での固体核磁気共鳴 (NMR) によって測定するようなスピン格子緩和時間を示し、

25 での T1D - T1W は、少なくとも 0.05 秒であり、かつ / または

15 での T1D - T1W は、少なくとも 0.05 秒であり、かつ / または

5 での T1D - T1W は、少なくとも 0.05 秒であり、かつ / または

- 5 での T1D - T1W は、少なくとも 0.05 秒であり、かつ / または

- 15 での T1D - T1W は、少なくとも 0.05 秒であり、かつ / または

- 25 での T1D - T1W は、少なくとも 0.05 秒である、ビーズ。

【請求項 14】

生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボン、ポリビニルアルコール、および任意選択で、ガドリニウムキレート化合物を含むビーズであって、最大で 200 nm のピーク半径 (DLS で測定)、最大で 0.2 の PDI、および少なくとも 15 重量 %、好ましくは、少なくとも 20 重量 % のペルフルオロカーボン含量を有する、ビーズ。

【請求項 15】

前記生体適合性疎水性ポリマーが、2 ~ 10 重量 % の量で PLGA を含み、前記ペルフルオロカーボンが、少なくとも 20 重量 % の量で PFC を含み、ポリビニルアルコールの量が、少なくとも 8 重量 % であり、前記重量 % が、前記ビーズの重量に対するものである、請求項 14 に記載のビーズ。

【請求項 16】

音響イメージング；超音波イメージング；超音波イメージング；内視鏡または術中イメージング；ラマン分光法を含めた分光技術；磁気共鳴イメージングまたは分光法技術、例えば、¹H または ¹⁹F の MRI または NMR または MRS；T1、T2 および T2* 強調イメージング；プロトンまたは ¹⁹F 密度強調イメージング；SPECT；PET；シンチグラフィ；バイオルミネセンスイメージングおよび蛍光イメージング断層撮影からなる群から選択される、in vitro でのイメージングのための、請求項 12 から 15 のいずれか一項に記載のビーズの使用。

【請求項 17】

音響イメージング；超音波イメージング；超音波イメージング；内視鏡または術中イメ

10

20

30

40

50

ージング；ラマン分光法を含めた分光技術；磁気共鳴イメージングまたは分光法技術、例えば、 ^1H または ^{19}F のMRIまたはNMRまたはMRS； T_1 、 T_2 および T_2^* 強調イメージング；プロトンまたは ^{19}F 密度強調イメージング；SPECT；PET；シンチグラフィ；バイオルミネセンスイメージングおよび蛍光イメージング断層撮影からなる群から選択される、*in vivo*でのイメージングにおける使用のための、請求項12から15のいずれか一項に記載のビーズ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医用イメージングにおけるコントラスト剤として有用なビーズの調製のための方法に関する。本発明はさらに、このような方法によって得ることができるビーズ、およびこのようなビーズの使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

*In vivo*でのイメージング技術は、個別化医療、および細胞治療を含めた治療にとって必要不可欠である。ある形態の細胞治療が関与する概ね10,000件の進行中の臨床試験が現在存在する(www.clinicaltrials.gov)。細胞治療の発展および最適化における重要な障害は、一旦細胞が非侵襲的様式で患者中にある場合、細胞をモニターする十分な手段が存在しないことである。イメージングが必要不可欠である他の領域は、埋込体/マトリックス/スカフォールド、薬物送達、標的療法の最適化およびモニタリング；ならびに例えば、炎症、心血管ブランクまたは腫瘍の領域における疾患状態または治療への応答をモニターすることを含む。

20

【0003】

いくつかの臨床イメージングモダリティーが利用可能であるが、どれも最適でない。このように、2つ以上のイメージングモダリティー（マルチモーダル造影剤）で視認することができる薬剤が望ましい。イメージング技術、例えば、 ^1H MRI、 ^{19}F MRI、蛍光イメージング、ならびに超音波および光音響イメージングを含めた音響イメージング技術の組合せを使用して可視化することができるような、薬剤を開発することが試みられてきた。

【0004】

30

医用イメージング手順における超音波の使用は、当技術分野で周知である。これは、最も頻繁に使用される臨床イメージングモダリティーである。超音波は、確立された安全記録を伴う経済的で非侵襲的なリアルタイム技術として公知である。これは縦断的研究のために使用することができ、反復使用は体に有害ではない。

【0005】

超音波装置は電離放射線を生じさせず、これらの操作は、放射標識の使用が関与しない。超音波イメージングを行うための装置は携帯式であり、既に広範に使用されている。超音波イメージングは潜在的に定量的であり、これは全身イメージングモダリティーではなく、したがって、標的器官に限定される。超音波イメージングは、イメージングの深さに関して限定される。

40

【0006】

典型的には、気体充填微小気泡が、超音波イメージングにおいてコントラスト剤として用いられる。これらは通常、相対的に大きなサイズ（1000～10000nmの直径）を有し、これは一般に細胞標識などの用途に適さない。さらに、これらはまた、血流外のイメージング、例えば、腫瘍イメージングに適さない。このような気体充填微小気泡は典型的には、ほぼ数秒から数分程度の短い寿命を有する。これらはまた、気泡が破裂すると、血管に対するものを含めた細胞傷害が起こり得るというさらなる不都合に苦しむ。さらに、気体充填微小気泡は不安定であり得、その結果、これらはかなりの時間貯蔵することができない。これらは典型的には、水和の後すぐに使用しなければならない。最終的に、このような大きな薬剤は、循環から離脱することができず、したがって、*in vivo*

50

でのターゲティングまたは薬物送達用途のための非常に限定された機会を提示する。これらの大きなサイズはまた、腎臓による素早いクリアランスを促進し、これはさらに *in vivo* でのこれらの有用な寿命を制限する。

【0007】

超音波コントラスト剤およびこれらの使用は、*Ultrasound contrast agents: basic principles*. Eur J Radiol. 1998 May; 27 Suppl 2: S157-60 および *Kiessling et al., Theranostics* 2011, volume 1, 127-134 において概説されている。

【0008】

米国特許出願第 20100158815 号明細書は、細胞の超音波視認性を改善するために、細胞中に内部移行されるコントラスト剤の使用について記載している。しかし、これは、薬剤が気体状であり、数時間を超える細胞トラッキングのために不安定であるという固有の不都合を有する。さらに、気体状薬剤は、例えば、膜または細胞骨格に対する細胞傷害をもたらす得る。

【0009】

米国特許出願第 20110020239 号明細書は、イメージング用途のために細胞を *ex vivo* で標識するための方法を提供し、任意の特定のコントラスト剤を詳細に記載していない。

【0010】

国際公開第 2012/113733 号は、肝疾患、より特定すると、肝細胞癌 (HCC) の磁気共鳴断層撮影 (MRT) 支援による診断におけるコントラスト媒体として使用するための、ガドリニウム化合物および / または組み込まれたペルフルオロオクチルプロミドを含むナノ粒子を開示している。

【0011】

国際公開第 2014/041150 号は、ペルフルオロクラウンエーテルおよびガドリニウムキレートを含むポリ (乳酸 - グリコール酸) 共重合体 (PLGA) 粒子、ならびに *in vitro* でのイメージングおよび *in vivo* でのイメージングのためのその使用について開示している。国際公開第 2014/041150 号において、粒子は、PLGA の溶液、ペルフルオロ - 15 - クラウン - 5 - エーテル、およびガドテリドールの溶液を混合し、カップホーンを使用した超音波処理下でポリビニルアルコールの溶液中への混合物の滴下の添加、それに続く蒸発および凍結乾燥によって調製される。国際公開第 2014/041150 号は、細胞イメージング、例えば、超音波および光音響イメージング技術に適した安定的で入手可能および有効なコントラスト剤である PLGA 粒子について開示している一方、方法、例えば、方法によって得ることができる粒子の収量をさらに改善することが当技術分野で求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

さらに、狭いサイズ分布、およびイメージングにおける高い応答を有する粒子が求められている。

【0013】

本発明の目的は、上記および / または他の必要性を満たす、イメージングに有用であるビーズを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって、本発明は、

a) ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を極性溶媒中の生体適合性疎水性ポリマーの溶液に加え、第 1 の液体混合物を提供するステップ、

b) 第 1 の液体混合物を、ポリビニルアルコール (PVA) を含有する水溶液に超音波処

10

20

30

40

50

理下で加え、第2の液体混合物を得るステップ、

c) 冷却しながら第2の液体混合物の超音波処理を維持するステップ、

d) 第2の液体混合物から極性溶媒を蒸発させ、生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボン、PVAおよび任意選択で金属化合物を含むビーズの懸濁液を得るステップ、

e) 懸濁液からビーズを分離し、ビーズの水懸濁液を調製するステップ、および

f) 水懸濁液を凍結乾燥し、ビーズを得るステップ

を含む、生体適合性疎水性ポリマー、ポリビニルアルコール、ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を含むビーズの調製のための方法を提供し、

ステップb)における生体適合性界面活性剤への第1の液体混合物の添加は、最大で10秒の期間以内で行われ、

ステップb)における超音波処理およびステップc)における超音波処理は、少なくとも120 μm の振幅で0.01~10分間、液体混合物へと直接行われ、

生体適合性界面活性剤と生体適合性疎水性ポリマーの重量比は、少なくとも3:1である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】国際公開第2014/041150号の方法(左)および新規な(右)方法によって生成された粒子の ^1H NMRスペクトル。内部参照としてレソルシノール(4.1 mg)を伴いスペクトルを測定した; 400 MHz、 D_2O 、緩和減衰 = 20 s。右のスペクトルにおける差し込み図: PVAの化学構造、加水分解されていないOH基は単純化のために示さない。

【図2】PLGA、PFCEおよび本発明によるガドテリドールを含むビーズについて測定したDSC曲線を示す。-17でのPFCEの融解なしおよび-19での結晶化なしを検出することができ、これはPFCE相が明確な融点を有さないことを示す。加熱速度2 K/分、試料の最初の重量10.3 mg、試料の最終重量5.6 mg。

【図3】本発明によるガドテリドールを有さないPLGAおよびPFCEを含むビーズ上で測定した異核オーバーハウザー増進分光法(HOESY) NMRを示す。水-プロトンおよびフッ素の間のHOESYを検出することができる。これは、ポリマーマトリックス中に分布した小さなサイズのペルフルオロカーボンドメインを有する均一な構造を示す。 D_2O 中のナノ粒子、500 MHz (^1H)、471 MHz (^{19}F)。

【図4】乾燥状態および水膨潤状態である、PLGA、PFCEおよび本発明によるガドテリドールを含むビーズ上で測定した固体NMRを示す。図4は、固体NMR(10 kHz MAS)によって測定したスピン格子緩和時間T1を示す。円で示す乾燥ナノ粒子、および四角で示す水で膨潤したナノ粒子の間のスピン格子緩和時間における差異が存在する。これは、水が全構造に自由に入ることができることを示し、ポリマー鎖の間に分布している小さなサイズのペルフルオロカーボンドメインを含有する均一な構造を再び示す。

【図5】乾燥状態および水膨潤状態である、PLGA、PFCEおよび本発明によるガドテリドールを含むビーズ上で測定した固体NMRを示す。図5は、固体NMR(10 kHz MAS)で測定したスピン-スピン緩和時間T2を示す。緑色の円によって示される乾燥ナノ粒子、および青色の四角によって示される水で膨潤したナノ粒子の間のスピン格子緩和時間において差異が存在する。

【図6】PLGA、PFCEおよびガドテリドールを含むビーズ(より高い強度を有するライン)、ならびにPFCEおよびガドテリドールを有さないPLGAを含むビーズ(より低い強度を有するライン)のX線小角散乱の結果を示す。結果は同様であり、これは粒子が均一な全球、または多分散のPFCE充填ポアを有する粒子であることを示唆し得る。

【図7】PLGA、PFCEおよびガドテリドールを含むビーズ(より低い強度を有するライン)、ならびにPFCEおよびガドテリドールを有さないPLGAを含むビーズ(より高い強度を有するライン)のX線回折の結果を示す。結果は同様である。

【図8】PLGA、PFCEおよび本発明によるガドテリドール、PLGAおよびPGA

10

20

30

40

50

を含むビーズの熱重量 (T G A) 分析の結果を示す。本発明によるビーズの結果における 4 0 0 での肩は、ビーズにおける P V A の存在を示す。

【図 9】実験 1 5 (比較) の H O E S Y 測定を示す。D 2 O 中の P F C E を装填したコア - シェルカプセルの H O E S Y N M R 。水および P F C E の間のクロスピーク (概ね - 9 2 p p m の y 軸、 4 . 8 p p m の x 軸) は殆ど存在せず、フッ素が水と相互作用しないことを示す。残留シグナルは、P F C E コアがシェルと接触している領域から来る。4 0 0 M H z (^1H)、3 7 7 M H z (^{19}F)。

【図 1 0】異なるマイクロチップを有する超音波処理器における振幅および力の間の関係を示す。3 . 2 m m のマイクロチップは、特定の振幅設定における最も高い振幅を与え、それに続いてそれぞれ、4 . 8 m m および 6 . 5 m m のマイクロチップである。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

好ましくは、振幅は、少なくとも 2 4 0 μm である。

【 0 0 1 7 】

高エネルギー超音波処理と組み合わせた、生体適合性界面活性剤の溶液への生体適合性ポリマー、ペルフルオロカーボンおよび任意選択の金属化合物の液体混合物の急速な添加は、ビーズの収量の改善をもたらしたことが驚いたことに見出された。さらに、ビーズは、P V A を含有し、驚くべき F - H₂O 相互作用を示す。

【 0 0 1 8 】

生体適合性界面活性剤の溶液への第 1 の液体混合物の急速な添加によって、最初または最後に加えられる第 1 の液体混合物に適用される超音波処理の持続時間において本質的に差異は存在しない。比較して、生体適合性界面活性剤の溶液への第 1 の液体混合物のゆっくりとした添加は、より後に加えられる混合物の部分が、より短い時間、超音波処理に曝露されることをもたらす。ステップ b) および c) における直接の超音波処理は好ましくは、プローブを使用することによって、またはフロー型超音波処理器を使用することによって行われる。例えば、カップホーンによる間接の超音波処理とは対照的に、プローブまたはフロー型超音波処理器の使用を伴う直接の超音波処理は、改善されたエネルギー移動をもたらす。プローブまたはフロー型超音波処理器を使用したこの均一な高エネルギー超音波処理は、ビーズの良好な収量をもたらした。さらに、方法は、狭い粒径分布および小さな平均粒径を有するビーズをもたらした。プローブ / フロー型超音波処理器と対照的に、例えば、国際公開第 2 0 1 4 0 4 1 1 5 0 号において使用されているカップホーンは、冷却液が充填された浴型超音波処理器であり、その温度は、冷却循環器によって制御される。このように、超音波処理の間に、超音波は水浴の充填液体およびフラスコのガラス製の壁を通過しなければならない。これらの要因は、エネルギーの損失をもたらし、さらなるパラメーター、例えば、フラスコ壁の不均一性、または冷却液の動きもしくは冷却液の高さの偏りの可能性に対して、超音波処理を敏感なものとする。理論に束縛されるものではないが、これらの要因は、得られるビーズの収量および特性における差異をもたらすと考えられる。

20

30

【 0 0 1 9 】

本発明によって得られるビーズは、いくつかのイメージングモダリティにおいて良好な視認性を有する。このようなビーズは、定性的または定量的イメージング、例えば、光音響および超音波イメージングを含めた音響イメージング、M R I イメージング、例えば、1 9 F イメージング、T 1 および T 2 強調イメージングを含めた 1 H イメージング、S P E C T、P E T、シンチグラフィおよび蛍光イメージング (蛍光色素または放射性リガンドの添加による) において有利に用いてもよい。次いで、これは、細胞標識、顕微鏡観察、組織学的検査、標的用途、薬物送達において、または *i n v i v o* および *i n v i t r o* での、異常な血管系から正常なものを区別することを含めた、血管系もしくは灌流をイメージングするために用いてもよい。蛍光色素またはルシフェラーゼ (またはルシフェラーゼをコードする核酸) が粒子に組み込まれた場合、ビーズはまた、蛍光イメージングまたはバイオルミネセンスを使用して検出し得る [P h a r m R e s 2 0 0 4

40

50

; 21:354-364]。

【0020】

用語「ビーズ」は、本明細書において、室温にて乾燥しているとき固体であり、かつ沈殿および凍結乾燥によってゾル（液体連続相に分散している固体の分散物）から回収することができる物質を意味すると理解される。本発明によるビーズはまた、反復される凍結／解凍および凍結乾燥サイクルに対して安定的である。

【0021】

リポソーム、ミセルおよびエマルジョン液滴は、本明細書において使用する場合、このように用語「ビーズ」には含まれない。分散相が気体である微小気泡の場合を除いて、これらは、またイメージング用途のための液体である分散相上の液体界面活性剤コーティング（典型的には、脂質）からなる。

10

【0022】

したがって、公開資料、例えば、Invest Radiol. 2006 Mar; 41 (3): 305-12、Radiology. 2013 Aug; 268 (2): 470-80において記述されている「ペルフルオロカーボンナノ粒子」は、「ペルフルオロカーボンエマルジョン液滴」であり、本明細書で使用されているような「ビーズ」ではない。エマルジョン液滴は、凍結乾燥によって未変化で回収することができず、エマルジョンは、凝結、クリーミング、合体および／またはオストワルド熟成に供される。これらの効果は、本明細書において使用する場合、ビーズに当てはまらない。

20

【0023】

生体適合性疎水性ポリマー

ステップa)において、極性溶媒中の生体適合性疎水性ポリマーの溶液を使用する。生体適合性疎水性ポリマーおよび極性溶媒の組合せは、極性溶媒に溶解するように生体適合性疎水性ポリマーを選択しなければならないことを認識されたい。

【0024】

用語「生体適合性」は、本明細書において使用する場合、対象に導入されたとき、対象に実質的に有害な応答をもたらさない材料の特性を指す。例えば、対象に対して外来性である材料または装置が使用されるとき、これらが実質的に有害な反応、例えば、炎症反応および／または免疫反応を誘発しないことをこれは意味する。本開示のために使用し得る生体適合性材料は、生分解性またはバイオセーフティー材料を含む。

30

【0025】

本明細書において使用する場合、ポリマーは、100mgのポリマーが室温にて1atmで100mLの水に溶解しないとき、疎水性であると決定される。

【0026】

好ましくは、生体適合性疎水性ポリマーは、ポリ（乳酸-グリコール酸）共重合体（PLGA）、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（カプロラクトン）、ポリジメチルシロキサンおよびこれらの組合せからなる群から選択されるポリマーを含む。疎水性ポリマーは、例えば、その末端基において修飾し、結合部位もしくは活性部位（例えば、「クリック」基）を組み込むか、または活性剤（例えば、蛍光色素）、もしくはさらなるポリマー、例えば、PEGを組み込み得る。特に好ましくは、生体適合性疎水性ポリマーは、PLGAである。

40

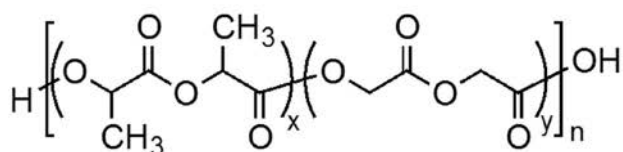
【0027】

用語「ポリ（乳酸-グリコール酸）共重合体」またはPLGAは、当技術分野で認識されている用語であり、可変の長さおよび組成の乳酸およびグリコール酸モノマーの生分解性ポリマーを意味する。PLGAビーズはまた、付加重合体、例えば、ポリ-エチレングリコール（PEG, Curr Drug Deliv. 2004 Oct; 1 (4): 321-33）を含み得る。PLGAビーズ／粒子は当技術分野において公知であり、イメージングにおける使用について記載されてきた（例えば、Biomaterials. 2010 Sep; 31 (27): 7070-7）。PLGAの構造を、式1において示す（xおよびyは、それぞれ、乳酸およびグリコール酸の単位の数を示す）。

50

化学式 1

【化 1】



【0028】

気体充填 P L G A 粒子はまた、超音波における使用について示唆されてきた。中国特許出願第 1 0 1 5 7 4 5 3 0 A 号明細書は、P L G A - P E G - P L G A マルチポリマー微小気泡超音波コントラスト剤の使用について記載しており、ここで、微小気泡は、気体、例えば、ペルフルオロプロパン、デカフルオロブタンまたは六フッ化硫黄を含む。

10

【0029】

ペルフルオロカーボン

ペルフルオロカーบอนを、液体として生体適合性疎水性ポリマーの溶液に加える。用語「液体」は、本明細書において使用する場合、体温（37 摂氏温度）および標準的大気圧（概ね 1 0 0 0 ヘクトパスカル）で単離した形態にあるとき、化合物の液体の物理的状態を指す。

【0030】

用語「ペルフルオロカーボン」は、本質的に全ての、または全ての炭素 - 水素結合が炭素 - フッ素結合によって置き換えられている、炭素化合物またはポリマーを指す。ペルフルオロカーボンには、他の元素、例えば、酸素を含むことができる。好ましいペルフルオロカーボンには、ペルフルオロポリエーテル、ペルフルオロクラウンエーテル、ペルフルオロオクタン、ペルフルオロオクチルプロミドおよびペルフルオロポリエーテル、ならびにその組合せおよび修飾を含む。特に、好ましいペルフルオロカーボンには、ペルフルオロクラウンエーテルである。

20

【0031】

用語「ペルフルオロクラウンエーテル」（P F C E）は、安定的な環構造において共有結合をしている炭素、酸素およびフッ素を含有する環状ペルフルオロカーボンとして解釈される。

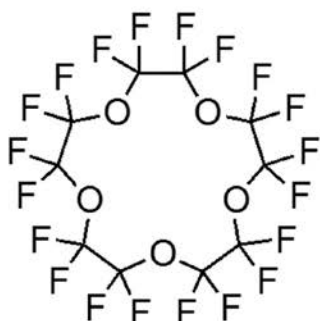
30

【0032】

特に有用なペルフルオロクラウンエーテルは、その構造を式 2 に示すペルフルオロ - 1 5 - クラウン - 5 - エーテルである。

化学式 2

【化 2】



40

【0033】

金属化合物

金属化合物は 1 H M R I におけるコントラストの可能性を加え、すなわち、金属化合物は、M R I コントラスト剤としての役割を果たし得る。

【0034】

用語「金属化合物」は、金属それ自体、および金属を含む化合物、例えば、金属キレー

50

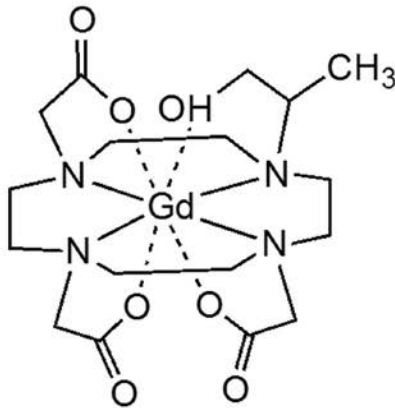
トを指す。金属は、遷移金属、アルカリ金属および希土類金属を含めた、元素の周期律表において金属として定義されている元素である。

【 0 0 3 5 】

特定の好ましい金属化合物は、ランタニド、例えば、ガドリニウム (G d) を含む。ガドリニウムキレートは、ガドテリドールを含む、例えば、「 P r o h a n c e (登録商標) 」と称される組成物として市販されている。ガドテリドールの構造を式 3 において示す。

化学式 3

【 化 3 】



10

20

【 0 0 3 6 】

ステップ a)

ステップ a) は、ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を極性溶媒中の生体適合性疎水性ポリマーの溶液に加え、第 1 の液体混合物を提供することが関与する。ペルフルオロカーボンは、液体として加えられる。

【 0 0 3 7 】

ステップ a) が、生体適合性疎水性ポリマーの溶液に金属化合物を加えることが関与するとき、ステップ a) は、第 1 の液体混合物がエマルジョンとして得られるように、例えば、プローブまたはフロー型超音波処理器を使用した直接の超音波処理下で行われる。これは、より狭いサイズ分布およびより小さな平均サイズをもたらす。当業者はエマルジョンが得られたかどうかを容易に視覚的に決定することができ、したがって、ステップ a) において適用されるエネルギー (超音波処理の振幅および持続時間) を調節することができる。

30

【 0 0 3 8 】

好ましくは、金属化合物は、相対的に多量の金属化合物を含む溶液として、例えば、 1 m L の溶液当たり少なくとも 1 0 0 m g 、 1 m L の溶液当たり少なくとも 2 0 0 m g 、または 1 m L の溶液当たり少なくとも 2 5 0 m g が加えられる。例えば、市販の薬剤である P r o h a n c e (登録商標) は、 1 m L の溶液当たり 2 7 9 . 3 m g のガドテリドールを含む溶液である。このような溶液は、希釈を伴わずに加えることができる。生体適合性疎水性ポリマーと混合される高濃度の金属化合物は、安定的なエマルジョン液滴をもたらす、これはより高い収量および / またはより良好なサイズ分布をもたらす。

40

【 0 0 3 9 】

ステップ a) が金属化合物を生体適合性疎水性ポリマーの溶液に加えることが関与しないとき、得られた第 1 の液体混合物は、ペルフルオロカーボンの相および生体適合性疎水性ポリマーの溶液の相を含む多相系である。

【 0 0 4 0 】

好ましくは、生体適合性疎水性ポリマーの溶液の極性溶媒は、有機溶媒であり、ジクロロメタン (D C M) 、クロロホルム、酢酸エチルおよびこれらの組合せからなる群から選択される。室温での蒸発を可能とするその低い沸点によって、 D C M の使用が好ましい。

【 0 0 4 1 】

50

好ましくは、第1の液体混合物中の生体適合性疎水性ポリマーに対する第1の液体混合物中のペルフルオロカーボンの重量比は、10 : 1 ~ 25 : 1、例えば、12 : 1 ~ 20 : 1、例えば、14 : 1 ~ 18 : 1である。

【0042】

好ましくは、第1の液体混合物中の生体適合性疎水性ポリマーに対する第1の液体混合物中の金属化合物の重量比は、1 : 1000 ~ 1 : 100、例えば、1 : 500 ~ 1 : 150、例えば、1 : 300 ~ 1 : 180である。

【0043】

ステップb)

ステップb)は、第1の液体混合物をPVAの水溶液および任意選択で他の生体適合性界面活性剤に超音波処理下に加え、第2の液体混合物を得ることが関与する。第2の液体混合物は、エマルジョンである。

【0044】

PVAは、生体適合性界面活性剤として適用される。第2の液体混合物はまた、例えば、ポリソルベートおよびポリビニルピロリドンおよびこれらの組合せからなる群から選択される他の界面活性剤を含有し得る。ポリソルベートは、例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート80であり得る。特に好ましくは、生体適合性界面活性剤は、PVAである。

【0045】

ステップb)における生体適合性界面活性剤溶液への第1の液体混合物の添加は、最大で10秒、例えば、1 ~ 8秒または3 ~ 6秒の期間以内で行われる。

【0046】

直接の超音波処理は、本発明によるビーズを作製するための成分を含有する混合物中で直接行われる。好ましくは、プローブまたはフロー型超音波処理器が、成分の混合物に対して超音波処理を適用するために使用されている。適用時間は、使用する系によって変化させることができ、一般に、0.01分 ~ 10分である。プローブが使用されているとき、時間は典型的には1 ~ 10分である。フロー型超音波処理器が使用されているとき、時間は、より短く、例えば、0.01 ~ 5分であり得る。

【0047】

プローブを超音波処理のために混合物中に挿入し、例えば、カップホーンまたはマイクロプレートホーンによって提供される間接の超音波処理とは対照的に、混合物に対して直接の超音波処理を実現する。プローブはまた、マイクロチップまたはマイクロチッププローブと称してもよく、相対的に小さな直径、例えば、3 ~ 7 mm、例えば、3 mm、3.2 mm、5 mm、6 mmおよび6.5 mmを有する。最も好ましくは、プローブは、その非常に高い強度のために、3 mmまたは3.2 mm (1/8インチ)の直径を有する。

代わりに、この直接の超音波処理はまた、液体とまた直接接触しているフロー型超音波処理セル中で行うことができた。

【0048】

ステップb)に適したプローブは、ステップa)およびステップc)に適している。同じタイプのプローブを、ステップb)およびc)、またはb)、c)およびa)のために使用し得る。ステップb)、c)およびa)の間に異なるタイプのプローブを使用することがまた可能である。実際的な観点から、同じプローブを、ステップb)およびc)のために使用する。

【0049】

ステップb)における超音波処理およびステップc)における超音波処理は、例えば、0.01 ~ 10分間の少なくとも120 μm、好ましくは、少なくとも240 μmの振幅でのプローブによって行う。振幅は、超音波処理の間のピークからピークまでのプローブの1つの動きの距離であり、超音波処理の強度の尺度である。所望の振幅は、プローブ直径によって設定の百分率を調節することによって達成し得る。例えば、240 μmの振幅は、3.2 mmの直径を有するプローブについて、例えば、超音波処理器を約30%に設

10

20

30

40

50

定することによって達成し得る。このような設定において、ステップb)およびc)において第2の液体混合物に適用される総エネルギーは、3分で約2700Jであり得る。300 μ mの振幅は、3.2mmの直径を有するプローブについて、例えば、超音波処理器を約40%に設定することによって達成し得る。このような設定において、ステップb)およびc)において第2の液体混合物に適用される総エネルギーは、3分で約4140Jであり得る。プローブがより大きな直径を有するとき、超音波処理器の設定は、同じ振幅を達成するためにより高い百分率に設定し得る。超音波処理は典型的には、16~24kHz、例えば、20kHzの周波数で行われる。

【0050】

好ましくは、ステップb)およびステップc)における超音波処理の持続時間は、2~6分、例えば、2.5~5分である。

10

【0051】

好ましくは、ステップb)およびステップc)における超音波処理の振幅は、250~500 μ m、例えば、270~400 μ m、例えば、290~350 μ mである。

【0052】

特に好ましくは、ステップb)における超音波処理およびステップc)における超音波処理は、290~350 μ mの振幅で2.5~5分間プローブによって行われる。

【0053】

好ましくは、生体適合性界面活性剤の水溶液は、0.5~3.0重量%、例えば、1~2.5重量%、例えば、1.5~2.0重量%の濃度を有する。

20

【0054】

生体適合性疎水性ポリマーに対する生体適合性界面活性剤の重量比は、3:1~10:1、例えば、4:1~8:1または5:1~6:1である。生体適合性疎水性ポリマーに対する生体適合性界面活性剤の重量比が、少なくとも4:1であることが特に好ましく、これは、より小さな粒径およびより狭い粒径分布をもたらす。

【0055】

ステップc)

ステップc)は、例えば、氷水浴中に第2の液体混合物を含有する容器を置くことによって、冷却しながら第2の液体混合物の超音波処理を維持することが関与する。

30

【0056】

ステップd)

ステップd)は、極性溶媒をステップc)によって得られる第2の液体混合物から蒸発させ、ビーズの懸濁液を得ることが関与する。

【0057】

これは、例えば、3 から室温以内の温度にて、好ましくは、攪拌させながら行い得る。蒸発の持続時間は、例えば、6~24時間でよい。極性溶媒の蒸発の後、PLGA、PFCEおよび任意選択で金属化合物を含むビーズは沈殿し、ビーズの懸濁液が得られる。

【0058】

ステップe)

ステップe)は、ステップd)によって懸濁液から得たビーズを分離し、ビーズの水懸濁液を調製することが関与する。

40

【0059】

分離は、例えば、遠心分離によって行い得る。遠心分離の加速および持続時間は、当業者が適切に選択し得る。例えば、遠心分離は、例えば、15~60分間（例えば、30~40分間）、例えば、15000~30000g（例えば、16087gまたは27200g）で行い得る。

【0060】

分離したビーズを、適切な量の水に再懸濁する。ステップd)によって得たビーズをこのように洗浄する。再懸濁は、浴型超音波処理または他の技術を含めた超音波処理によって行い得る。

50

【 0 0 6 1 】

分離および再懸濁ステップは、所望の通り繰り返し得る。

【 0 0 6 2 】

ステップ f)

ステップ f) は、ステップ e) によって得た水懸濁液を凍結乾燥し、本発明によるビーズを得ることが関与する。凍結乾燥は、液体 N₂、または凍結相の間に - 5 0 の最大温度を有する別の凍結系を使用して、当技術分野において周知のように行い得る。

【 0 0 6 3 】

好ましくは、本発明による方法は、ステップ a) において使用される 1 m g の生体適合性疎水性ポリマー当たり少なくとも 1 m g のビーズをもたらす。より好ましくは、本発明による方法は、ステップ a) において使用される 1 m g の生体適合性疎水性ポリマー当たり少なくとも 1 . 2 m g、少なくとも 1 . 5 m g または少なくとも 1 . 8 m g のビーズをもたらす。

10

【 0 0 6 4 】

一部の好ましい実施形態では、本発明は、

- a) ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を極性溶媒中のポリマー（好ましくは、P L G A）の溶液に加え、第 1 の液体混合物を提供するステップ、
- b) 第 1 の液体混合物を、生体適合性界面活性剤であるポリビニルアルコールの水溶液、および任意選択で、ポリソルベートまたはポリビニルピロリドンからなる群から選択されるさらなる界面活性剤に超音波処理下に加え、第 2 の液体混合物を得るステップ、
- c) 冷却しながら第 2 の液体混合物の超音波処理を維持するステップ、
- d) 第 2 の液体混合物から極性溶媒を蒸発させ、ポリマー（好ましくは、P L G A）、ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を含むビーズの懸濁液を得るステップ、
- e) 懸濁液からビーズを分離し、ビーズの水懸濁液を調製するステップ、および
- f) 水懸濁液を凍結乾燥し、ビーズを得るステップ

20

を含む、ポリ（乳酸 - グリコール酸）共重合体、ポリ（乳酸）、ポリ（カプロラクトン）、ポリジメチルシロキサンおよびこれらの組合せからなる群から選択されるポリマー、ペルフルオロカーボン、ならびに任意選択で金属化合物を含むビーズの調製のための方法を提供し、

ステップ b) における生体適合性界面活性剤への第 1 の液体混合物の添加は、最大で 1 0 秒の期間以内で行われ、

30

ステップ b) における超音波処理およびステップ c) における超音波処理は、プローブによって少なくとも 1 2 0 μ m の振幅で 1 ~ 1 0 分間、液体混合物中で直接行われ、ポリマー（好ましくは、P L G A）に対する生体適合性界面活性剤の重量比は、少なくとも 3 : 1 である。

超音波処理は好ましくは、少なくとも 2 4 0 μ m の振幅で行われる。

【 0 0 6 5 】

本発明による方法は、バッチ式で行い得る。代わりに、本発明による方法は、連続（微小）流プロセスにおいて行い得る。連続プロセスにおいて、直接の超音波処理は、フロー型超音波処理セルにおいて行うことができる。

40

【 0 0 6 6 】

ビーズ

本発明はまた、本発明による方法によって得ることができるか、または得られるビーズに関する。

【 0 0 6 7 】

本発明はまた、均一な多ドメイン構造を有するビーズを調製するための本発明による方法の使用を提供し、ビーズは、生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボン、少なくとも 1 0 重量 % のポリビニルアルコールおよび任意選択で金属化合物を含む。

【 0 0 6 8 】

本発明はまた、均一な多ドメイン構造を有するビーズを提供し、ビーズは、生体適合性

50

疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボンおよび任意選択で金属化合物を含む。

【0069】

別の態様によれば、本発明は、生体適合性疎水性ポリマー、ペルフルオロカーボン、PVAおよび任意選択で金属化合物を含むビーズを提供し、ビーズは、850MHz分光計での乾燥状態でのT1Dおよび水膨潤状態でのT1Wの、10kHz MASでの固体核磁気共鳴(NMR)によって測定するようなスピン格子緩和時間を示し、

25 でのT1D - T1Wは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

15 でのT1D - T1Wは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

5 でのT1D - T1Wは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

- 5 でのT1D - T1Wは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

- 15 でのT1D - T1Wは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

- 25 でのT1D - T1Wは、少なくとも0.05秒である。

10

【0070】

乾燥状態のビーズは、ステップf)の後に得た凍結乾燥したビーズとして理解される。水膨潤状態のビーズは、水に10分間浸漬し、21000gの遠心分離に供したビーズとして理解される。

【0071】

本発明によるビーズは、850MHz分光計での乾燥状態でのT2Dおよび水膨潤状態でのT2Wの、10kHz MASでの固体核磁気共鳴(NMR)によって測定するようなスピン-スピン緩和時間を示し得、

25 でのT2W - T2Dは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

20 でのT2W - T2Dは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

15 でのT2W - T2Dは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

5 でのT2W - T2Dは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

- 5 でのT2W - T2Dは、少なくとも0.03秒であり、かつ/または

- 15 でのT2W - T2Dは、少なくとも0.05秒であり、かつ/または

- 25 でのT2W - T2Dは、少なくとも0.01秒である。

20

【0072】

好ましくは、二次元異核 ^1H - ^{19}F NMR測定において、金属化合物を含まない本発明によるビーズは、 ^1H の4.7ppmでのピークおよび ^{19}F の-92ppmでのピークの間の異核オーバーハウザー増進を示す。

30

【0073】

本発明によるビーズは、好ましくは、ポリ(乳酸-グリコール酸)共重合体(PLGA)、ポリ(乳酸)(PLA)、ポリ(カプロラクトン)、ポリジメチルシロキサンおよびこれらの組合せからなる群から選択される生体適合性疎水性ポリマーを含む。

最も好ましくは、生体適合性ポリマーは、PLGAを含む。

【0074】

生体適合性ポリマーの量は、ビーズの重量に対して、好ましくは、2~10重量%、より好ましくは、3~8重量%の範囲である。

【0075】

本発明によるビーズは、生体適合性界面活性剤としてポリビニルアルコールを含む。ビーズにおける生体適合性界面活性剤の存在は、例えば、熱重量分析または ^1H -NMRによって決定し得る。本発明によるビーズにおけるPVAの量は、ビーズの重量に対して8~40重量%、好ましくは、10~35重量%、または11~30重量%であり得る。ビーズにおける生体適合性界面活性剤の量は、Journal of Controlled Release 82 (2002) 105-114に記載されているように、例えば、比色法によって決定し得る。

40

【0076】

好ましくは、PVAの量は、 ^1H -NMRによって決定される。

【0077】

50

PVAは、異なる分子量を有することができる。例えば、Mwは、5000～500000の範囲であることができる。好ましくは、Mwは、6000～20000、または7000～15000ダルトンの範囲である。

【0078】

PVAは、加水分解の程度60～99%、好ましくは、70～90%を有することができる。

【0079】

好ましくは、本発明によるビーズは、動的光散乱(DLS)によって決定するように、最大で200nmのピーク半径および最大で0.2のPDIを有する。

【0080】

好ましくは、本発明によるビーズは、動的光散乱(DLS)によって決定するように、最大で150nm、または140nm、より好ましくは、90～130nmのピーク半径を有する。

【0081】

好ましくは、本発明によるビーズは、動的光散乱(DLS)によって決定するように、最大で0.15または0.14、より好ましくは、最大で0.13、より好ましくは、最大で0.10のPDIを有する。

【0082】

好ましくは、本発明によるビーズにおけるペルフルオロカーボン(好ましくは、PFCE)の量は、ビーズに対して、少なくとも15重量%、より好ましくは、少なくとも20重量%、例えば、25～50重量%である。より高いペルフルオロカーボン含量は、イメージングの感受性のためにより有益である。

【0083】

本発明によるビーズは、PLGA-ペルフルオロカーボンナノカプセルに対する従来技術を含めた、文献(IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2014 Jan; 61(1): 5-15, High-frequency (20 to 40 MHz) acoustic response of liquid-filled nanocapsules)において他の薬剤について記載されてきたようなコア-シェル構造、またはペルフルオロカーボンエマルジョン液滴、またはそれどころか相変化ペルフルオロカーボン液滴および微小気泡とは対照的に均一な構造(図1～5を参照されたい)を有する。ポリマーマトリックス中に分布している複数のペルフルオロカーボンドメインを伴うこの独特の構造は、特に、超音波イメージング、光音響イメージングおよびさらなる用途、例えば、送達剤または治療剤に関してははっきりとした可能性につながる。

【0084】

ビーズ中のさらなる成分

本発明によるビーズは、所望のイメージング目的のためのビーズの使用を可能とするためのさらなる成分を含み得る。

【0085】

例えば、本発明によるビーズは、in vivoでの用途のためにまたは細胞標識を増強するためにターゲティング剤を含み得る。用語「ターゲティング剤」は本明細書において、ビーズに関連性のある部位、または特定の細胞もしくは細胞型にin vivoもしくはin vitroで方向付ける薬剤を指す。特に有利なターゲティング剤は、抗体、ナノボディおよび受容体リガンドを含む。

【0086】

本発明によるビーズは、蛍光剤、例えば、蛍光色素、量子ドット、炭素ドット、グラフェンドットまたは蛍光タンパク質、または蛍光剤をコードする核酸を含み得る。これは、in vivo、および組織学的または他の顕微鏡分析を含めた、ビーズの蛍光イメージングを可能とする。

【0087】

本発明によるビーズは、放射性核種を含み得る。これは、オートラジオグラフィー、シンチグラフィー、SPECT、PET、または放射活性化合物を検出することができる他の検出方法を可能とする。また、ルシフェラーゼ酵素、またはルシフェラーゼ（もしくは関連する酵素）をコードする核酸ベクターを組み込むことによって、バイオルミネセンスを、*in vivo*での検出のために使用することができる。

【0088】

ビーズはまた、生体適合性を修飾するさらなる薬剤、例えば、PEGまたは修飾されたPEGコーティングでコーティングし得る。

【0089】

特定のイメージング目的のための本発明によるビーズの使用に必要な成分は公知である。

10

【0090】

これらの成分は、第1の液体混合物が所望のさらなる成分を含有するようにステップa)において、または第2の液体混合物が所望のさらなる成分を含有するようにステップb)において、適切な形態で加えてもよい。例えば、ターゲティング目的のために、少しの薬剤をコーティングとしてビーズに加えてもよい。

【0091】

ビーズの使用

本発明は、音響イメージング；光音響イメージング；超音波イメージング；内視鏡または術中イメージング；ラマン分光法を含めた分光技術；磁気共鳴イメージングまたは分光法技術、例えば、¹Hまたは¹⁹FのMRIまたはNMRまたはMRS；T1、T2およびT2*強調イメージング；プロトンまたは¹⁹F密度強調イメージング；SPECT；PET；シンチグラフィー；バイオルミネセンスイメージングおよび蛍光イメージング断層撮影からなる群から選択される、*in vitro*でのイメージングのための本発明によるビーズの使用に関する。

20

【0092】

本発明はさらに、音響イメージング；光音響イメージング；超音波イメージング；内視鏡または術中イメージング；ラマン分光法を含めた分光技術；磁気共鳴イメージングまたは分光法技術、例えば、¹Hまたは¹⁹FのMRIまたはNMRまたはMRS；T1、T2およびT2*強調イメージング；プロトンまたは¹⁹F密度強調イメージング；SPECT；PET；シンチグラフィー；バイオルミネセンスイメージングおよび蛍光イメージング断層撮影からなる群から選択される、*in vitro*でのイメージングにおいて使用するための本発明によるビーズに関する。

30

【0093】

*in vitro*でのイメージングは、診断イメージング、解剖学的イメージング、転移および血管系のイメージング、定量的イメージング、定性的イメージング、治療イメージング、細胞移植片のイメージング、細胞療法のイメージング、*in vitro*での細胞標識、*in vitro*での顕微鏡観察または*in vitro*での組織学的検査の目的のためであり得る。

【0094】

本発明は、音響イメージング；光音響イメージング；超音波イメージング；内視鏡または術中イメージング；ラマン分光法を含めた分光技術；磁気共鳴イメージングまたは分光法技術、例えば、¹Hまたは¹⁹FのMRIまたはNMRまたはMRS；T1、T2およびT2*強調イメージング；プロトンまたは¹⁹F密度強調イメージング；SPECT；PET；シンチグラフィー；バイオルミネセンスイメージングおよび蛍光イメージング断層撮影からなる群から選択される、*in vivo*でのイメージングのための本発明によるビーズの使用に関する。

40

【0095】

本発明はさらに、音響イメージング；光音響イメージング；超音波イメージング；内視鏡または術中イメージング；ラマン分光法を含めた分光技術；磁気共鳴イメージングまた

50

は分光法技術、例えば、 ^1H または ^{19}F のMRIまたはNMRまたはMRS； T_1 、 T_2 および T_2^* 強調イメージング；プロトンまたは ^{19}F 密度強調イメージング；SPECT；PET；シンチグラフィー；バイオルミネセンスイメージングおよび蛍光イメージング断層撮影からなる群から選択される、*in vivo*でのイメージングにおける使用のための本発明によるビーズに関する。

【0096】

*in vivo*でのイメージングは、診断イメージング、解剖学的イメージング、転移および血管系のイメージング、定量的イメージング、定性的イメージング、治療イメージング、細胞移植片のイメージング、細胞療法のイメージング、*in vivo*での細胞標識、*in vivo*での顕微鏡観察または*in vivo*での組織学的検査の目的のためであり得る。

10

【0097】

本発明は、本明細書に記載されているフィーチャの全ての可能な組合せに関することが留意され、特に好ましいのは、特許請求の範囲において存在するフィーチャのこれらの組合せである。したがって、本発明による組成物に関するフィーチャの全ての組合せ；本発明による方法に関するフィーチャの全ての組合せ、および本発明による組成物に関するフィーチャの全ての組合せ、および本発明による方法に関するフィーチャは、本明細書に記載されていることが認識される。

【0098】

用語「含む」は、他の要素の存在を除外しないことがさらに留意される。しかし、特定の成分を含む生成物/組成物についての説明はまた、これらの成分からなる生成物/組成物を開示することをまた理解すべきである。これらの成分からなる生成物/組成物は、生成物/組成物の調製のためのより単純でより経済的な方法を提供するという点で有利であり得る。同様に、特定のステップを含む方法についての記載はまた、これらのステップからなる方法について説明することをまた理解すべきである。これらのステップからなる方法は、より単純でより経済的な方法を提供するという点で有利であり得る。

20

【0099】

本発明を、下記の実施例によってこれから明らかにするが、しかし、これらに限定されない。

【実施例】

30

【0100】

実験1～6：金属化合物を含むビーズの調製

PLGA (100 mg、resomer 502 H) を、3 mL のジクロロメタンに溶解した。ペルフルオロ-15-クラウン-5エーテル (900 μL 、1600 mg) および Prohance (1.78 mL、497 mg のガドテリドール) を PLGA の溶液に加え、3 mm のチップ直径を有するマイクロチップを40%の振幅で15秒間使用して、第1のエマルジョンを超音波処理によって形成した (Branson からの Digital Sonifier s250)。この第1のエマルジョンを、丸底フラスコ中のポリ (ビニルアルコール) の溶液 (9000 ~ 10000 Da の Mw および 80% 加水分解) (25 g の水および 100 ~ 500 mg の PVA) に急速に (10 秒以内に) 加え、その間に、PVA 含有フラスコの超音波処理を開始した。全混合物は、3 mm のチップ直径を有するマイクロチップを20%または40%の振幅で使用して氷水浴において超音波処理し、第2のエマルジョンを得た。20%の超音波処理の設定は、約 160 μm の振幅を指し、一方、40%の超音波処理の設定は、約 300 μm の振幅を指す。

40

第1のエマルジョンの添加から超音波処理の終わりまでの期間の持続時間は3分であった (Branson からの Digital Sonifier s250)。

【0101】

超音波処理の後、ジクロロメタンを攪拌しながら4 または室温にて一晚蒸発させ、ビーズの凝固を達成した。ビーズを50 mL の遠心分離管において20分間の27200 g の遠心分離によって単離し、25 g の水に再懸濁した。洗浄ステップをさらに2回繰り返す。

50

返し、第2の洗浄の後に超音波処理による再懸濁（超音波処理浴、Diagenode Bioruptor）を伴った。洗浄後、ビーズを4 mLの水に再懸濁させ、液体N₂で凍結し、凍結乾燥した。このように得られた生成物は、白色の粉末であった。

【0102】

異なる成分の量および超音波処理振幅を、ビーズの特性および収量と一緒に表1において示す。

【0103】

【表1】

表1

実験 番号	PVA ／mg	超音波処理の 振幅	半径 (DLS；強度) ／nm	PDI	PFCE 含量／重量%	収量／mg
1	100	20%	357	0.49	11	77
2	500	20%	121	0.1	5.3	55
3	100	40%	314	0.39	28	137
4	200	40%	174	0.2	34	189
5	350	40%	146	0.15	39	184
6	500	40%	121	0.123	45	204

【0104】

狭い粒径分布を有する小さなビーズは、本発明による方法によって得た（実験4、5および6）。高い振幅（40%）および多量のPVA（200 mg（8.3重量%）、350 mg（13.7重量%）または500 mg（18.5重量%））は、小さな半径、低いPDI、高いPFCE含量および高収率の望ましい組合せをもたらしたことを観察することができる。

【0105】

実験7～9：金属化合物を有さないビーズの調製

PLGA（100 mg、resomer 502 H）を、3 mLのジクロロメタン（DCM）に溶解し、それに続いてペルフルオロ-15-クラウン-5エーテル（900 μL）を加えた。このように得られた二重相液体を、丸底フラスコ中のポリ（ビニルアルコール）の溶液（25 gの水および100～500 mgのPVA）にガラス製ビペットで急速に加え、その間に、超音波処理を開始した。PLGA/DCMの相およびPFCEの相を、一定の比で同時に加えるように気をつけた。全混合物は、3 mmのチップ直径を有するマイクロチップを20%または40%の振幅で使用して氷水浴において超音波処理し、エマルジョンを得た。二重相液体の添加から超音波処理の終わりまでの期間の持続時間は3分であった（BransonからのDigital Sonifier s250）。

【0106】

超音波処理の後、ジクロロメタンを攪拌しながら4 または室温にて一晚蒸発させ、ビーズの凝固を達成した。ビーズを50 mLの遠心分離管において35分間の27200 gでの遠心分離によって単離し、25 gの水に再懸濁した。洗浄ステップをさらに2回繰り返し、第2の洗浄の後に超音波処理による再懸濁（超音波処理浴、Diagenode Bioruptor）を伴った。洗浄後、ビーズを4 mLの水に再懸濁させ、液体N₂で凍結し、凍結乾燥した。このように得られた生成物は、少なくとも100 mgの収量を伴って白色の粉末であった。

【0107】

【表 2】

表 2

実験 番号	PVA ／mg	超音波処理の 振幅	半径 (DLS；強度) ／nm	PDI	PFCE 含量／重量%	収量／mg
7	100	20%	354	0.25	15	86
8	100	40%	339	0.24	25	116
9	500	40%	100	0.04	48	154

10

【0108】

狭い粒径分布および高いPFCE含量を有する小さなビーズは、本発明の方法によって高収率で得た（実験9）。

【0109】

実験10～12（比較）

PLGAを表3において示す溶媒に溶解したことを除いては、実験6を繰り返した。

【0110】

【表 3】

表 3

実験 番号	溶媒	PVA ／mg	超音波処理の 振幅	半径 (DLS；強度) ／nm	PDI	PFEC 含量／重量%	収量／mg
10	THF	500	40%	171	0.5	15	131
11	アセトン	500	40%	294	0.66	8	90
12	アセトニトリル	500	40%	223	0.22	5	95

20

【0111】

得られたビーズはより大きく、溶媒がジクロロメタンであった実験より広範なサイズ分布を有する。

【0112】

実施例1～12によって調製したビーズの直径は、Biomaterials, 2010 Sep; 31(27):7070-7に記載されているように、動的光散乱(DLS)を使用して決定した。

30

【0113】

実験13（比較）：カップホーンを使用したビーズの調製

PLGA（90mg、resomer 502H）を、3mLのジクロロメタンに溶解した。ペルフルオロ-15-クラウン-5エーテル（890μL）をPLGAの溶液に加えた。3mg/mLの濃度を有するProhanceを含む50mLの水溶液をさらに加えた。この混合物を、ガラス管においてポリ（ビニルアルコール）（20g/L）の溶液に滴下で添加し、その間に、PVA含有フラスコの超音波処理を開始した。全混合物を、60sのオンおよび10sのオフサイクルを伴う、30%の振幅で3分間カップホーンにおいて超音波処理し（BransonからのDigital Sonifier s250）、第2のエマルジョンを得た。超音波処理の間に、冷却水の温度は、冷却循環器によって4℃にて維持した。

40

【0114】

超音波処理の後、ジクロロメタンを撹拌しながら4℃にて一晩蒸発させ、ビーズの凝固を達成した。ビーズを2mLの遠心分離管において30分間の21000gでの遠心分離によって単離し、25gの水に再懸濁した。ペレットを水で2回洗浄し、次いで、水に再懸濁させ、-80℃にて凍結し、凍結乾燥した。このように得られた生成物は、50mgの収量を伴って白色の粉末であった。

50

【 0 1 1 5 】

本発明による実施例（実験 5、6、9）は、実験 13 と比較して非常により高い収量をもたらした。

【 0 1 1 6 】

実験 14（比較）；他の界面活性剤の使用（PVA なし）

PVA が本発明の粒子の形成に必要であるかどうかを研究するために、本発明者らは、ペルフルオロカーボンを含さない空の PLGA 粒子の生成のために、一般に使用される他の界面活性剤による生成を試験した（表 4）。しかし、全てのこれらの界面活性剤によって、本発明者らは、ナノ粒子のサイズおよび多分散性において強い増加を観察した。特に、0.5 より全てより高い PDI 値は、試料の非常に広範なサイズ分布を示す。さらに、PFCE のカプセル化は、有意により低いか、またはそれどころか NMR で測定可能でなかった。要約すれば、ナノ粒子の合成は、他の界面活性剤では可能でなかった。したがって、本発明者らは、PVA が、ナノ粒子の安定化のために、および PFCE のカプセル化のために必要不可欠であると結論付ける。

10

【 0 1 1 7 】

【表 4】

表 4. 異なる界面活性剤を有するナノ粒子の生成

界面活性剤	R_n / nm	PDI	PFCE 含量 / 重量%
Tween 20	215	0.81	n/a
コール酸ナトリウム	390	0.85	6
ポリ（ビニルピロリドン）	450	0.77	3
Pluronic F68	315	0.45	n/a

20

【 0 1 1 8 】

試験方法

PFCE の定量化

PFCE 含量は、溶媒として D₂O（sigma-aldrich）および内部参照としてトリフルオロ酢酸を使用して、Bruker Avance III 400 MHz 分光計において ¹⁹F NMR で測定した。緩和遅延 D1 は、20 s に設定した。データ評価は、Mestrelab からの Mestrenova 10.0 で行った。

30

【 0 1 1 9 】

2D 異核オーバーハウザー増進分光法

PFCE - 粒子の HOESY を、緩和遅延 D1 = 2.0 s およびクロス緩和遅延 D8 = 0.25 s、471 MHz (¹⁹F)、500 MHz (¹H) を伴う、Bruker DMX 500 MHz NMR 分光計で溶媒として D₂O 中で測定した。PFCE を装填したコア-シェルカプセルの HOESY は、D1 = 2.0 s および D8 = 0.15 s、377 MHz (¹⁹F)、400 MHz (¹H) を伴う、Bruker Avance III 400 MHz 分光計で行った。データ評価は、Mestrelab からの Mestrenova 10.0 で行った。

40

【 0 1 2 0 】

PVA の定量化

PVA の濃度は、溶媒として D₂O を伴う Bruker Avance III 400 MHz 分光計において、内部参照としてレソルシノールを使用して ¹H NMR で測定した。緩和遅延 D1 = 30 s。データ評価は、Mestrelab からの Mestrenova 10.0 で行った。

【 0 1 2 1 】

固体 NMR

固体 NMR は、10 kHz MAS での Varian VNMRs 850 MHz 分光計で測定した。乾燥状態の粒子を測定するために、本発明者らは、本特許において記載さ

50

れている方法によって得た凍結乾燥したナノ粒子粉末を使用した。水で膨潤したナノ粒子を得るために、凍結乾燥した粉末を過剰な水と共に5分間インキュベートし、次いで、hettich micro 200 R遠心機を使用して15000rpmで遠心した。次いで、固体NMR測定のために、遠心分離からのペレットをローター中に直ちに充填した。データ評価は、MatNMRで行った。

【0122】

示差走査熱量測定(DSC)

DSCは、測定およびデータ分析のためのSTAREソフトウェア11.0を使用して、加熱速度2K/分で窒素雰囲気下にて、FRS5センサー、Julabo FT900浸漬クーラー、TSO 801RO Sample Robotを備えたMettler Toledo DSC 822e熱量計で測定した。

10

【0123】

熱重量分析(TGA)

TGAは、20K/分の加熱速度を伴う、Mettler Toledo TGA/SDTA 851e機器で窒素雰囲気下にて測定した。

【0124】

動的光散乱(DLS)

DLSは、0.1mg/mLの試料濃度で脱イオン水中、Malvern instrumentsからのzetasisizer ZS nanoにおいて行った。

20

【0125】

X線小角散乱(SAXS)

SAXS測定は、GeniX-Cu超低発散源($\lambda = 1.54$ 、 1×10^8 ph/sの流速)、Pilatus 300Kシリコンピクセル検出器(487×619 ピクセルの $172 \times 172 \mu\text{m}^2$)、Linkam温度調節器($-80 \sim 250$)、Julabo温度調節器($-5 \sim 80$)、q範囲 $0.003 \sim 3 \text{ }^{-1}$ を備えたGanesha X線機器で行った。

【0126】

X線回折(XRD)

ディフラクトグラムは、CuK α 放射線を使用して、高精度焦点シールド管、およびPIXcel 3D検出器を伴う、反射モードでのPanalytical Empyrean上で測定した。スキャン範囲は、 0.013 度のステップサイズを伴う $2 \sim 50$ 度の 2θ シートであった。

30

【0127】

特徴づけ

本発明の方法によって得たビーズを、様々な方法によって特徴づけした。

【0128】

国際公開第2014/041150号からの実験である実験13において調製した粒子は、PLGA、PFC EおよびGd-キレートからなる。これらの粒子と対照的に、新規なビーズ(実験1~6を参照されたい)は、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)を含有し、これは安定的および単分散の粒子の形成を促進する乳化プロセスの間に安定剤として使用した。

40

【0129】

このように、本発明による方法は、国際公開第2014/041150号による方法と異なる組成を有する粒子をもたらす。粒子組成のこの変化は、 ^1H NMR測定によって示すことができる。図1は、古い特許からの粒子、および内部参照としてレソルシノールを有する新規な粒子の定量的 ^1H NMRスペクトルを示す。粒子形成の後のPLGA鎖の移動度の低減によって、PLGAは、NMRによって検出することができず、レソルシノールおよびPVAのシグナルのみは、両方のスペクトル上で可視である。

【0130】

国際公開第2014/041150号の方法(左)および新規な方法(右)によって生

50

成される粒子の ^1H NMRスペクトルを測定した(図1を参照されたい)。内部参照としてレソルシノール(4.1 mg); 400 MHz、 D_2O 、緩和減衰 = 20 sを伴って、スペクトルを測定した。右のスペクトルにおける差し込み図: PVAの化学構造、加水分解されていないOH基は単純化のために示さない。

【0131】

4.06 ppmでのピークは、図1の右の差し込み図に示されるように、モノマー繰り返し単位のH-COH基のプロトンに相当する。7.18でのレソルシノールの三重項シグナルの積分、4.06 ppmでのPVAピークの積分、およびPVAの平均分子量9500 g/mol(メーカーによる分子量9000~10000 g/mol)は、計算することができ、下記のPVA含量がもたらされる。

- ・国際公開第2014/041150号の方法からの粒子: 7重量%
- ・新規な方法からの粒子: 23重量%

【0132】

説明において示される固体NMR測定および2D溶液NMRは、PFCEが水と相互作用することを示した。PVAは親水性ポリマーである一方、PLGAは水に可溶性ではない疎水性ポリマーであるため、新規な粒子中に存在するPVAは、PFCEおよび水の間のこの相互作用を促進し、独特の構造をもたらしたことを本発明者らは想定する。PFCEは、水とは通常混合しない超疎水性化合物である。このように、文献においてこれまで報告された粒子またはエマルジョンは典型的には、コア-シェル構造を有する。

【0133】

実験15(比較)

本発明者らの粒子の独特の構造を立証するために、本発明者らは、さらなる対照としてコア-シェルカプセルを調製した。これらのコア-シェルカプセルを作製するために、本発明者らは、Pisaniらによって従前に記載された、界面活性剤としてコール酸ナトリウムを有するPFOBを装填したカプセルの合成のための手順を使用した(Adv. Funct. Mater. 2008, 18, 2963-2971)。この手順において、本発明者らは、PFOBを0.9 mLのPFCEと置き換え、PFCEカプセルを作製したが、次いで、これを本発明者らのPFCEビーズと直接比較することができる。

【0134】

PLGA(100 mg、resomer 502 H)を3 mLのジクロロメタンに溶解し、ガラス製ピペットで上下することによってペルフルオロ-15-クラウン-5エーテル(900 μL)またはペルフルオロオクチルプロミド(PFOB、275 μL)と混合した。このように得られた一次エマルジョンを、コール酸ナトリウムの1.5重量%溶液に加え、40%の振幅で氷上にて3分間超音波処理した(branson digital sonifier s250)。超音波処理の後、ジクロロメタンを攪拌しながら室温にて一晚蒸発させた。界面活性剤を交換するために、PVA溶液(10 gの1.96重量%)を懸濁液に加え、混合物を4にて5日間攪拌した。エマルジョンを16000 gにて水で2回洗浄し、振盪機上で4にて4 mLの水に再懸濁し、液体 N_2 で凍結し、凍結乾燥した。

【0135】

合成によって、 $R_h = 62 \text{ nm}$ およびPDI 0.09を有する凍結乾燥したカプセルを生じさせた。

【0136】

本発明者らの粒子と対照的に、このナノ-カプセルは、NMRにおいて、PFCE中のF原子、および水の間のHOESYを殆ど示さない(図9)。これらのカプセルのコア-シェル構造によって、水は、超疎水性PFCEコアの中を浸透することができない。したがって、水およびPFCEの間の相互作用は殆ど存在しない。僅かな残留HOESYシグナルは、コアとシェルとの接触域、すなわち、PFCE充填物とPLGAシェルとのインターフェースからもたらされ得る。対照的に、本発明者らの粒子は、PFCE中の水のブ

10

20

30

40

50

ロトンおよびフッ素原子の間の広範な H O E S Y を示す (図 3) 。 親水性 P V A によって安定化される本発明者らの粒子の均一な多ドメイン構造によって、水および P F C E の間の接触域は非常により多く、より強い H O E S Y をもたらす。

【 0 1 3 7 】

所見：

G d は常磁性であるため、H O E S Y は G d 含有粒子では測定することができない。従来技術 (P i s a n i) は、実験をどのように行うかについての必要不可欠な詳細を見逃した。その発明者らは、これらのカプセルを作製するためのその発明者らの超音波処理器を使用し、そのように文献からの正確な超音波処理の設定を使用することができなかった。その発明者らは、カプセルを得るためにこれが重要であるとは考えない。

10

【 0 1 3 8 】

その発明者らが使用した方法は、その発明者らの博士論文の 1 つと組み合わせたそのグループからのいくつかの論文に基づいた。問題は、その発明者らが完成していない方法 (例えば、界面活性剤の容量をスキップすること) をしばしば発表したことであった。

【 0 1 3 9 】

膨潤したカプセルの s s N M R は、濃縮された水溶液中でこれらがそれほど安定的ではないため測定することができなかったが、s s N M R は数時間かかる。

【 図 1 】

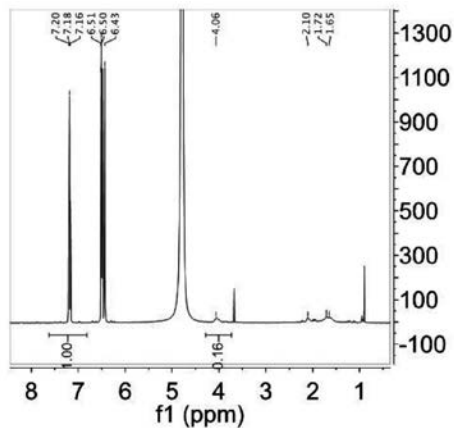


図1

【 図 2 】

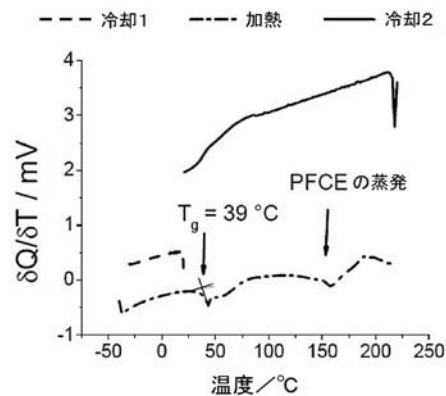


図2

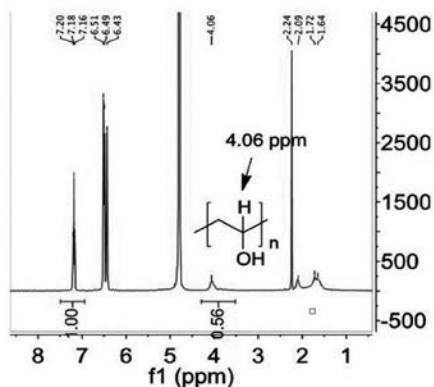


図1(続き)

【図3】

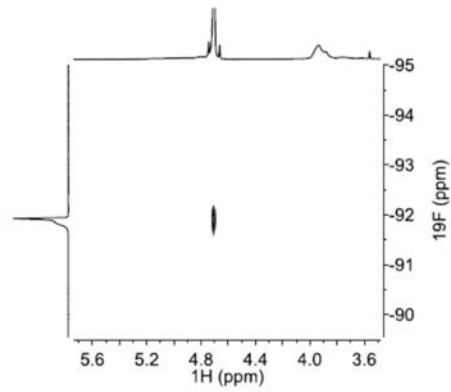


図3

【図4】

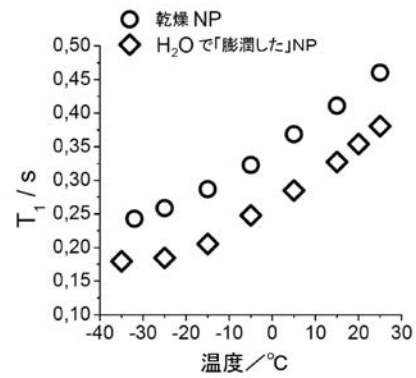


図4

【図5】

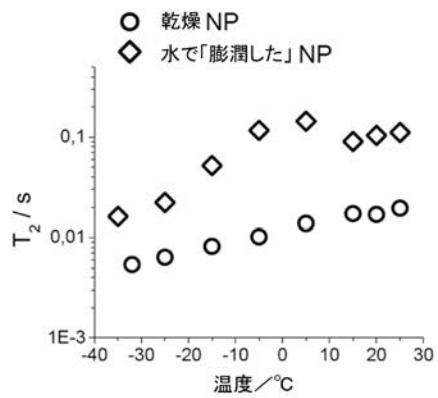


図5

【図6】

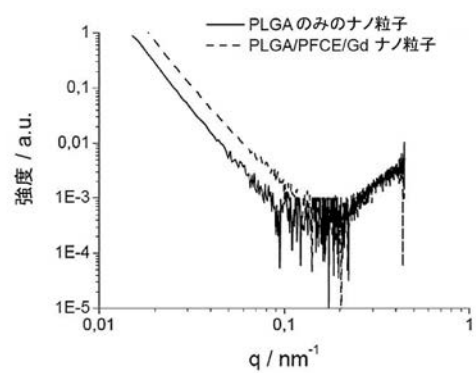


図6

【 図 7 】

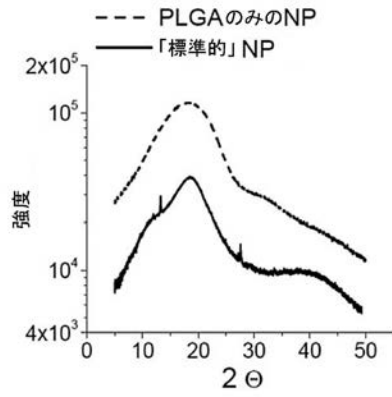


図7

【 図 9 】

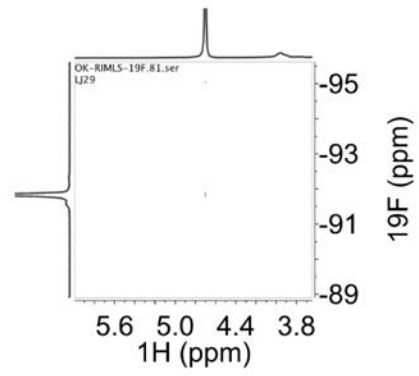


図9

【 図 8 】

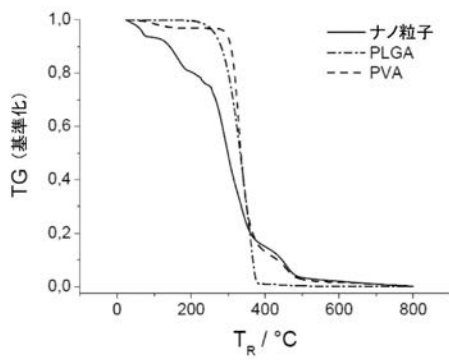


図8

【 図 10 】

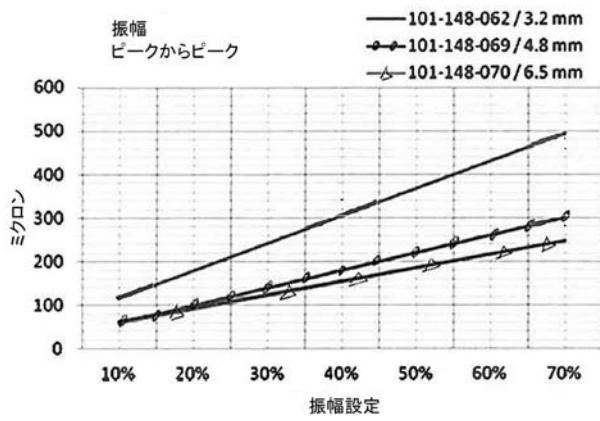


図10

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/055827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K49/00 A61K49/18 A61K49/22 G01N29/04 G01N29/24
G01N24/08

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/041150 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIV [NL]) 20 March 2014 (2014-03-20) cited in the application	12-17
Y	page 5, lines 7-11 page 6, line 26 - page 7, line 11 examples claims figures 1,3 ----- -/--	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2017

Date of mailing of the international search report

30/05/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Villard, Anne-Laure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/055827

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SRINIVAS M ET AL: "Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using ¹⁹F MRI and optical imaging", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 31, no. 27, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 7070-7077, XP027124639, ISSN: 0142-9612 [retrieved on 2010-06-20] cited in the application	12,13, 16,17
Y	abstract page 7071, paragraphs 2.1, 2.5 table 1 -----	1-11
X	DATABASE WPI Week 200982 Thomson Scientific, London, GB; AN 2009-R44826 XP002770335, & CN 101 574 530 A (UNIV FUJIAN MEDICAL AFFILIATED UNION HOS) 11 November 2009 (2009-11-11) cited in the application abstract -----	12,13, 16,17
Y	WO 2009/028825 A2 (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; CHUNG BONG HYUN [KR]; LIM YONG TAIK) 5 March 2009 (2009-03-05) example 1 -----	1-11, 13-15
X,P	KOSHKINA, OLGA ET AL: "Perfluorocarbon-loaded polymeric nanoparticles for cell tracking using multimodal in vivo imaging", ABSTRACTS OF PAPERS, 251ST ACS NATIONAL MEETING & EXPOSITION, SAN DIEGO, CA, UNITED STATES, MARCH 13-17, 2016 , COLL-39 PUBLISHER: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D. C. CODEN: 69TZA3, 2016, XP002761621, the whole document -----	12,16,17
Y,P		1-11, 13-15
X,P	WO 2017/001686 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIV [NL]) 5 January 2017 (2017-01-05) page 4, line 22 examples 6,7,10 -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/055827

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014041150	A1	20-03-2014	CA 2884154 A1 20-03-2014 EP 2708244 A1 19-03-2014 EP 2895201 A1 22-07-2015 JP 2015534549 A 03-12-2015 US 2015250905 A1 10-09-2015 WO 2014041150 A1 20-03-2014
CN 101574530	A	11-11-2009	NONE
WO 2009028825	A2	05-03-2009	KR 100845010 B1 08-07-2008 US 2011212032 A1 01-09-2011 WO 2009028825 A2 05-03-2009
WO 2017001686	A1	05-01-2017	NONE

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 K 47/08 (2006.01)	A 6 1 K 47/08	
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
G 0 1 N 24/08 (2006.01)	G 0 1 N 24/08	5 1 0 S
G 0 1 N 24/00 (2006.01)	G 0 1 N 24/08	5 1 0 L
G 0 1 N 21/65 (2006.01)	G 0 1 N 24/00	1 0 0 B
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 24/00	1 0 0 Y
A 6 1 B 8/14 (2006.01)	G 0 1 N 21/65	
A 6 1 B 8/13 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	Z
	A 6 1 B 8/14	
	A 6 1 B 8/13	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72) 発明者 フィグドル カルル グスタフ
オランダ 6 5 2 5 エーゼット ネイメーヘン ヘールト フローテブレイン 9

(72) 発明者 デ フリース イングリッド ヨランダ モニク
オランダ 6 5 2 5 エーゼット ネイメーヘン ヘールト フローテブレイン 9

F ターム (参考) 2G043 BA16 EA01 EA03 FA01
4C076 AA17 AA22 AA31 DD09F DD21 DD35 DD39 EE06F EE16F EE24A
FF02 FF12 FF16 FF43 FF68 GG06 GG08 GG50
4C085 HH01 HH03 HH07 HH09 HH11 JJ03 JJ20 KA27 KA28 KB12
KB39 KB68 KB75 LL01
4C601 DE07 DE16 EE03

【要約の続き】

フロー型超音波処理器によって少なくとも 120 μm の振幅で 0.01 ~ 10 分間、液体混合物中へと直接行われ、生体適合性疎水性ポリマーに対する生体適合性界面活性剤の重量比は、少なくとも 3 : 1 である。本発明はさらに、イメージング目的に適した密接な F - H₂O 相互作用を有するビーズに関する。

专利名称(译)	制备用于成像的珠子方法		
公开(公告)号	JP2019510759A	公开(公告)日	2019-04-18
申请号	JP2018547899	申请日	2017-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	天主教大学基金会		
申请(专利权)人(译)	斯蒂廷Katorike统一威赛指定		
发明人	スリニヴァス マンガラ コシキナ オルガ フィグドル カルル グスタフ デ フリース イングリッド ヨランダ モニク		
IPC分类号	A61K49/00 A61K49/12 A61K49/06 A61K49/22 A61K9/16 A61K47/34 A61K47/06 A61K47/08 A61K47/32 A61K47/02 G01N24/08 G01N24/00 G01N21/65 G01N21/64 A61B8/14 A61B8/13		
CPC分类号	C08J3/205 A61K49/0002 A61K49/108 A61K49/12 A61K49/1818 A61K49/223 C08J3/093 C08J3/095 C08J2329/04 C08J2467/04 C08K3/08 C08K5/02 G01N29/2418 G01N2291/02475 G01R33/281		
FI分类号	A61K49/00 A61K49/12 A61K49/06 A61K49/22 A61K9/16 A61K47/34 A61K47/06 A61K47/08 A61K47/32 A61K47/02 G01N24/08.510.S G01N24/08.510.L G01N24/00.100.B G01N24/00.100.Y G01N21/65 G01N21/64.Z A61B8/14 A61B8/13		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/EA03 2G043/FA01 4C076/AA17 4C076/AA22 4C076/AA31 4C076/DD09F 4C076/DD21 4C076/DD35 4C076/DD39 4C076/EE06F 4C076/EE16F 4C076/EE24A 4C076/FF02 4C076/FF12 4C076/FF16 4C076/FF43 4C076/FF68 4C076/GG06 4C076/GG08 4C076/GG50 4C085/HH01 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH09 4C085/HH11 4C085/JJ03 4C085/JJ20 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KB12 4C085/KB39 4C085/KB68 4C085/KB75 4C085/LL01 4C601/DE07 4C601/DE16 4C601/EE03		
优先权	2016159884 2016-03-11 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括以下步骤：a) 将全氟化碳和任选的金属化合物添加到生物相容性疏水聚合物在极性溶剂中的溶液中以提供第一液体混合物，b) 将第一液体混合物添加到聚乙烯醇中。在超声处理下添加到含有醇的生物相容性表面活性剂的水溶液中以获得第二液体混合物，c) 在冷却的同时保持第二液体混合物的超声处理，d) 第二种 从2的液体混合物中蒸发极性溶剂以获得含有生物相容性疏水性聚合物，全氟化碳和任选的金属化合物的珠粒悬浮液，e) 从悬浮液中分离珠粒并生物相容性疏水聚合物，全氟化碳，聚乙烯醇，包括制备水性悬浮液的步骤，以及f) 冻干水性悬浮液以获得珠粒的步骤。并且可选地，一种用于制备包含金属化合物的珠的方法，在最多10秒的时间内进行步骤b) 中将第一液体混合物添加到生物相容性表面活性剂中，b) 中的超声处理和步骤c) 中的超声处理直接在液体混合物中进行，例如通过探头或流动超声仪，振幅至少为120μm，持续0.01-10分钟，并且是生物相容的疏水性。生物相容性表面活性剂与亲水性聚合物的重量比至少为3：1。本发明进一步涉及具有适合于成像目的的紧密的F-H 2 O相互作用的珠。

