

(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2005-516033

(P2005-516033A)

(43) 公表日 平成17年6月2日(2005.6.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00	2 G 0 8 8
A 6 1 B 5/055	A 6 1 B 8/00	4 C 0 7 6
A 6 1 B 8/00	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 41/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 41/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-561539 (P2003-561539)	(71) 出願人	503156965 イマークス セラピューティクス、インコーポレイテッド アメリカ合衆国、アリゾナ、トゥーサン、イースト エイティーンズ ストリート 1 6 3 5
(86) (22) 出願日	平成15年1月23日 (2003. 1. 23)	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月22日 (2004. 9. 22)	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/002024	(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
(87) 国際公開番号	W02003/061593	(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫
(87) 国際公開日	平成15年7月31日 (2003. 7. 31)		
(31) 優先権主張番号	10/055, 772		
(32) 優先日	平成14年1月23日 (2002. 1. 23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断および治療で使用する新規な標的組成物

(57) 【要約】

診断および治療用途に用いることができる新規な標的組成物。この組成物は、超音波のような診断画像化、並びに治療用超音波のような治療用途と共同で用いることができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

血管斑を有する患者の内部領域の画像を提供する方法であって、(i) 水性キャリアー中に脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットイングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲットイングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、その部位の可視画像を得ることを含む、上記方法。

## 【請求項2】

上記コントラスト剤が脂質小胞を含んでなる、請求項1に記載の方法。

10

## 【請求項3】

上記脂質がリン脂質を含んでなる、請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

上記リン脂質がホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンからなる群から選択される、請求項3に記載の方法。

## 【請求項5】

上記ホスファチジルコリンがジオレオイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンからなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

## 【請求項6】

上記ホスファチジルコリンがジパルミトイルホスファチジルコリンを含んでなる、請求項5に記載の方法。

20

## 【請求項7】

上記ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミンからなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

## 【請求項8】

上記ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含んでなる、請求項7に記載の方法。

30

## 【請求項9】

上記脂質が更にポリマーを含んでなる、請求項2に記載の方法。

## 【請求項10】

上記ポリマーが親水性ポリマーを含んでなる、請求項9に記載の方法。

## 【請求項11】

上記ポリマーがポリエチレングリコールを含んでなる、請求項10に記載の方法。

## 【請求項12】

上記小胞がタンパク質小胞を含んでなる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項13】

上記タンパク質がアルブミンを含んでなる、請求項12に記載の方法。

40

## 【請求項14】

上記ガスまたはガス状前駆体がフッ素化合物を含んでなる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項15】

上記フッ素化合物がペルフルオロカーボン化合物である、請求項14に記載の方法。

## 【請求項16】

上記ペルフルオロカーボンがペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロオクタン、ペルフルオロノナン、ペルフルオロデカン、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロウンデカン、ペルフルオロドデカン、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

50

- 【請求項17】  
上記ペルフルオロカーボンがペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。
- 【請求項18】  
上記ペルフルオロカーボンがペルフルオロブタンである、請求項17に記載の方法。
- 【請求項19】  
上記ターゲットングリガンドが上記酸残基を含む脂質を含んでなる、請求項1に記載の方法。
- 【請求項20】 10  
上記ターゲットングリガンドが酸性リン脂質を含んでなる、請求項19に記載の方法。
- 【請求項21】  
上記ターゲットングリガンドがジアシルリン脂質である、請求項20に記載の方法。
- 【請求項22】  
上記ターゲットングリガンドがホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびホスファチジリノシトールからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。
- 【請求項23】  
上記ターゲットングリガンドが、ジパルミトイルホスファチジン酸であるホスファチジン酸である、請求項22に記載の方法。
- 【請求項24】 20  
上記ターゲットングリガンドが、ジパルミトイルホスファチジルセリンであるホスファチジルセリンである、請求項22に記載の方法。
- 【請求項25】  
上記コントラスト剤が更に低粘度油を含んでなる、請求項1に記載の方法。
- 【請求項26】  
上記油が、シリコン油、タラ肝油、トリアセチン、鉱油、植物油、フッ素化トリグリセリド、生体適合性飽和脂肪酸、生体適合性不飽和脂肪酸、生体適合性部分水素化脂肪酸、シリコンを基剤とする油を含んでなる油、および合成油からなる群から選択される、請求項25に記載の方法。
- 【請求項27】 30  
上記小胞がミセルおよびリポソームからなる群から選択される、請求項2に記載の方法。
- 【請求項28】  
上記脂質小胞がユニラメラ脂質小胞、オリゴラメラ脂質小胞およびマルチラメラ脂質小胞からなる群から選択される、請求項27に記載の方法。
- 【請求項29】  
上記脂質が単分子層または二分子層の形態である、請求項28に記載の方法。
- 【請求項30】 40  
患者の血管斑の存在の診断方法であって、(i) 患者に水性キャリアー中に脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲットングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、患者の任意の斑の可視画像を得ることを含む、上記方法。
- 【請求項31】  
上記コントラスト剤が脂質小胞を含んでなる、請求項30に記載の方法。
- 【請求項32】  
上記脂質がリン脂質を含んでなる、請求項31に記載の方法。
- 【請求項33】 50  
上記リン脂質がホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンからなる

群から選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

上記ホスファチジルコリンがジオレオイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

上記ホスファチジルコリンがジパルミトイルホスファチジルコリンを含んでなる、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

上記ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよび1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミンからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

10

【請求項37】

上記ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含んでなる、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

上記脂質が更にポリマーを含んでなる、請求項31に記載の方法。

【請求項39】

上記ポリマーが親水性ポリマーを含んでなる、請求項38に記載の方法。

20

【請求項40】

上記ポリマーがポリエチレングリコールを含んでなる、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

上記小胞がタンパク質小胞を含んでなる、請求項30に記載の方法。

【請求項42】

上記タンパク質がアルブミンを含んでなる、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

上記ガスまたはガス状前駆体がフッ素化合物である、請求項30に記載の方法。

【請求項44】

上記フッ素化合物がペルフルオロカーボン化合物である、請求項43に記載の方法。

30

【請求項45】

上記ペルフルオロカーボン化合物が1-約12個の炭素を含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

上記ペルフルオロカーボン化合物が約3-約6個の炭素を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

上記ペルフルオロカーボン化合物が約4個の炭素を含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

上記ターゲティングリガンドが上記酸残基を含む脂質を含んでなる、請求項30に記載の方法。

【請求項49】

上記ターゲティングリガンドが酸性リン脂質を含んでなる、請求項48に記載の方法。

40

【請求項50】

上記ターゲティングリガンドがジアシルリン脂質である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

上記ターゲティングリガンドがホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルイノシトールからなる群から選択される、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

上記ターゲティングリガンドがジパルミトイルホスファチジン酸であるホスファチジン酸である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

50

上記ターゲッティングリガンドがジパルミトイルホスファチジルセリンであるホスファチジルセリンである、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

上記コントラスト剤が更に低粘度油を含んでなる、請求項30に記載の方法。

【請求項55】

上記油が、シリコン油、タラ肝油、鉱油、トリアセチン、植物油、フッ素化トリグリセリド、生体適合性飽和脂肪酸、生体適合性不飽和脂肪酸、生体適合性部分水素化脂肪酸、シリコンを基剤とする油を含んでなる油、および合成油からなる群から選択される、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

上記小胞がミセルおよびリポソームからなる群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項57】

上記脂質小胞がユニラメラ脂質小胞、オリゴラメラ脂質小胞およびマルチラメラ脂質小胞からなる群から選択される、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

上記脂質が単分子層または二分子層の形態である、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

血管斑を有する患者の部位へ生物活性薬をイン・ビボで治療送達する方法であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなる組成物であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものを生物活性薬と組み合わせて含んでなる処方物の治療上有効量を患者に投与することを含む、上記方法。

【請求項60】

上記生物活性薬が血栓崩壊防止剤、スタチン、抗癌剤、および放射性材料からなる群から選択される、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

更に、超音波エネルギーを患者に加えて上記標的小胞から上記生物活性薬を放出することを含んでなる、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

上記超音波エネルギーが上記小胞を破裂させる、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

更に患者を掃引して診断用画像化を行って標的部位の上記小胞を可視化する段階を含んでなる、請求項59に記載の方法。

【請求項64】

血管中の斑を溶解する方法であって、(i) 脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなる標的小胞組成物であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものを静脈注射によって患者に投与し、(i) 上記患者を掃引し、診断用画像化を行って上記斑を可視化し、(iii) 超音波エネルギーを上記斑に加えることを含む、上記方法。

【請求項65】

上記段階(iii)の超音波エネルギーがパルス状超音波である、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

上記ターゲッティングリガンドが上記酸残基を含む脂質を含んでなる、請求項64に記載の方法。

【請求項67】

上記ターゲッティングリガンドが酸性リン脂質を含んでなる、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

10

20

30

40

50

上記ターゲッティングリガンドがジアシルリン脂質である、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

上記ターゲッティングリガンドがホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルイノシトールからなる群から選択される、請求項67に記載の方法。

【請求項70】

上記ターゲッティングリガンドが、ジパルミトイルホスファチジン酸であるホスファチジン酸である、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

上記ターゲッティングリガンドが、ジパルミトイルホスファチジルセリンであるホスファチジルセリンである、請求項69に記載の方法。

10

【請求項72】

血管斑を有する患者の内部領域の画像を提供する方法であって、(i) 水性キャリアー中に脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、その部位の可視画像を得ることを含む、上記方法。

【請求項73】

患者における血管斑の存在を診断する方法であって、(i) 水性キャリアー中に脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、患者の斑の可視画像を得ることを含む、上記方法。

20

【請求項74】

血管斑を有する患者の部位へ生物活性薬をイン・ビボで治療送達する方法であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなる組成物であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものを生物活性薬と組み合わせて含んでなる処方物の治療上有効量を患者に投与することを含む、上記方法。

30

【請求項75】

血管斑を有するの患者の内部領域のターゲッティングに用いる組成物であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなる、上記組成物。

【請求項76】

脂質小胞を含んでなる、請求項75に記載の組成物。

【請求項77】

上記脂質がリン脂質を含んでなる、請求項76に記載の組成物。

40

【請求項78】

上記リン脂質がホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンからなる群から選択される、請求項77に記載の組成物。

【請求項79】

上記ホスファチジルコリンがジオレオイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンからなる群から選択される、請求項78に記載の組成物。

【請求項80】

上記ホスファチジルコリンがジパルミトイルホスファチジルコリンを含んでなる、請求項79に記載の組成物。

50

## 【請求項 8 1】

上記ホスファチジルエタノールアミンが、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、および1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミンからなる群から選択される、請求項78に記載の組成物。

## 【請求項 8 2】

上記ホスファチジルエタノールアミンがジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを含んでなる、請求項81に記載の組成物。

## 【請求項 8 3】

上記脂質が更にポリマーを含んでなる、請求項76に記載の組成物。

10

## 【請求項 8 4】

上記ポリマーが親水性ポリマーを含んでなる、請求項83に記載の組成物。

## 【請求項 8 5】

上記ポリマーがポリエチレングリコールを含んでなる、請求項84に記載の組成物。

## 【請求項 8 6】

タンパク質小胞を含んでなる、請求項75に記載の組成物。

## 【請求項 8 7】

上記タンパク質がアルブミンを含んでなる、請求項86に記載の組成物。

## 【請求項 8 8】

上記ガスまたはガス状前駆体がフッ素化合物を含んでなる、請求項75に記載の組成物

20

## 【請求項 8 9】

上記フッ素化合物がペルフルオロカーボン化合物である、請求項88に記載の組成物。

## 【請求項 9 0】

上記ペルフルオロカーボンが、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロオクタン、ペルフルオロノン、ペルフルオロデカン、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロウンデカン、ペルフルオロドデカン、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項89に記載の組成物。

30

## 【請求項 9 1】

上記ペルフルオロカーボンが、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項90に記載の組成物。

## 【請求項 9 2】

上記ペルフルオロカーボンがペルフルオロブタンである、請求項91に記載の組成物。

## 【請求項 9 3】

上記ターゲットングリガンドが、上記酸残基を含む脂質を含んでなる、請求項75に記載の組成物。

## 【請求項 9 4】

上記ターゲットングリガンドが酸性リン脂質を含んでなる、請求項93に記載の組成物

40

## 【請求項 9 5】

上記ターゲットングリガンドがジアシルリン脂質である、請求項94に記載の組成物。

## 【請求項 9 6】

上記ターゲットングリガンドが、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンおよびホスファチジリノシトールからなる群から選択される、請求項94に記載の組成物。

## 【請求項 9 7】

上記ターゲットングリガンドが、ジパルミトイルホスファチジン酸であるホスファチジン酸である、請求項96に記載の組成物。

50

## 【請求項 98】

上記ターゲットングリガン드가、ジパルミトイルホスファチジルセリンであるホスファチジルセリンである、請求項96に記載の組成物。

## 【請求項 99】

更に低粘度油を含んでなる、請求項75に記載の組成物。

## 【請求項 100】

上記油が、シリコーン油、タラ肝油、鉱油、トリアセチン、植物油、フッ素化トリグリセリド、生体適合性飽和脂肪酸、生体適合性不飽和脂肪酸、生体適合性部分水素化脂肪酸、シリコンを基剤とする油を含んでなる油、および合成油からなる群から選択される、請求項99に記載の組成物。

10

## 【請求項 101】

上記小胞がミセルおよびリポソームからなる群から選択される、請求項76に記載の組成物。

## 【請求項 102】

上記脂質小胞がユニラメラ脂質小胞、オリゴラメラ脂質小胞およびマルチラメラ脂質小胞からなる群から選択される、請求項101に記載の組成物。

## 【請求項 103】

上記脂質が単分子層または二分子層の形態である、請求項102に記載の組成物。

## 【請求項 104】

更に生物活性薬を含んでなる、請求項75に記載の組成物。

20

## 【請求項 105】

上記生物活性薬が血栓崩壊防止剤、スタチン、抗癌剤、および放射性材料からなる群から選択される、請求項104に記載の組成物。

## 【請求項 106】

血管斑を有する患者の内部領域のターゲットングに用いる組成物であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲットングリガン드가血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなる、上記組成物。

## 【請求項 107】

血管斑を有する患者の治療または診断に使用する処方物であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲットングリガン드가血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなる組成物を生物活性薬と組み合わせて含んでなる、上記処方物。

30

## 【請求項 108】

上記小胞が脂質小胞を含んでなる、請求項107に記載の処方物。

## 【請求項 109】

上記小胞がミセルおよびリポソームからなる群から選択される、請求項108に記載の処方物。

40

## 【請求項 110】

血管斑を有する患者の治療または診断に使用する処方物であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲットングリガン드가血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなる組成物を生物活性薬と組み合わせて含んでなる、上記処方物。

## 【請求項 111】

血管斑を有する患者の部位のターゲットングに用いる組成物の製造方法であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せることを含み、上記ターゲットングリガン드가血管斑に関

50

連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものである、上記方法。

【請求項 1 1 2】

上記組成物が小胞を含んでなる、請求項111に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

血管斑を有する患者の部位のターゲッティングに用いる組成物の製造方法であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せることを含み、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものである、上記方法。

【請求項 1 1 4】

血管斑を有する患者の治療または診断に用いる処方物の製造方法であって、生物活性薬、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せることを含み、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものである、上記方法。

【請求項 1 1 5】

上記処方物が脂質小胞を含んでなる、請求項114に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

血管斑を有する患者の治療または診断に用いる処方物の製造方法であって、生物活性薬、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せることを含み、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものである、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対するクロス・リファレンス

本出願は、2000年10月3日出願の米国特許出願連続番号第09/699,679号の一部継続出願である2002年1月23日出願の米国特許出願連続番号第10/055,772号の一部継続出願である。本出願はまた、1997年5月6日出願の米国特許出願連続番号第08/851,780号であって、現在米国特許第6,090,800号であるものの分割出願である2000年2月3日出願の米国特許出願連続番号第09/496,761号の一部継続出願である。上記出願のそれぞれの開示内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

【0002】

発明の分野

本発明は、新規標的組成物およびその使用に関する。更に詳細には、本発明は、新規化合物、およびこれらの化合物を含んでなる標的組成物、および診断画像化および/または生物活性薬の投与のためのこれら組成物の使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

様々な画像化技術が、疾患の診断に用いられてきた。これらの画像化技術としては、X線画像化が挙げられる。X線では、生成した画像は患者の身体の構造および組織の様々な密度を反映している。この画像化技術の診断上の有用性を改良するため、コントラスト剤を用いて周囲の組織に対する目的とする組織の密度を増加させることができる。このようなコントラスト剤の例としては、例えば、バリウムおよびヨウ素化合物であって、食道、胃、腸および直腸などの消化器部位のX線研究に用いることができるものが挙げられる。コントラスト剤を用いて、コンピューター断層撮影法(CT)およびコンピューター援用断層撮影法(CAT)の研究を行い、目的とする組織、例えば、消化管の可視化を改良することもできる。

【0004】

10

20

30

40

50

磁気共鳴映像法(MRI)は、X線と異なり、電離放射線を必要としない別の画像化技術である。MRIを用いて、例えば、横断面、前頭面、矢状面、または直交面のような様々なスキャンニング平面で身体の横断面画像を生成することができる。MRIでは、身体の画像を製作するのに、磁場、ラジオ周波数エネルギー、および磁場勾配を用いている。組織間のコントラストまたはシグナル強度差は、主として組織のT1(縦)およびT2(横)緩和値および一般に自由含水率に相当するプロトン密度を反映している。コントラスト媒体を用いて患者の部位におけるシグナル強度を変化させるには、幾つかの可能性のある方法を用いることができる。例えば、コントラスト媒体をデザインしてT1、T2、またはプロトン密度を変化させることができる。

#### 【0005】

一般的に言えば、MRIではコントラスト剤を用いる必要がある。MRIをコントラスト剤を用いずに行うと、生成する画像で目的とする組織を周囲の組織から区別することが困難なことがある。従来は、MRIについては主として常磁性コントラスト剤が注目されてきた。常磁性コントラスト剤は、不対電子を含む材料を必要とする。不対電子は、主磁場内では小型磁石として作用して、縦(T1)および横(T2)緩和の比率を増加させる。常磁性コントラスト剤は典型的には金属イオン、例えば、遷移金属イオンであって、不対電子の供給源を提供するものを含んでなる。しかしながら、これらの金属イオンはまた、一般に毒性が高い。毒性を減少させる努力では、金属イオンは典型的には配位子とキレートを形成する。

#### 【0006】

金属酸化物、特に酸化鉄も、MRIコントラスト剤として用いられてきた。酸化鉄の小さな粒子、例えば、直径が約20nm未満の粒子は所望な常磁性緩和特性を有することができるが、それらの主要な効果は嵩磁化率によるものである。ニトロオキシドは、これもまた常磁性であるもう一つの種類のMRIコントラスト剤である。これらはリラクシビティー(relaxivity)が比較的低く、一般に常磁性イオンより効果が少ない。

#### 【0007】

既成のMRIコントラスト剤は、多くの制限を受けている。例えば、画像ノイズの増加は、キレート化した金属を含むコントラスト剤などある種のコントラスト剤と関連していることがある。このノイズは、一般に固有の蠕動運動、および呼吸または循環作用からの運動によって生じる。更に、コントラスト剤のシグナル強度は、一般にコントラスト剤の濃度並びに用いたパルス配列によって変化する。十分高濃度の常磁性種を用いなければ、コントラスト剤の吸収によって、特に小腸の末端部分の画像の解釈が複雑になる可能性がある。例えば、Kornmesser et al., Magnetic Resonance Imaging, 6: 124 (1988)を参照されたい。

#### 【0008】

他のコントラスト剤はパルス配列の変動に対して感受性が余り高くないことがあり、一層安定なコントラストを提供することがある。しかしながら、フェライトのような粒状体の濃度が高いと、例えば、腸内流体の吸収が起こり且つ超常磁性材料が濃縮されることがある結腸で特に明らかな磁化率人工産物(magnetic磁化率 artifacts)を生じる可能性がある。

#### 【0009】

毒性は、MRI用のコントラスト剤など現在入手可能なコントラスト剤に一般に関連しているもう一つの問題である。例えば、フェライトは、経口投与後に吐き気、並びに膨満感および血清中の鉄の一過性の上昇の症状を引き起こすことが多い。Gd-DTPA中で錯体形成するガドリニウムイオンは、遊離形態で毒性が高い。胃での酸性の増加(低pH)および腸でのアルカリ性の増加(高pH)など消化管の様々な環境は、錯体から遊離イオンのデカップリングおよび分離の可能性を増加することができる。

#### 【0010】

超音波は、例えば、組織微小血管系のような血管系などの身体の様々な領域を検討するためのもう一つの重要な診断画像化法である。超音波には、他の診断法と比較してある種の利点がある。例えば、核薬剤(nuclear medicine)およびX線を伴う診断法では、一般に

10

20

30

40

50

患者をイオン化電子線に暴露する必要がある。このような放射線は、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)およびタンパク質などの亜細胞性材料まで損傷を引き起こす可能性がある。超音波は、このような潜在的に有害な放射線を伴わない。更に、超音波は、CTおよびMRIのような精巧で高価な装置を必要とする他の診断法に比べて比較的廉価である。

#### 【0011】

超音波では、患者を音波に暴露することを伴っている。一般に、音波は体組織によって吸収されるために消散し、組織中を透過し、組織から反射する。一般に後方散乱または反射能と呼ばれる音波の組織からの反射は、超音波画像を開発するための基礎を形成する。これに関連して、音波は異なる体組織から差別的に反射する。この差別的反射は、観察を行う特定の組織の成分および密度などの様々な因子によるものである。超音波は、一般に1メガヘルツ(MHZ)-10MHZの周波数の音波を検出することができる変換器で差別的に反射した波を検出することを包含する。検出した波を積分して画像として、これを定量し、定量した波は、検討を行っている組織の画像に転換することができる。

10

#### 【0012】

上記の診断技術と同様に、超音波は一般にコントラスト剤の使用も含む。典型的なコントラスト剤としては、例えば、固体粒子の懸濁液、乳化した液滴、およびガスを満たした気泡が挙げられる。例えば、Hilmann et al., 米国特許第4,466,442号明細書、および公表国際特許出願W0 92/17212号明細書およびW0 92/21382号明細書を参照されたい。Widder et al.の公表出願第EP-A-0 324 938号明細書には、熱変性可能な生体適合性タンパク質、例えば、アルブミン、ヘモグロビン、およびコラーゲンから生成した安定化した微小気泡型の超音波画像化剤が開示されている。

20

#### 【0013】

超音波から生成した画像の品質は、かなり向上した。しかしながら、特に血管血液供給を灌流している組織の血管系を含む画像に関して、更に改良が求められている。従って、血管系および血管関連臓器の医学的に有用な画像を提供することができる改良されたコントラスト剤を含む改良された超音波技術が求められている。

#### 【0014】

液-気界面からの音の反射が、極めて効率的である。従って、ガスを満たした気泡などの気泡は、コントラスト剤として有用である。本明細書で用いられる「気泡」という用語は、一般にガスまたはその前駆体を満たした内部空隙の周囲の1以上の膜または壁の存在を特徴とする小液胞を表す。典型的な気泡としては、例えば、リボソーム、ミセルなどが挙げられる。以後において一層詳細に記載されるように、気泡のコントラスト剤としての有効性は、例えば、気泡の大きさおよび/または弾性などの様々な因子によって変化する。

30

#### 【0015】

気泡の大きさの効果に関しては、下記の記載が提供される。当業者に知られているように、気泡から反射するシグナルは気泡の半径の関数( $r^6$ )である(Rayleigh Scatterer)。従って、診断用超音波の周波数範囲では、直径が4マイクロメートル( $\mu\text{m}$ )の気泡は、直径が2 $\mu\text{m}$ の気泡の約64倍の散乱能を有する。従って、概していえば、気泡が大きければ大きいほど、反射シグナルは大きくなる。

40

#### 【0016】

しかしながら、気泡の大きさは、気泡が通過しなければならない毛細血管の直径によって制限されている。一般に、直径が10 $\mu\text{m}$ を上回る気泡を含んでなるコントラスト剤は、微細血管が閉塞することがあるので危険性がある。従って、コントラスト剤中の気泡の約99%を上回る量の直径が10 $\mu\text{m}$ 未満であることが望ましい。平均気泡直径も重要であり、1 $\mu\text{m}$ より大きいものであるべきであり、2 $\mu\text{m}$ より大きいのが好ましい。気泡の直径加重平均直径は、約7-10 $\mu\text{m}$ であるべきである。

#### 【0017】

気泡の弾性も重要である。これは、高弾性気泡が必要に応じて変形し、毛細血管中を「押し分けて通り」および/または気泡の周囲を血液が流れることができるからである。こ

50

れは、閉塞の可能性を減少させる。気泡を含んでなるコントラスト剤の有効性は、気泡濃度によっても変化する。一般に、気泡濃度が高ければ、コントラスト剤の反射率は大きくなる。

#### 【0018】

コントラスト剤としての気泡の有効性に関するもう一つの重要な特徴は、気泡安定性である。特にガスを満たした気泡に関して本明細書で用いられる「気泡安定性」とは、大気圧を上回る圧力に暴露した後に気泡がそこに取り込まれているガスを保持する能力を表す。コントラスト剤として有効であるには、気泡は一般に300ミリメートル(mm)水銀(Hg)に約1分間暴露した後に50%を上回る取り込まれているガスを保持することが求められる。特に有効な気泡は、300mm Hgの圧力に1分間暴露した後に取り込まれているガスの75%を保持しており、取り込まれているガス含量が90%であれば特に有効なコントラスト剤が得られる。圧力を放出した後に、気泡が元の大きさに戻ることも極めて望ましい。これは、一般に「気泡レジリエンス」と呼ばれている。

10

#### 【0019】

所望な安定性を欠いている気泡からは、品質の劣ったコントラスト剤が得られる。例えば、気泡が取り込まれているガスをイン・ピボで放出すると、反射率は減少する。同様に、レジリエンスが劣る気泡の大きさはイン・ピボで減少し、これもまた反射率が減少する。

#### 【0020】

従来技術で開示されている気泡の安定性は、一般的にはコントラスト剤としての使用に不相当である。例えば、従来技術には、ガスを満たしたりポソームであって、脂質含有壁または膜を含んでなるものなどの気泡が開示されている。例えば、Ryan et al., 米国特許第4,900,540号明細書および第4,544,545号明細書、Tickner et al., 米国特許第4,276,885号明細書、Klaveness et al., W093/13809号明細書、およびSchneider et al., EP0 0554 213号明細書およびW0 91/15244号明細書を参照されたい。Lanza et al., W093/20802号明細書には、音波反射性のオリゴラメラリポソームが開示されており、これはマルチラメラリポソームであって二分子層間の水性空間が増加しており、または非同心的に二分子層内に納められたリポソームを有し、従って内部で分離された二分子層を含んでいる。超音波画像化の画質を高めるための超音波コントラスト剤としてのおよびリポソームを投与された患者で運ばれる薬剤の観測におけるそれらの使用も記載されている。D'Arrigo,

20

30

#### 【0021】

従来技術で開示されている気泡の多くは、望ましくないことには安定が劣っている。従って、従来技術による気泡はイン・ピボで破壊されやすく、例えば、そこに含まれている任意の治療および/または診断薬を早期に放出してしまう。気泡安定性を向上させる試みにおいて、様々な研究が行われてきた。このような研究としては、例えば、膜または壁がアルブミンのようなタンパク質を含んでなる気泡、または架橋によって明らかに強化されている材料の調製が挙げられる。例えば、Klaveness et al., W0 92/17212号明細書であって、生物分解性架橋剤で架橋されたタンパク質を含んでなる気泡が開示されているものを参照されたい。Moseley et al.は、the Society for Magnetic Resonance in Medicineの1991 Napa, California大会において発表を行い、この発表内容は「微小気泡：新規なMR感受性コントラスト剤」と題した抄録にまとめられている。Moseley et al.が報告した微小気泡は、ヒトアルブミンの殻でコーティングされた空気を含んでなる。あるいは、気泡膜は、タンパク質ではないが生体適合性化合物で架橋されている化合物を含んでなることができる。例えば、Klaveness et al., W0 92/17436号明細書、W0 93/17718号明細書、およびW0 92/21382号明細書を参照されたい。

40

#### 【0022】

外膜でのタンパク質の使用または膜成分の架橋などの気泡安定化の従来技術には、様々な欠点がある。例えば、上記の架橋は、一般に架橋したタンパク質または他の化合物など

50

その代謝経路が不明な新規材料の使用を伴う。更に、架橋では、架橋した化合物の単離および精製など追加の化学処理段階が必要である。アルブミンのようなタンパク質の気泡膜の使用、および気泡膜成分の架橋は気泡の壁をこわくする可能性がある。これにより、気泡の弾性が減少し、従って、変形し且つ毛細血管を通過する能力が減少する。従って、タンパク質および/または架橋を含む従来技術のコントラスト剤では、血管の閉塞の可能性が増加する。

【0023】

血管斑は、心臓発作、卒中および他の血管疾患の原因となる血管封鎖の一次指標である。斑は、工業化世界での疾患の唯一の極めて重要な原因である可能性がある。斑の分子的特性決定の研究は、血管疾患の治療のための治療方法の開発に焦点を当てて継続されている。

10

【0024】

マクロファージについて表されるいわゆる「スカベンジャー受容体」は、リポタンパク質、特にLDLを吸収する。食菌リポタンパク質を含むマクロファージは、アテローム性動脈硬化症の病変に関連した泡沫細胞に類似しており且つこれと緊密に関連している。文献における既知スカベンジャー受容体の中、少なくとも1個のSR-PSOXはホスホセリンまたは緊密に関連した類似体から構成される配位子に親和性を有する。マクロファージによる酸化された低密度リポタンパク質(Ox-LDL)の受容体依存性エンドサイトーシスおよび続いて起きる動脈内皮での泡沫細胞トランスフォーメーションが、アテローム性動脈硬化症の初期段階の特徴である。(SR-PSOX)と呼ばれるOx-LDLのマクロファージ細胞表面受容体であ

20

【0025】

ホスホセリンおよびホスファチジルセリンのリポソームおよび微小気泡への組込みは、文献に記載されている。例えば、Lindner, et al., (Circulation (2000) 102: 2745-2750)によれば、ホスファチジルセリンの微小気泡の殻への組込みにより、補体活性化の増幅による細静脈中の白血球への結合が増加し、これにより炎症を超音波画像化することができる。

【0026】

斑はまた脂質を含んでおり、病変に対する身体の細胞性エンドサイトーシス反応としてのマクロファージを速やかに蓄積する。従って、斑と生体適合性であり且つマクロファージによってエンドサイトーシスされるようにデザインすることができるターゲティングした治療薬は、斑に対する治療薬、例えば、抗血栓症薬および血餅溶解薬を好都合に提供し、斑の機械的破壊のためのターゲットを提供することもできる。

30

【0027】

他の様々な受容体はアテローム性動脈硬化症斑の表面と関連付けられており、診断または治療目的のターゲティングを容易に行いやすい。血小板活性化増殖因子受容体(PAF-R)および血小板由来の増殖因子(PDGF)受容体発現は、サイトカインおよびリポタンパク質濃度によって調節される。狭窄の症状は、斑での後者の発現と関連させられている。エラスチン-ラミニン受容体、アンギオテンシンIIおよび  $\alpha_v\beta_3$  または  $\alpha_v\beta_5$  も、アテローム性動脈硬化症と関連させられている。

40

【0028】

単球およびマクロファージホーミング反応は、開発されてきた斑形成のもう一つの側面である。これに関して、フィブロネクチンをコーティングしたリポソームは、コーティングを行っていないリポソームより容易に斑関連マクロファージによって食菌されること示されている。エンドセリン-A受容体拮抗薬は単球およびマクロファージホーミングを妨げ、エンドセリンの斑ターゲティングリガンドとしての役割を示唆している。

【0029】

血管斑を成熟させる事象の進行を妨げるのに有効な生物活性薬、特にHMGCοAレダクター

50

ぜ阻害薬であるスタチンは、LDLのコレステロール含量を減少させ且つ動脈壁内皮の特徴を変更する作用を行うことが示されている。従って、スタチンの血管斑の部位への輸送は、治療上極めて重要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0030】

従って、新規および/または一層良好な安定化したコントラスト剤およびこれを含む方法、および生物活性薬を目的とする特異的領域に送るための新規および/または改良法が求められている。本発明は、これら並びに他の重要な目的に関するものである。

【課題を解決するための手段】

【0031】

発明の概要

本発明は、一部には、改良コントラスト剤、および生物活性薬の輸送を増加するための方法に関する。具体的には、一態様では、血管斑を有する患者の内部領域の画像を提供する方法であって、(i) 水性キャリアー中に脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、その部位の可視画像を得ることを含む、上記方法が提示される。

【0032】

本発明のもう一つの態様は、患者における血管斑の存在を診断する方法であって、(i) 水性キャリアー中に脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、患者の斑の可視画像を得ることを含む、上記方法に関する。

【0033】

本発明の更にもう一つの態様は、血管斑を有する患者の部位へ生物活性薬をイン・ピボで治療送達する方法であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなる組成物であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものを生物活性薬と組み合わせ含んでなる処方物の治療上有効量を患者に投与することを含む、上記方法に関する。

【0034】

本発明の更にもう一つの態様は、血管中の斑を溶解する方法であって、(i) 脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなる標的小胞組成物であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなるものを静脈注射によって患者に投与し、(ii) 上記患者を掃引し、診断用画像化を行って上記斑を可視化し、(iii) 超音波エネルギーを上記斑に加えることを含む、上記方法に関する。

【0035】

本発明のもう一つの態様は、血管斑を有する患者の内部領域の画像を提供する方法であって、(i) 水性キャリアー中に脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、その部位の可視画像を得ることを含む、上記方法に関する。

【0036】

本発明の更にもう一つの態様は、患者における血管斑の存在を診断する方法であって、

10

20

30

40

50

(i) 水性キャリアー中に脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなるコントラスト剤であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものを患者に投与し、(ii) 患者を超音波を用いて掃引して、患者の斑の可視画像を得ることを含む、上記方法に関する。

【0037】

本発明の更にもう一つの態様は、血管斑を有する患者の部位へ生物活性薬をイン・ビボで治療送達する方法であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなる組成物であって、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなるものを生物活性薬と組み合わせて含んでなる処方物の治療上有効量を患者に投与することを含む、上記方法に関する。

10

【0038】

本発明のもう一つの態様は、血管斑を有する患者の内部領域のターゲッティングに用いる組成物であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなる組成物に関する。

【0039】

本発明の更にもう一つの態様は、血管斑を有する患者の内部領域のターゲッティングに用いる組成物であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなる組成物に関する。

20

【0040】

本発明の更にもう一つの態様は、血管斑を有する患者の治療または診断に使用する処方物であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなる組成物を生物活性薬と組み合わせて含んでなる処方物に関する。

30

【0041】

本発明のもう一つの態様は、血管斑を有する患者の治療または診断に使用する処方物であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油から処方された小胞を含んでなり、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなる組成物を生物活性薬と組み合わせて含んでなる処方物に関する。

【0042】

本発明の更にもう一つの態様は、血管斑を有する患者の部位のターゲッティングに用いる組成物の製造方法であって、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せ、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなる方法に関する。

40

【0043】

もう一つの態様は、血管斑を有する患者の部位のターゲッティングに用いる組成物の製造方法であって、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲッティングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せ、上記ターゲッティングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなる方法に関する。

【0044】

本発明のもう一つの態様は、血管斑を有する患者の治療または診断に用いる処方物の製

50

造方法であって、生物活性薬、脂質またはタンパク質、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットイングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せ、上記ターゲットイングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つ酸残基を含んでなる方法に関する。

【0045】

本発明の更にもう一つの態様は、血管斑を有する患者の治療または診断に用いる処方物の製造方法であって、生物活性薬、脂質またはポリマー、ガスまたはガス状前駆体、ターゲットイングリガンド、および場合によっては油と一緒に組合せ、上記ターゲットイングリガンドが血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし且つホスホリル化したセリン残基を含んでなる方法に関する。

【0046】

本発明のこれらのおよび他の態様は、下記の詳細な説明から明らかになるであろう。

【発明を実施するための形態】

【0047】

発明の詳細な説明

上記および本明細書の開示中に用いているように、下記の用語は、特に断らない限り、下記の意味を有するものと理解すべきである。

【0048】

「脂質」は、一般に両親媒性且つ生体適合性である合成または天然に存在する化合物を表す。脂質は、典型的には親水性成分と疎水性成分を含んでなる。典型的な脂質としては、例えば、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチジド、糖脂質、界面活性剤(界面活性剤)、脂肪族アルコール、ワックス、テルペンおよびステロイドが挙げられる。ある種の好ましい態様では、本明細書に記載の組成物に配合することができる脂質は、スルフヒドリル基またはジスルフィド結合を含まない。

【0049】

「脂質組成物」は、典型的には水性媒質中で脂質化合物を含んでなる組成物を表す。典型的な脂質組成物としては、懸濁液、エマルションおよび小胞組成物が挙げられる。

【0050】

「脂質処方物」は、生物活性薬も含んでなる脂質組成物を表す。

【0051】

「小胞」とは、一般に1以上の内部空隙を形成する1以上の壁または膜の存在を特徴とする球状物体を表す。小胞は、例えば、本明細書に記載の様々な脂質などの脂質、タンパク質性材料、または天然、合成および半合成ポリマーなどのポリマー材料から処方することができる。好ましい小胞は、脂質から処方された壁または膜を含んでなるものである。これらの好ましい小胞では、脂質は単分子層または二分子層の形態であることができ、単または二分子層脂質を用いて1以上の単または二分子層を形成することができる。1を上回る単または二分子層の場合には、単または二分子層は同心的であることができる。脂質を用いて、ユニラメラ小胞(1単分子層または二分子層から構成される)、オリゴラメラ小胞(約2または約3の単分子層または二分子層から構成される)、またはマルチラメラ小胞(約3を上回る単分子層または二分子層から構成される)を形成することができる。同様に、タンパク質またはポリマーから調製した小胞は、1以上の同心壁または膜を含んでなることができる。タンパク質またはポリマーから調製した小胞の壁または膜は実質的に固形(均一)であることができ、またはそれらは多孔性または半多孔性であることができる。ある種の好ましい態様では、小胞はスルフヒドリル基やジスルフィド結合を含まない。本明細書に記載の小胞としては、例えば、リポソーム、リポ球(lipospheres)、ミセル、気泡、微小気泡、微小球、脂質-、ポリマー-および/またはタンパク質をコーティングした気泡、微小気泡および/または微小球、微小気球、エーロゲル、クラスレートに結合した小胞などと普通に呼ばれている物体が挙げられる。小胞の内部空隙は、液体(例えば、水性液体または油など)、ガス、ガス状前駆体、および/または固体または溶質材料、例えば、ターゲットイングリガンドおよび/または生物活性薬を所望により満たしたまたはカプセル化した

10

20

30

40

50

物体が挙げられる。

【0052】

「リポソーム」とは、典型的には1以上の同心層、例えば、単分子層および/または二分子層の形態の脂質化合物などの両親媒性化合物の一般的には球状のクラスターまたは凝集体を表す。それらは、本明細書で脂質小胞と表すこともある。リポソームは、例えば、イオン性脂質および/またはノニオン性脂質から処方することができる。ノニオン性脂質から処方されるリポソームは、「ニオソーム(niosomes)」と呼ばれることもある。

【0053】

「リポ球」とは、1以上の壁または膜によって取り囲まれている液体または固形油を含んでなる物体を表す。

10

【0054】

「ミセル」とは、脂質から処方されたコロイド状物体を表す。ある種の好ましい態様では、ミセルは、単分子層またはヘキサゴナルH2相配置を含んでなる。他の好ましい態様では、ミセルは二分子層配置を含んでなることができる。

【0055】

「エーロゲル」とは、一般的には複数の小さな内部空隙を特徴とする球状物体を表す。エーロゲルは、合成材料(例えば、ベーキングレゾルシノールおよびホルムアルデヒドから調製したフォーム)、並びに多糖類またはタンパク質のような天然材料から処方することができる。

【0056】

「クラスレート」とは、小胞と関連させることができる固形、半多孔性または多孔性粒子を表す。好ましい形態では、クラスレートは、小胞を含んでなるキャビティーを含むがご様構造を形成することができる。1以上の小胞をクラスレートに結合させることができる。安定化材料を、所望ならば、クラスレートと関連させて、小胞とクラスレートの会合を促進することができる。クラスレートを処方することができる材料としては、例えば、カルシウムヒドロキシアパタイトのような多孔性アパタイト、およびカルシウム塩で沈澱したアルギン酸のようなポリマーおよび金属イオンの沈澱が挙げられる。

20

【0057】

本発明の小胞は、好ましくはガスまたはガス状前駆体を含む。「ガスを満たした小胞」とは、ガスがカプセル化されている小胞を表す。「ガス状前駆体を満たした小胞」とは、ガス状前駆体がカプセル化されている小胞を表す。小胞は、ガスおよび/またはガス状前駆体を極少量、部分的にまたは実質的に完全に満たすことができる。ある種の好ましい態様では、小胞は、実質的にまたは完全にガスおよび/またはガス状前駆体を満たすことができる。ガスおよび/またはガス状前駆体を満たした小胞に関して用いられる「実質的に」という用語は、小胞の内部空隙率の約50%を上回る量がガスからなることを意味する。好ましくは、greater than 実質的に満たされた小胞の内部空隙の約60%を上回る量がガスからなり、約70%を上回るのが一層好ましい。更に一層好ましくは、実質的に満たされた小胞の内部空隙の約80%を上回る量がガスからなり、約90%を上回るのが更に一層好ましい。特に好ましい態様では、小胞の内部空隙の約95%を上回る量がガスからなり、約100%が特に好ましい。本発明の好ましい態様を考えるものではないが、小胞は、所望ならば、ガスまたはガス状前駆体を全くまたは実質的に含まなくてもよい。

30

40

【0058】

「小胞組成物」とは、典型的には水性媒質中で小胞を含んでなる組成物を表す。

【0059】

「小胞処方物」とは、生物活性薬をも含んでなる小胞組成物を表す。小胞処方物に用いるのに適当な小胞または小胞種としては、例えば、ガスを満たした小胞およびガス状前駆体を満たした小胞が挙げられる。

【0060】

「エマルション」とは、2種類以上の液体のリポイド混合物を表し、一般にコロイドの形態をしている。脂質を、エマルション中に不均一に分散することができる。あるいは、

50

脂質を、例えば、単または二分子層などのクラスターまたは層に凝集させることができる。

【0061】

「懸濁液」とは、液体中で浮遊している細かく分割され、長期間安定なままでいることができる液体または固体粒子を表す。

【0062】

「ヘキサゴナルHII相構造」とは、液体媒質、例えば、水性媒質中の脂質の一般に管状の凝集体を表し、脂質の(複数の)親水性部分は管の内側の液体環境に関して内側に向いている。脂質の疎水性部分は一般に外側に広がっており、この複合体はヘキサゴナル管の形状が考えられている。複数の管が、一般にヘキサゴナル相構造中に一緒に詰め込まれている。

10

【0063】

「患者」とは、哺乳類などの動物、好ましくはヒトを表す。

【0064】

「患者の内部領域」および「目的とする領域」という用語は、患者そのものまたは患者の特定部位または部分を表す。患者の内部領域および目的とする領域としては、例えば、診断用画像化によって画像化される部位および/または生物活性薬で治療される部位が挙げられる。このような部位の典型的なものとしては、例えば、心筋組織など並びに血管系および循環系を含む他の体組織の心臓領域、および癌組織が挙げられる。本明細書で用いられる「血管系」という用語は、身体または身体の臓器または部分の血管を表す。

20

【0065】

「生物活性薬」とは、患者の疾患の存在または非存在の診断方法および/または患者の疾患の治療方法におけるような現存している治療薬または診断薬である用途と関連して用いることができる物質を表す。本明細書で用いられる「生物活性薬」とは、イン・ビトロおよび/またはイン・ビボで生物学的効果を発揮することができる物質をも表す。生物活性薬は、中性であるかまたは正または負に帯電していてもよい。適当な生物活性薬の例としては、診断薬、医薬、薬剤、合成有機分子、タンパク質、ペプチド、ビタミン、ステロイド、およびヌクレオシド、ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドのような遺伝子材料が挙げられる。

【0066】

「診断薬」とは、患者の内部領域の画像化および/または患者の疾患の存在または非存在の診断の方法に関して用いることができる任意の薬剤を表す。典型的な診断薬としては、例えば、本明細書に記載の脂質および/または小胞組成物を含む患者の超音波、磁気共鳴画像化またはコンピューター断層撮影法に関連して用いるコントラスト剤などが挙げられる。

30

【0067】

本明細書で用いられる「ポリマー」とは、2種類以上の反復単位の化学結合から形成される分子を表す。従って、「ポリマー」という用語に含まれるものとしては、例えば、二量体、三量体およびオリゴマーが挙げられる。ポリマーは、合成物、天然に存在するものまたは半合成物でよい。好ましい形態では、「ポリマー」とは、10以上の反復単位を含んでなる分子を表す。ある種の好ましい態様では、本明細書に記載の組成物に配合することができるポリマーは、スルフヒドリル基またはジスルフィド結合を含まない。

40

【0068】

「増粘剤」とは、本明細書に記載の脂質および/または小胞組成物に配合したときに、粘度調節剤、乳化および/または可溶化剤、懸濁剤、および張度上昇剤として作用することができる様々な一般に疎水性の材料のいずれかを表す。増粘剤は、このような特性により組成物の安定性の保持を補助することができると考えられている。

【0069】

「分散剤」とは、コロイド粒子の懸濁媒質、例えば、ある種の本明細書に記載の脂質および/または小胞組成物などに添加するときに、粒子の均一な分離を促進することができ

50

る界面活性剤を表す。ある種の好ましい態様では、分散剤はポリマー性シロキサン化合物を含んでなることができる。

【0070】

「遺伝子材料」とは、一般的にはデオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)などのヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを表す。遺伝子材料は、当業者に知られている合成化学の方法によって、または組換え体技術を用いることによって、または2つの組合せによって作製することができる。DNAおよびRNAは、場合によっては異常なヌクレオチドを含んでなることがあり、一本鎖または二本鎖のものでよい。「遺伝子材料」とは、センスおよびアンチセンスDNAおよびRNA、すなわち、DNAおよび/またはRNAのヌクレオチドの特異配列に対して相補的であるヌクレオチド配列をも表す。

10

【0071】

「医薬」または「薬剤」とは、患者の疾患、苦痛、疾病または創傷の治療(予防、診断、緩解、または治癒など)に用いることができる任意の治療または予防薬を表す。治療上有用なペプチド、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、医薬または薬剤という用語の意味に包含することができる。

【0072】

「安定化材料」とは、本明細書に記載の組成物の安定性を向上させることができる、例えば、エマルション、懸濁液、分散液および小胞組成物のような任意の材料を表す。改良される安定性は、例えば、比較的バランスのとれた条件の維持を含み、例えば、破壊、分解、減成に対する耐性の増加を挙げることができる。小胞、特にガスを満たした小胞を含む好ましい態様の場合には、安定化化合物は、小胞の破裂および/または癒着などによって起こることがある小胞内に取り込まれているガスの漏洩を最小限にしたりは実質的(完全を含む)に防止することによる小胞の安定性を改良する働きを行うことができる。取り込まれているガスの漏洩の防止に関して用いられる「実質的に」という用語は、ガスの約50%を上回る量が取り込まれて保持されていることを意味する。好ましくは、ガスの約60%を上回る量が保持されて取り込まれており、約70%を上回る量が更に好ましい。更に一層好ましくは、ガスの約80%を上回る量が保持されて取り込まれており、約90%を上回る量が更に好ましい。特に好ましい態様では、約95%を上回る量のガスが保持されて取り込まれている。所望ならば、ガスは、完全に保持されて取り込まれている(すなわち、約100%のガスが保持されて取り込まれている)。安定化化合物は、別個の個々の化合物(モノマー)を含んでなることができ、またはポリマーを含んでなることができる。脂質を含む好ましい態様の場合には、安定化材料は、共有的および/または非共有的に脂質化合物と会合していてもよい。広義には、安定化化合物は、例えば、界面活性剤、フィルム形成材料、膜および/または膜形成材料を含んでなることができる。本発明の方法および組成物で用いることができる典型的な安定化化合物としては、脂質、タンパク質およびポリマーが挙げられる。「安定化材料」の定義には、ある種の本発明の生物活性薬も包含される。安定化材料は中性であることができ、または正または負に帯電することもできる。中性安定化材料の中で好ましいものは、極性材料である。ある態様では、安定化化合物は実質的(完全を含む)に架橋していることができる。本明細書で用いられる「架橋する」、「架橋した」および「架橋」とは、一般に1以上の橋によって脂質、タンパク質およびポリマー安定化化合物などの2以上の安定化化合物の結合を表す。1以上の要素、基または化合物から構成されることがある橋は、第一の安定化化合物分子からの原子を第二の安定化分子に結合する働きを行う。架橋性橋は、共有および/または非共有的会合を伴うことがある。様々な要素、基および/または化合物は、架橋において橋を形成することができ、安定化化合物を自然にまたは合成的手段によって架橋することができる。例えば、架橋は、ケラチン、インスリンおよび他のタンパク質におけるようにシスチン残基のジスルフィド結合によって連結されているペプチド鎖から処方された材料で自然に起こることがある。あるいは、架橋は、適当な化学修飾によって、例えば、安定化材料のような化合物と架橋剤として働くことができる化学物質を結合させることによって行うことができ、これは例えば、熱、高エネルギー放射線、超音波放射線などに暴露することによって反応が引き起こされ

20

30

40

50

る。例としては、例えば、システイン残基にスルフヒドリル基として存在することができる硫黄と架橋してジスルフィド結合、有機ペルオキシドとの架橋、高エネルギー放射線による不飽和材料の架橋、ジメチロールカルバメートによる架橋などが挙げられる。架橋した安定化化合物に関して用いられる「実質的に」という用語は、約50%を上回る量の安定化化合物が架橋性橋を含むことを意味する。ある態様では、好ましくは約60%を上回る量の架橋した安定化化合物は架橋性橋を含み、約70%を上回る量が更に好ましい。更に一層好ましくは、約80%を上回る量の架橋した安定化化合物は架橋性橋を含み、約90%を上回る量が更に一層好ましい。ある種の特に好ましい態様では、約95%を上回る量の架橋した安定化化合物は、架橋性橋を含む。所望ならば、実質的に架橋した安定化化合物は、完全に架橋していてもよい(すなわち、約100%の架橋した安定化化合物が架橋性橋を含む)。最も好ましい態様では、安定化化合物実質的に(完全にを含む)非架橋であることができる。非架橋安定化化合物に関して用いられる「実質的に」という用語は、約50%を上回る量の安定化化合物が架橋性橋を欠いていることを意味する。好ましくは、約60%を上回る量の安定化化合物が架橋性橋を欠いており、約70%を上回る量が更に好ましい。更に一層好ましくは、約80%を上回る安定化化合物が架橋性橋を欠いており、約90%を上回る量が特に更に一層好ましい。好ましい態様では、約95%を上回る量の安定化化合物が架橋性橋を欠いている。所望ならば、実質的に非架橋性安定化化合物が完全に非架橋であることができる(すなわち、約100%の安定化化合物が架橋性橋を欠いている)。

10

**【0073】**

「小胞安定性」とは、約300mmHgの圧力に約1分間暴露した後に取り込まれているガスを保持するガスを満たした小胞の能力を表す。小胞安定性はパーセント(%)で測定され、これは、小胞に最初に取り込まれているガスの量と圧力を放出した後に保持されているガスの量との割合である。小胞安定性は、小胞が圧力を放出した後に元の大きさに戻る能力を表す「小胞レジリエンス」との関連も含んでいる。

20

**【0074】**

「共有的会合」とは、2個の原子の結合軌道で電子を共有している分子間会合または結合を表す。

**【0075】**

「非共有会合とは、共有結合を含まない2個以上の別々の分子間の分子間相互作用を表す。分子間相互作用は、関与した分子の極性、もしあれば、関与した分子の電荷(正または負)など様々な因子によって変化する。非共有的会合は、好ましくはイオン性相互作用、双極子-双極子相互作用およびファン・デル・ワールス力、およびそれらの組合せからなる群から選択される。

30

**【0076】**

「イオンの相互作用」または「静電的相互作用とは、2種類以上の分子であって、それらのそれぞれが正または負に帯電しているものの分子間相互作用を表す。従って、例えば、「イオンの相互作用」または「静電的相互作用」とは、第一の正に帯電した分子と第二の負に帯電した分子との引力を表す。典型的なイオン性または静電的相互作用としては、例えば、負に帯電した安定化材料、例えば、遺伝子材料、および正に帯電した脂質、例えば、ラウリルトリメチルアンモニウムブロミドのようなカチオン性脂質の間の引力が挙げられる。

40

**【0077】**

「双極子-双極子相互作用」とは、一般に2種類以上の極性分子起こる可能性がある引力を表す。従って、「双極子-双極子相互作用」とは、普通は $+$ と表される第一の極性分子の帯電していない部分的正末端の普通は $-$ と呼ばれる第二の極性分子の帯電していない部分的負末端に対する引力を表す。双極子-双極子相互作用は、例えば、正に帯電した頭基、例えば、ホスファチジルコリンのコリン頭基と、負に帯電した原子、例えば、酸素、窒素または硫黄のようなヘテロ原子であって、多糖類のような安定化材料に含まれているものとの引力が例示される。「双極子-双極子相互作用」とは、分子間水素結合であって、水素原子が離れている分子上の負に帯電した原子間で橋として働き且つ水素原子が共有

50

結合によって第一の分子に固定され且つ静電的力によって第二の分子に固定されているものをも表す。

【0078】

「ファン・デル・ワールス力」とは、量子力学によって説明される無極性分子間の引力を表す。ファン・デル・ワールス力は、一般に隣接分子によって誘導され且つ電子分布の変化を伴う瞬間的雙極子モーメントと関連している。

【0079】

「水素結合」とは、負に帯電した原子、例えば、酸素、硫黄、窒素などと共有結合している水素原子ともう一つの負に帯電した原子との間で起こることがある引力または橋を表す。水素結合は、第一の分子の水素原子と第二の分子の負に帯電した原子との間で起こることがある(分子間水素結合)。また、水素結合は、水素原子と負に帯電した原子であって、両方とも単一分子に含まれているもの間でも起こることがある(分子内水素結合)。

10

【0080】

「親水性相互作用」とは、実質的に水と結合し、を吸収しおよび/またはに溶解することができる分子または分子の部分を表す。これにより、膨潤しおよび/または可逆性ゲルを形成することがある。

【0081】

「疎水性相互作用」とは、水と実質的に結合、水を吸収、および/または、水に溶解しない分子または分子の部分を表す。

【0082】

「生体適合性」とは、一般に生物学的機能を損なわず且つアレルギー反応および疾病状態など許容できない程度の毒性を生じない材料を表す。

20

【0083】

「と組み合わせる」とは、ある態様では、脂質組成物および小胞組成物などの本発明の組成物へのターゲッティングリガンドの組込みを表す。「と組み合わせる」とは、脂質組成物および小胞組成物などの本発明の組成物への生物活性薬の組込みをも表す。生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドは、本発明の組成物と様々な方法のいずれかで組み合わせることができる。所望ならば、生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドを、例えば、脂質化合物、タンパク質、ポリマーおよび/または小胞、または他の任意の安定化材料のような本発明の組成物の1以上の成分と共有的に会合させることができる。また、所望ならば、生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドと例えば、脂質化合物、タンパク質、ポリマーおよび/または小胞、または他の任意の安定化材料のような本発明の組成物の他の成分と実質的に共有会合がないこともある。生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドと例えば、脂質化合物、タンパク質、ポリマーおよび/または小胞のような組成物の他成分との共有会合の欠如に関して本明細書で用いられる「実質的にない」という用語は、約50%未満、例えば、約0%-約50%未満(および総ての特定の百分率、およびその百分率の組合せおよび下位組合せ)の生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドは組成物の他成分と共有的に会合することができることを意味することができる。好ましくは、約40%未満の生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドは組成物の他成分と共有的に会合することができ、約30%未満が一層好ましい。更に一層好ましくは、約20%未満の生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドを、組成物の他成分と共有的に会合することができ、約10%未満が更に一層好ましい。更に一層好ましい態様では、生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドと組成物の他成分との共有会合が完全でない(すなわち、0%)ことがある。

30

40

【0084】

組成物の他成分と実質的に共有会合を持たない生物活性薬および/またはターゲッティングリガンド本明細書では「未結合」または「遊離」生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドと表すことがある。このような組成物では、生物活性薬および/またはターゲッティングリガンドは、所望ならば、組成物の他成分、例えば、脂質化合物、タンパク質、ポリマーおよび/または小胞、または他の任意の安定化材料と非共有的に会合す

50

ることができる。更に、所望ならば、未結合または遊離生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドと、組成物の他成分、例えば、脂質化合物、タンパク質、ポリマーおよび/または小胞との非共有的会合が実質的にないことがある。生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドと組成物の他成分、例えば、脂質化合物、タンパク質、ポリマーおよび/または小胞の非共有的会合の欠如に関して本明細書で用いられる「実質的にない」という用語は、約50%未満、例えば、約0%-約50%未満(および総ての特定の百分率、およびその中の百分率の範囲の組合せおよび下位組合せ)の未結合または遊離生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドを、組成物の他成分と非共有的に会合させることができることを意味することがある。好ましくは、約40%未満の未結合または遊離生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドを、組成物の他成分と非共有的に会合させることができ、約30%未満が一層好ましい。更に一層好ましくは、約20%未満の未結合または遊離生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドを組成物の他成分と非共有的に会合させることができ、約10%未満が更に一層好ましい。更に一層好ましい態様では、未結合または遊離生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドと組成物の他成分との非共有的会合が完全にない(すなわち、0%)ことがある。

10

20

30

40

50

**【0085】**

小胞組成物の場合には、生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドが小胞の内部空隙内に取り込まれていることがある。生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドを、例えば、小胞の(複数の)層または(複数の)壁中に含まれる脂質中に散在させることによつて小胞の(複数の)層または(複数の)壁中に組込むこともできる。更に、生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドを小胞の表面に配置することができると考えられる。いずれにせよ、生物活性薬および/またはターゲットイングリガンドは、小胞の内部および/または外部表面などの小胞の壁と化学的に相互作用することができ、実質的にそこに付着したままになることがある。このような相互作用は、例えば、共有会合または非共有的会合の形態をとることができる。ある態様では、相互作用により、小胞が安定化することがある。

**【0086】**

「ターゲットイングリガンド」とは、本発明の組成物を用いて組織および/または受容体のイン・ピボでのターゲットイングを促進することができる任意の材料または物質を表す。ターゲットイングリガンドは、合成、半合成または天然に存在するものでよい。本発明のターゲットイングリガンドは、血管斑のターゲットイングを有利に行うことができる。

**【0087】**

ターゲットイングリガンドの「前駆体」とは、ターゲットイングリガンドに転換することができる任意の材料または物質を表す。このような転換は、例えば、前駆体をターゲットイングリガンドに固定する必要があることがある。

**【0088】**

「ホスホリル化セリン残基」とは、本明細書で一層詳細に説明されるように、セリン基と酸化されたリン基を含む化合物ラジカルを表す。

**【0089】**

「ペプチド」とは、約2-約100個のアミノ酸残基を含むことができる含窒素化合物を表す。ある種の好ましい態様では、本明細書に記載の組成物に組込むことができるペプチドはスルフヒドリル基またはジスルフィド結合を含まない。

**【0090】**

「タンパク質」とは、約100を上回るアミノ酸残基を含むことができる含窒素化合物を表す。ある種の好ましい態様では、本明細書に記載の組成物に組込むことができるタンパク質は、スルフヒドリル基またはジスルフィド結合を含まない。

**【0091】**

「コート」または「コーティング」とは、安定化材料と脂質および/または小胞との相互作用を表し、共有および/または非共有的会合を伴うことがある。

## 【0092】

「組織」とは、一般に特定の機能を行うことができる分化細胞を表す。本明細書で用いられる「組織」という用語は、個々の細胞、または複数細胞または細胞の凝集体、例えば、膜または臓器を表すことがある。「組織」という用語は、異常細胞または複数の異常細胞を表すこともある。典型的な組織としては、例えば、心筋細胞および心筋細胞などの心筋組織(心臓組織または心筋)、内皮および上皮などの膜組織、薄膜、間質組織などの結合組織、および腫瘍が挙げられる。

## 【0093】

「受容体」とは、一般に特異的物質が選択的に結合することを特徴とする細胞中または細胞表面上の分子構造を表す。典型的な受容体としては、例えば、ペプチドホルモン、神経伝達物質、抗原、補体断片、および免疫グロブリンおよびステロイドホルモンの細胞質受容体が挙げられる。

10

## 【0094】

「内皮細胞」または「内皮」とは、正常および/または病気に罹っていることがあり且つ橋と橋とでまたは重複方式で結合して膜を形成することがある平坦化した透明内皮細胞の単層を含んでなることがある細胞および/または組織の凝集体を表す。内皮細胞は、心臓、血管およびリンパ管のライニング膜の部分として、漿膜の自由表面上に、脳および脊髄の表面および前眼房に見出される。内皮は胚性中胚葉に由来し、心臓組織、例えば、梗塞心臓組織、心臓血管系、末梢血管系、例えば、動脈、静脈、および毛細血管(心臓に対して末梢であると表される部位)、血餅およびアテローム性動脈硬化症斑の周囲の領域が

20

## 【0095】

「上皮細胞」または「上皮」とは、基底膜上に支持された間質性のセメント質物質によって互いに合体させることができる1以上の細胞の層を含んでなることがある細胞および/または組織の凝集体を表す。上皮は、例えば、細胞の単一層(単純上皮)、単一層を上回る細胞の層(成層上皮)、および実質的に層化を出現することなく互いに適合している約3または4層の細胞に分類することができる。異なる形態の単純上皮は、通常は鱗状、単層扁平、柱状、腺および/または繊毛状と呼ばれる。上皮は胚性原外胚葉または内胚葉に由来する。上皮としては、心臓組織、例えば、梗塞心臓組織、心臓血管系、末梢血管系、例えば、動脈、静脈および毛細血管、血餅、およびアテローム性動脈硬化症斑の周囲の領域が

30

## 【0096】

「心筋」とは、一般に心臓組織、例えば、心筋細胞、心筋、心内膜および心外膜細胞が挙げられる。「心筋」という用語としては、梗塞心臓組織、心臓血管系、末梢血管系、例えば、動脈、静脈および毛細血管(心臓に対して末梢であると表される部位)、血餅、血栓、およびアテローム性動脈硬化症斑の周囲の領域が挙げられる。

## 【0097】

「心臓領域」とは、一般に心臓および周囲の組織、構造および血管、例えば、冠状動脈を表す。

## 【0098】

「腫瘍細胞」または「腫瘍」とは、制御されない細胞増殖を特徴とする罹患状態と関連していることがある異常細胞および/または組織の凝集体を表す。疾病状態は、例えば、内皮、上皮および心筋細胞などの様々な細胞型を伴うことがある。疾病状態としては、新生物、癌、白血病、および再狭窄障害が挙げられる。

40

## 【0099】

「血管斑」とは、一般に動脈壁において血管内膜の肥厚化が進んだ繊維状の部位を表し、アテローム性動脈硬化症の進行に極めて特徴的な病変である。斑は、典型的には多数の平滑筋細胞、マクロファージ、およびコラーゲンを含む繊維性筋性層またはキャップで被覆された細胞外脂質(コレステロール結晶を有する)と壊死細胞断片(「粥」とも表される)の中心コアを含んでなる。

50

## 【0100】

本発明は、一部には診断用画像化の方法および組成物に関する。以後において更に詳細に説明するように、本発明の方法および組成物は、血管斑の患者の診断および/または治療に関して用いるのに特に適している。本発明は、一部にはこのような斑のイン・ピボでのターゲッティングに有利に適合させている方法および組成物を提供する。このターゲッティングによって、本明細書に記載の組成物を、例えば、超音波画像化法などの診断用画像化法に用いることができ、これによって医師が斑の存在並びに斑によって患者に引き起こされる危険のレベルを同定しおよび/または確認することができる。

## 【0101】

本発明によれば、脂質および/または小胞組成物を伴う態様が提供される。脂質、イン・ピボでの組織、細胞および/または受容体をターゲッティングすることができるターゲッティングリガンド、ガスまたはガス状前駆体、および場合によっては油を含んでなる脂質組成物を含んでなる態様が提供される。本明細書では、水性キャリアー中に脂質またはタンパク質、イン・ピボでの組織、細胞および/または受容体ターゲッティングすることができるターゲッティングリガンド、ガスまたはガス状前駆体、および場合によっては油から処方された標的小胞を含んでなる小胞組成物を含んでなる態様も提供される。脂質組成物および特に小胞組成物の形態の脂質組成物に関しては、脂質組成物をゲルを下回る温度から含まれている脂質の液状の結晶性相遷移温度までの温度で有利に調製することができる。この相遷移温度は、脂質二分子層がゲル状態から液状結晶性状態へ転換する温度である。例えば、Chapman et al., J. Biol. Chem. 1974 249, 2512-2521を参照されたい。

10

20

## 【0102】

ゲル状態から液状結晶性状態への相遷移温度が高い脂質から調製される小胞は、任意の所定温度での不透過性が高くなりやすいと一般に考えられている。飽和ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンの主鎖融解遷移については、Derek Marsh, 「脂質二重層のCRCハンドブック」(CRC Press, Boca Raton, FL 1990), p. 139を参照されたい。様々な脂質のゲル状態から液状結晶性状態への相遷移温度は当業者には容易に明らかになるであろうし、例えば、Gregoriadis監修, 「リポソーム技術」, Vol.1, 1-18 (CRC Press, 1984)に記載されている。下表に、代表的脂質の幾つかとそれらの相遷移温度を示す。

## 【0103】

【表 1】

表 1 飽和ジアシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン： 主鎖融解遷移温度	
アシル鎖の炭素数	主相遷移温度(°C)
1,2-(12:0)	-1.0
1,2-(13:0)	13.7
1,2-(14:0)	23.5
1,2-(15:0)	34.5
1,2-(16:0)	41.4
1,2-(17:0)	48.2
1,2-(18:0)	55.1
1,2-(19:0)	61.8
1,2-(20:0)	64.5
1,2-(21:0)	71.1
1,2-(22:0)	74.0
1,2-(23:0)	79.5
1,2-(24:0)	80.1

例えば、Derek Marsh, 「脂質二重層のCRCハンドブック」, p.139 (CRC Press, Boca Raton, FL 1990)を参照されたい。

## 【0104】

本発明の脂質および/または小胞組成物に、用いた脂質の総量に対して負に帯電した脂質を少なくとも少量、例えば、約1-約10モル%を組込むことによって小胞の安定性を高めることができることがある。適当な負に帯電した脂質としては、例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、および脂肪酸が挙げられる。任意の理論または操作の理論によって束縛しようとするものではないが、このような負に帯電した脂質は、互いに融合することによって小胞が破裂する傾向を中和することによって更に安定性が提供されると考

10

20

30

40

50

えられる。従って、負に帯電した脂質は、小胞の外部表面上の均一な負に帯電した層を安定させるように作用することができ、これは、小胞に近接している他の小胞上の同じ電荷の外層によって反発される。この方法では、小胞が互いに近接する傾向は少なくなり、それぞれの小胞の膜または皮が破裂して、単一の層大きな小胞へ統合されることがある。勿論、この統合の工程を継続すると、小胞がかなり分解する。

【0105】

特に小胞組成物に関して用いた脂質材料は、好ましくは柔軟性がある。これは、本発明に関連して、小胞がその形状を変化させ、例えば、小胞の直径より小さな直径を有する開口を通過することができることを意味する。

【0106】

様々な脂質が、脂質組成物に配合するのに適していると思われる。特に小胞組成物に関しては、例えば、ミセルおよび/またはリポソーム、材料またはその組成物であって、それらの調製に適していることが当業者に知られているものを用いることができる。用いる脂質は、天然、合成または半合成起源のものでよい。上記のように、適当な脂質は、一般に例えば、脂肪酸、中性脂肪、ホスファチジド、糖脂質、脂肪族アルコールおよびワックス、テルペン、セスキテルペン、およびステロイドが挙げられる。

【0107】

本発明の脂質組成物を調製するのに用いることができる典型的な脂質としては、例えば、脂肪酸、リゾホスホ脂質のようなリゾ脂質(lysolipids)、ホスホコリン、例えば、血餅をターゲットにする1-アルキル-2-アセチル-sn-グリセロ 3-ホスホコリン、および1-アルキル-2-ヒドロキシ-sn-グリセロ-3-ホスホコリンなどの血小板活性化因子(PAF)(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)と会合したもの;飽和および不飽和脂質を有するホスファチジルコリン、例えば、ジオレオイルホスファチジルコリン;ジミリストイルホスファチジルコリン;ジペンタデカノイル-ホスファチジルコリン;ジラウロイルホスファチジルコリン;ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC);ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC);およびジアラキドニルホスファチジルコリン(DAPC);ホスファチジルエタノールアミン、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)およびジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE);ホスファチジルセリン;ホスファチジルグリセロール、例えば、ジステアロイルホスファチジル-グリセロール(DSPG)およびジパルミトイル-グリセロールスクシネート(DPGS);ホスファチジルイノシトール;スフィンゴ脂質、例えば、スフィンゴミエリン;スフィンゴシン;ガングリオシドGM1およびGM2;糖脂質のような糖脂質;スルファチド;グリコスフィンゴ脂質;ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)およびジステアロイルホスファチジン酸(DSPA)のようなホスファチジン酸;パルミチン酸;ステアリン酸;アラキドン酸;オレイン酸;キチン、ヒアルロン酸、ポリビニルピロリドンまたはポリエチレングリコール(PEG)のような脂質担持ポリマーであって、本明細書では「ベジル化脂質」とも呼ばれるものであって、好ましい脂質担持ポリマーとしてはDPPE-PEG (DPPE-PEG)が挙げられ、これはPEGポリマーを結合させた脂質DPPEが挙げられ、例えば、DPPE-PEG5000であって、平均分子量が約5000のPEGポリマーを結合させたDPPEが挙げられるもの;脂質担持スルホネートモノ-、ジ-、オリゴ-または多糖類;コレステロール、コレステロールスルフェート、コレステロールヘミスクシネートおよびコレステロールアミンのようなステロイド;トコフェロールヘミスクシネート;エーテルおよびエステル結合脂肪酸を有する脂質;重合脂質(様々なものが当該技術分野で周知である);ジアセチルホスフェート;ジセチルホスフェート;ステアリルアミン;カルディオリピン;長さが約6-約8個の炭素の短鎖脂肪酸を有するリン脂質;例えば、一方のアシル鎖が約6個の炭素でありもう一方のアシル鎖が約12個の炭素であるような非対称アシル鎖を有する合成リン脂質;セラミド;ニオソーム、例えば、ポリオキシアルキレン(例えば、ポリオキシエチレン)脂肪酸エステル、ポリオキシアルキレン(例えば、ポリオキシエチレン)脂肪アルコール、ポリオキシアルキレン(例えば、ポリオキシエチレン)脂肪アルコールエーテル、ポリオキシアルキレン(例えば、ポリオキシエチレン)ソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ICI Americas, Inc., Wilmington, DEから市販され

10

20

30

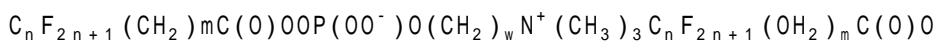
40

50

ているTWEEN(登録商標)20、TWEEN(登録商標)40、およびTWEEN(登録商標)80などのTWEEN(登録商標)と表される化合物のクラス、グリセロールポリエチレングリコールオキシステアレート、グリセロールポリエチレングリコールリシノレート、アルキルオキシ化(例えば、エトキシ化)大豆ステロール、アルキルオキシ化(例えば、エトキシ化)ヒマシ油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンポリマー、およびポリオキシアルキレン(例えば、ポリオキシエチレン)脂肪酸ステアレートなどのノニオン性リポソーム;コレステロールスルフェート、コレステロールブチレート、コレステロールイソブチレート、コレステロールパルミテート、コレステロールステアレート、ラノステロールアセテート、エルゴステロールパルミテート、およびフィトステロールn-ブチレートなどのステロール脂肪酸エステル;コレステロールグルクロニド、ラノステロールグルクロニド、7-デヒドロ-コレステロールグルクロニル、エルゴステロールグルクロニド、コレステロールグルコネート、ラノステロールグルコネート、およびエルゴステロールグルコネートなどの糖酸のステロールエステル;ラウリルグルクロニド、ステアロイルグルクロニド、ミリスチルグルクロニド、ラウリルグルコネート、ミリスチルグルコネート、およびステアロイルグルコネートなどの糖酸とアルコールのエステル;スクロースラウレート、フルクトースラウレート、スクロースパルミテート、スクロースステアレート、グルクロン酸、グルコン酸、およびポリウロン酸などの糖と脂肪酸のエステル;サルササポゲニン、スミラゲニン、ヘデラゲニン、オレアノール酸、およびジギトキシゲニンなどのサポニン;グリセロールジラウレート、グリセロールトリラウレート、グリセロールジパルミテート、グリセロールおよびグリセロールエステル、例えば、グリセロールトリパルミテート、グリセロールジステアレート、グリセロールジミリステート、グリセロールトリミリステート;n-デシルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、およびn-オクタデシルアルコールなどの長鎖アルコール;6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)-1-チオ-D-ガラクトピラノシド;ジガラクトシルジグリセリド;6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)-ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-D-ガラクトピラノシド;6-(5-コレステレン-3-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-D-マンノピラノシド;12-(((7'-ジエチルアミノ-クマリン-3-イル)-カルボニル)メチルアミノ)-オクタデカン酸;N-[12-(((7'-ジエチルアミノ-クマリン-3-イル)-カルボニル)メチルアミノ)-オクタデカノイル]-2-アミノパルミチン酸;コレステリル(4'-トリメチル-アンモニオ)ブタノエート;N-スクシニルジオレオイルホスファチジルエタノールアミン;1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール;1,2-ジパルミトイル-sn-3-スクシニルグリセロール;1,3-ジパルミトイル-2-スクシニルグリセロール;1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミン、およびパルミトイルホモシステイン、および/またはそれらの任意の組合せが挙げられる。好ましい態様では、安定化材料は、DPPC、DPPE、DPPA、DSPC、DSPE、DSPGおよびDAPCの1個以上を含むリン脂質を含んでなる。

#### 【0108】

適当なフッ素化脂質の例としては、式:



(式中、mは0-約18であり、nは1-約12であり、wは1-約8である)

の化合物が挙げられるが、これらに限定されない。これら並びに本発明で有用な他のフッ素化脂質の合成の例および方法は、Unger, 米国特許第5,997,898号明細書、Reiss et al. 米国特許第5,344,930号明細書、Frezard, F., et al., Biochem Biophys Acta, 1192: 61-70 (1994)、および Frezard, F., et al., Art. Cells Blood Subs and Immob Biotech., 22: 1403-1408 (1994)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。ジフルオロアシルグリセリルホスファチジル-コリン、ノナフッ素化ジアシルグリセリルホスファチジルコリンの一つの具体例は、下記の化合物Aで表される。当業者であれば、他の普通のリン脂質の類似フッ素化誘導体(ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジルグリセロールなど)並びに脂肪酸アシルエステルおよび遊離脂肪酸のフッ素化誘導体も本発明の範囲によって機能することができることを理

解するであろう。更に、脂質を基剤とし且つフッ素化した(過フッ素化を含む)界面活性剤を、本発明の安定化材料として用いることができる。

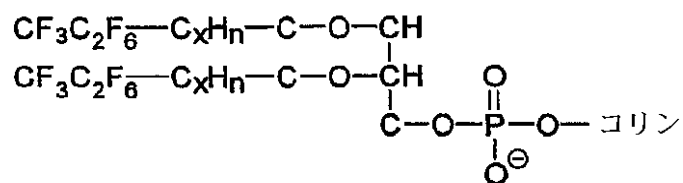
【0109】

重合脂質の例としては、不飽和親油性鎖、例えば、約50個までの炭素原子を有するアルケニルまたはアルキニルが挙げられる。他の例は、リン脂質、例えば、重合性基を有するホスホグリセリドおよびスフィンゴ脂質;およびヒドロキシル基を有する飽和および不飽和脂肪酸誘導体、例えば、ヒマシ油および麦角油などのd-12-ヒドロキシオレイン酸のトリグリセリドである。重合は、カルボキシルまたはヒドロキシル基のような親水性置換基を含み、分散性を高めて、生分解から生じる主鎖残基が水溶性となるようにデザインすることができる。適当な重合性脂質は、例えばKlaveness et al, 米国特許第5,536,490号明細書にも記載されており、上記明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

10

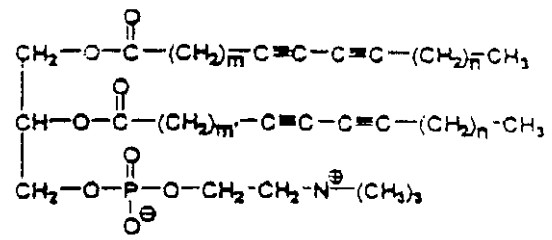
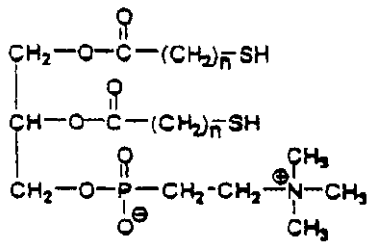
【0110】

本発明の組成物に用いることができる典型的な重合性および/またはフッ素化脂質化合物を、下記に示す。



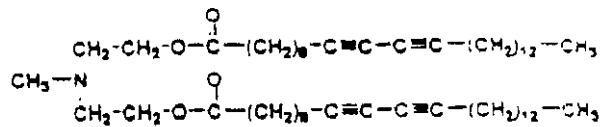
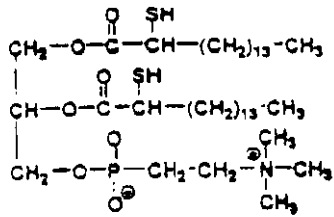
(A)

20



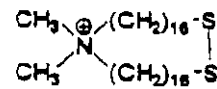
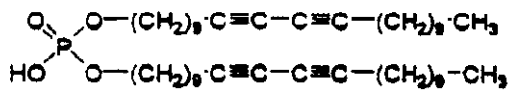
(B)

(C)



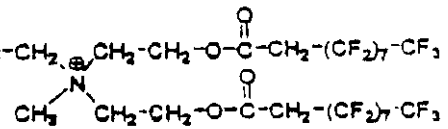
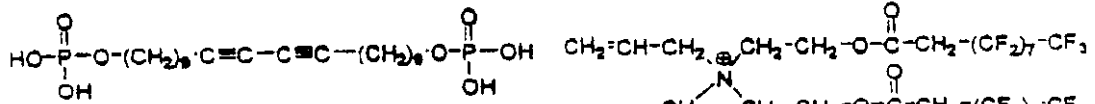
(D)

(E)



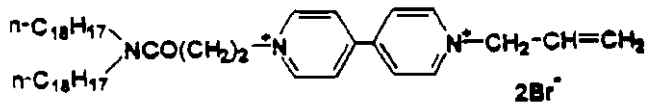
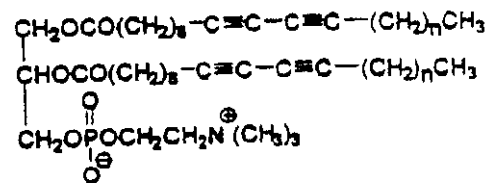
(F)

(G)



(H)

(I)

2Br<sup>-</sup>

(J)

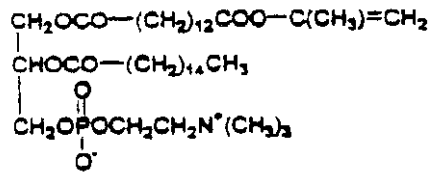
(K)

10

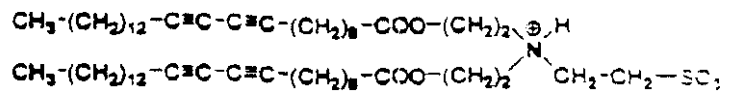
20

30

40

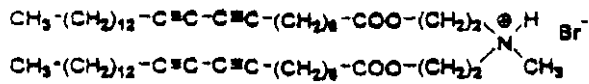


(L)

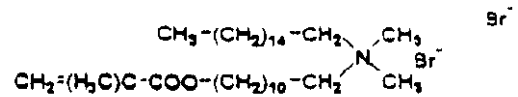


(M)

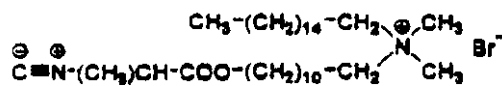
10



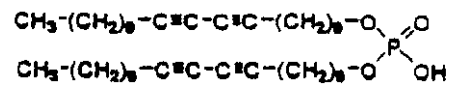
(N)



(O)

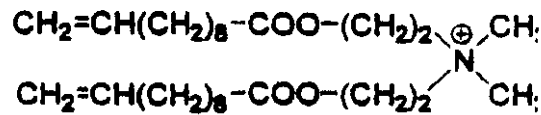


(P)



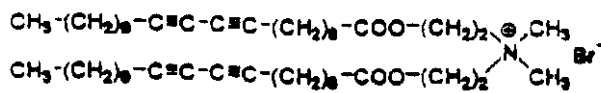
(Q)

20

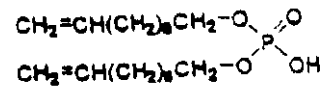


(R)

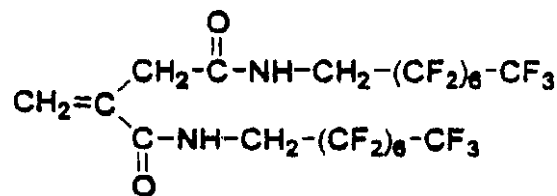
30



(S)

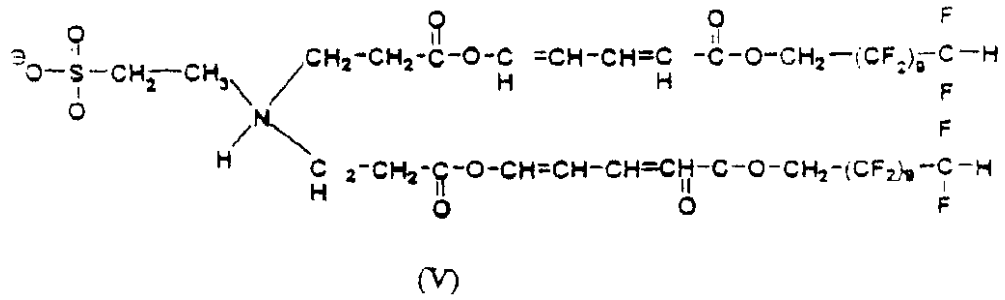


(T)



(U)

40



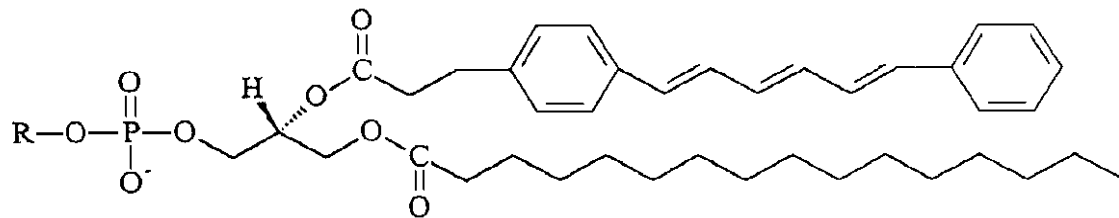
10

## 【0111】

上記の式Aにおいて、xは約8-約18の整数であり、nは2xである。最も好ましくは、xは12であり、nは24である。上記の式B、CおよびKにおいて、m、n、m'およびn'は独立して約8-約18、好ましくは約10-約14の整数である。

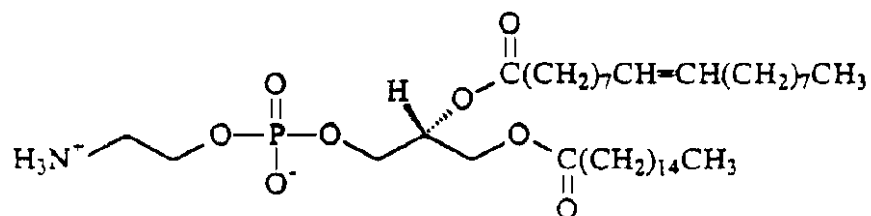
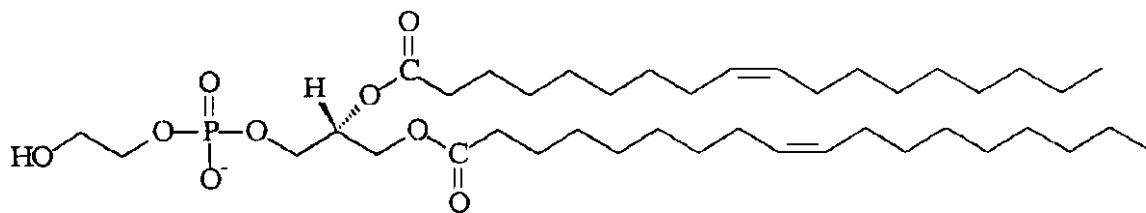
## 【0112】

本発明の組成物に用いることができる他の脂質としては、例えば、

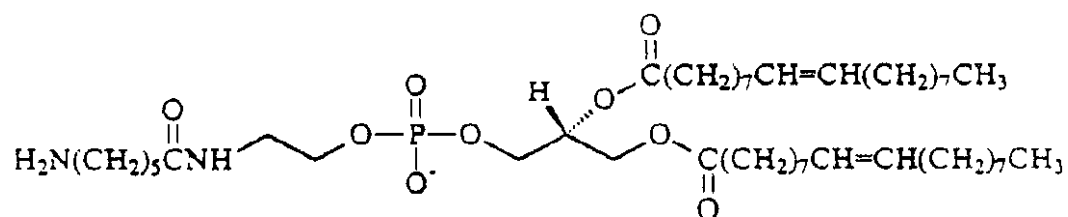


20

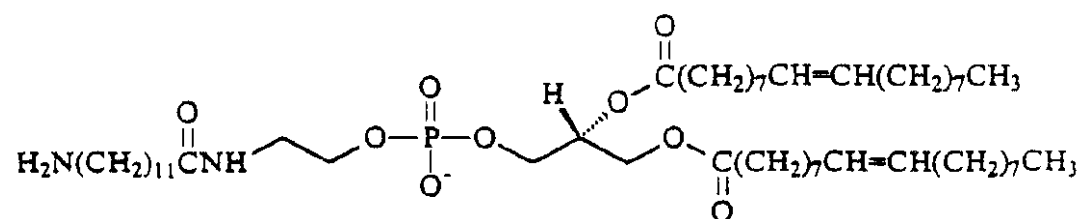
(式中、Rはコリンである)

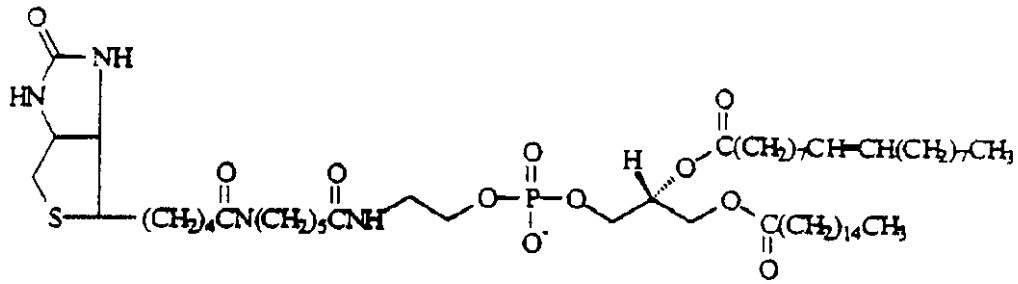


10

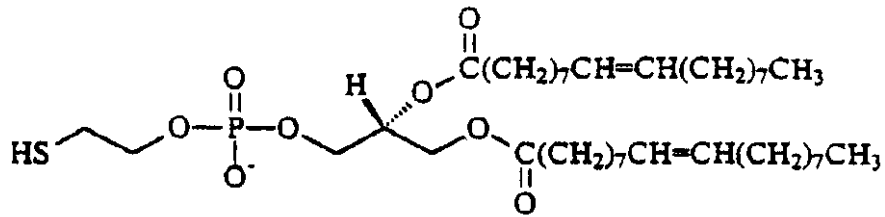


20

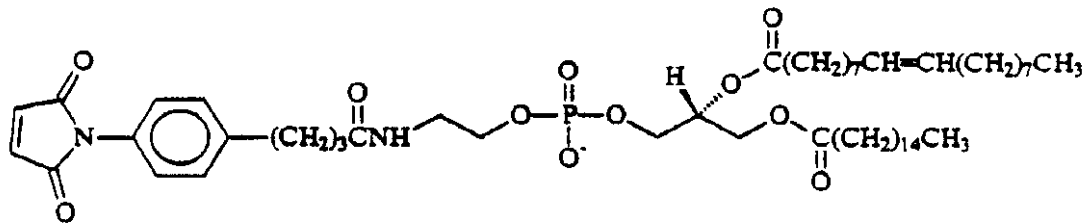




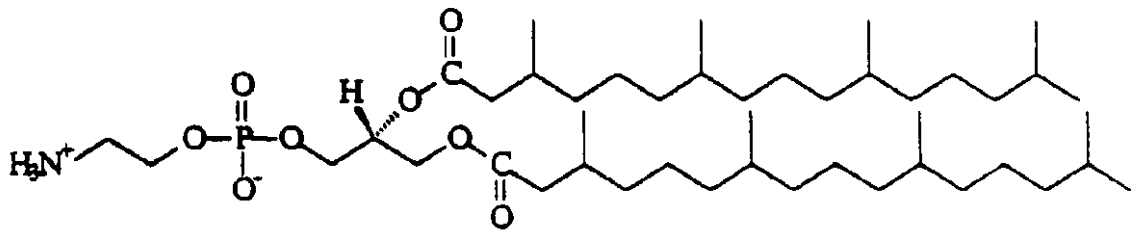
10



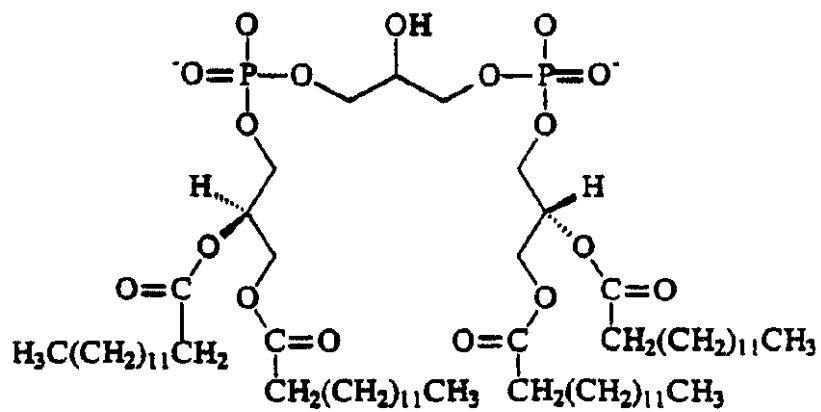
20

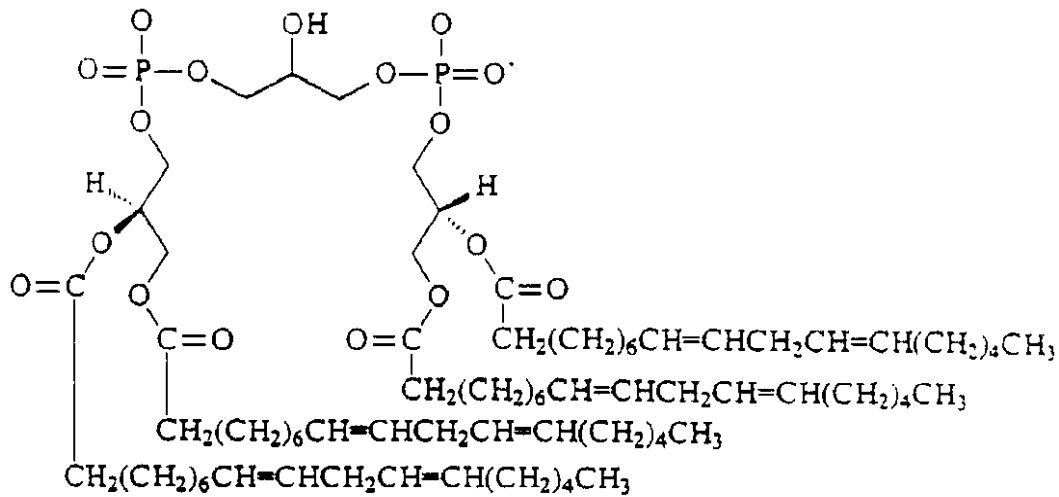


30



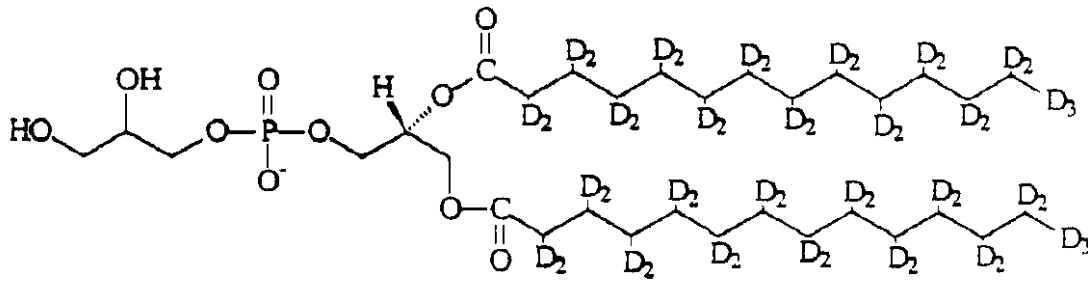
40



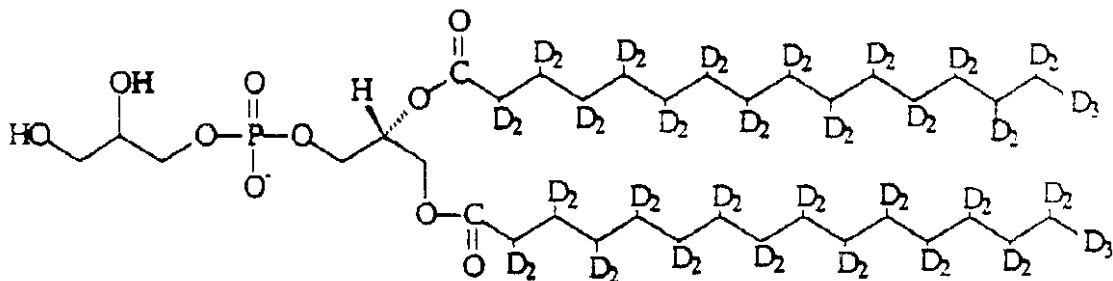


10

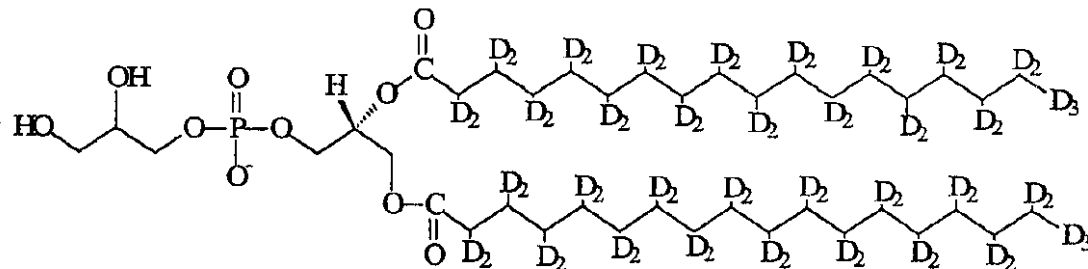
ジューテリウム化した脂質、例えば、



20



30



40

が挙げられる。

【0113】

所望ならば、カチオン性脂質、例えば、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、1,2-ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP);および1,2-ジオレイル-3-(4'-トリメチルアンモニオ)-ブタノ

50

イル-sn-グリセロール(DOTB)を用いることができる。カチオン性脂質を脂質組成物に用いるときには、カチオン性脂質対非カチオン性脂質のモル比は、例えば、約1:1000-約1:100である。好ましくは、カチオン性脂質対非カチオン性脂質のモル比は約1:2-約1:10であり、約1:1-約1:2.5の比が好ましい。更に一層好ましくは、カチオン性脂質対非カチオン性脂質のモル比は約1:1である。

【0114】

カチオン性と非カチオン性脂質を両方とも含む脂質組成物の場合には、様々な脂質を非カチオン性脂質として用いることができる。好ましくは、この非カチオン性脂質は、1以上のDPPC、DPPEおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを含んでなる。上記のカチオン性脂質の代わりに、脂質担持カチオン性ポリマー、例えば、ポリリシンまたは

10

【0115】

ある種の好ましい態様では、脂質組成物は、リン脂質、特に1種類以上のDPPC、DPPE、DPPA、DSPC、DSPE、DSPG、およびDAPC(20個の炭素)を含んでなる。

【0116】

更に、飽和および不飽和脂肪酸を本発明の脂質組成物に用いることができ、好ましくは約12個の炭素-約22個の炭素を直鎖状または分岐状で含む分子を挙げることができる。イソプレノイド単位および/またはプレニル基からなる炭化水素基を、同様に用いることもできる。適当な飽和脂肪酸の例としては、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、およびステアリン酸が挙げられる。用いることができる適当な不飽和脂肪酸としては、例えば、ラウロール酸、フィセテル酸、ミリストール酸、パルミトール酸、ペトロセリン酸、およびオレイン酸が挙げられる。用いることができる分岐脂肪酸の例としては、例えば、イソラウリン酸、イソミリスチン酸、イソパルミチン酸、およびイソステアリン酸が挙げられる。本発明の組成物に用いることができる他の脂質としては、Unger et al., 米国特許第6,090,800号明細書およびUnger, 米国特許第6,028,066号明細書に開示されているものが挙げられ、上記明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

20

30

【0117】

脂質から処方された脂質組成物および/または小胞組成物の他に、本発明の態様は、天然、半合成(修飾した天然)または合成起源のものでよいポリマーから処方された小胞を含むこともできる。本明細書で用いられるポリマーという用語は、2種類以上の反復モノマー単位、好ましくは10以上の反復モノマー単位から構成される化合物を表す。本明細書で用いられる半合成ポリマー(または修飾した天然ポリマー)という用語は、ある方式で化学的に修飾した天然ポリマーを表す。本発明で用いるのに適当な典型的な天然ポリマーとしては、天然に存在する多糖類が挙げられる。このような多糖類としては、例えば、アラビナン、フルクタン、フカン、ガラクタン、ガラクトナン、グルカン、マンナン、キシラン(例えば、イヌリン)、レバン、フコイダン、カラゲナン、ガラクトカロロース、ペクチン酸、ペクチン、includingアミロース、プルラン、グリコーゲン、アミロペクチン、セルロース、デキストラン、デキストリン、デキストロース、ポリデキストロース、パストラン、キチン、アガロース、ケラタン、コンドロイタン、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンタンガム、澱粉および様々な他の天然ホモポリマーまたはヘテロポリマー、例えば、下記のアルドース、ケトース、酸またはアミンの1以上を含むもの:エリトロース、トレオース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、エリトルロース、リブロース、キシルロース、プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、マルトース、セロビオース、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパ

40

50

ラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、ヒスチジン、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクトロン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、およびノイラミン酸、および天然に存在するそれらの誘導体が挙げられる。従って、適当なポリマーとしては、例えば、アルブミンのようなタンパク質が挙げられる。典型的な半合成ポリマーとしては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、およびメトキシセルロースが挙げられる。本発明で用いるのに適当な典型的な合成ポリマーとしては、ポリエチレン(例えば、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン、およびポリエチレンテレフタレート)、ポリプロピレン(例えば、ポリプロピレングリコール)、ポリウレタン(例えば、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルクロリドおよびポリビニルピロリドン)、ポリアミド、例えば、ナイロン、ポリスチレン、ポリ乳酸、フッ素化炭化水素、フッ素化炭素(例えば、ポリテトラフルオロエチレン)、およびポリメチルメタクリレート、およびそれらの誘導体が挙げられる。モノマー、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、エチレンイミン、クロトン酸、アクリルアミド、エチルアクリレート、メチルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、乳酸、グリコール酸、 $\epsilon$ -カプロラクトン、アクロレイン、シアノアクリレート、ビスフェノールA、エピクロルヒドリン、ヒドロキシアルキル-アクリレート、シロキサン、ジメチルシロキサン、エチレンオキシド、エチレングリコール、ヒドロキシアルキル-メタクリレート、N-置換アクリルアミド、N-置換メタクリルアミド、N-ビニル-2-ピロリドン、2,4-ペンタジエン-1-オール、ビニルアセテート、アクリロニトリル、スチレン、p-アミノ-スチレン、p-アミノ-ベンジル-スチレン、ナトリウムスチレンスルホネート、ナトリウム2-スルホキシエチルメタクリレート、ビニルピリジン、アミノエチルメタクリレート、2-メタクリロイルオキシ-トリメチルアンモニウムクロリド、およびポリビニリデン、並びに多官能価架橋モノマー、例えば、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、エチレングリコールジメタクリレート、2,2'-(p-フェニレンジオキシ)-ジエチルジメタクリレート、ジビニルベンゼン、トリアリルアミン、およびメチレンビス-(4-フェニル-イソシアネート)、およびそれらの組合せから調製した生体適合性合成ポリマーまたはコポリマーが好ましい。好ましいポリマーとしては、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート、ポリシロキサン、ポリジメチルシロキサン、ポリ乳酸、ポリ( $\epsilon$ -カプロラクトン)、エポキシ樹脂、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレングリコール)、およびポリアミド(ナイロン)ポリマーが挙げられる。好ましいコポリマーとしては、下記の:ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル-ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン-ポリアクリロニトリルおよびポリd-1,ラクチドコ-グリコリドポリマーが挙げられる。好ましいコポリマーは、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリルである。他の適当な生体適合性モノマーおよびポリマーは、一旦本発明の開示で補強されれば、当業者には実際に明らかになるであろう。

#### 【0118】

上記のように、本発明の脂質組成物は、好ましくはガスまたはガス状前駆体をも含んでなる。ガスは、望ましくは脂質組成物に、特にガスが小胞中に取り込まれている小胞組成物に関して反射力を高めることができる。これにより、それらのコントラスト剤としての有効性を増加することができる。

#### 【0119】

好ましいガスは、不活性で且つ生体適合性、すなわち、生物学的機能を損なわないガスである。好ましいガスとしては、空気、希ガス、例えば、ヘリウム、ルビジウム、超分極したキセノン、超分極したアルゴン、超分極したヘリウム、ネオン、アルゴンおよびキセノン、二酸化炭素、窒素、フッ素、酸素、硫黄を基剤としたガス、例えば、六フッ化硫黄および四フッ化硫黄、フッ素化ガス、例えば、部分フッ素化ガスまたは完全フッ素化ガスなどからなる群から選択されるものが挙げられる。典型的なフッ素化ガスとしては、フッ化炭素ガス、例えば、ペルフルオロカーボンガス、およびそれらの混合物が挙げられる。1702のような常磁性ガスを、脂質組成物に用いることもできる。

## 【0120】

好ましい態様では、ガスはフッ素化ガスを含んでなる。このようなフッ素化ガスとしては、1以上のフッ素原子を含む材料が挙げられる。1を上回る数のフッ素原子を含むガスが好ましく、ペルフルオロカーボン(すなわち、完全にフッ素化したフッ化炭素)が一層好ましい。好ましくは、ペルフルオロカーボンガスは、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、およびそれらの混合物からなる群から選択される。更に好ましくは、ペルフルオロカーボンガスは、ペルフルオロプロパンまたはペルフルオロブタンであり、ペルフルオロブタンが特に好ましい。もう一つの好ましいガスは、六フッ化硫黄である。更にもう一つの好ましいガスは、1,1,1,2,3,3,3-ヘptaフルオロプロパンおよびその異性体である1,1,2,2,3,3,3-ヘptaフルオロプロパンなどのヘptaフルオロプロパンである。mixtures of異なる種類のガスの混合物、例えば、ペルフルオロカーボンガスと別の種類のガス、例えば、空気との混合物を本発明の組成物で用いることもできる。上記ガスなどの他のガスは、本発明の開示に基づいて当業者には容易に明らかになるであろう。

10

## 【0121】

ある種の好ましい態様では、ガス、例えば、空気またはペルフルオロカーボンガスを、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘブタン、ペルフルオロオクタン、ペルフルオロノナン、ペルフルオロオクチル-プロミド(PF0B)、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロドデカリン、ペルフルオロオクチルヨーダイド、ペルフルオロトリプロピルアミンおよびペルフルオロトリブチルアミンのような液体ペルフルオロカーボンと組み合わせる。

20

## 【0122】

脂質組成物において、前駆体をガス状物質に組込むことが望ましいこともある。このような前駆体としては、イン・ビボでガスに転換することができる材料が挙げられる。好ましくは、ガス状前駆体は生体適合性であり、イン・ビボで生成したガスは生体適合性でもある。

## 【0123】

本明細書に記載の組成物で用いるのに適当なガス状前駆体は、pHに感受性の薬剤である。これらの薬剤としては、例えば、中性または酸性のpHに暴露するときにガスを生成することができる材料が挙げられる。このようなpH感受性薬剤の例としては、無機酸、有機酸およびそれらの混合物からなる群から選択される酸の塩が挙げられる。炭素酸( $H_2CO_3$ )は適当な無機酸の例であり、アミノマロン酸は適当な有機酸の例である。無機および有機酸などの他の酸は、本発明の開示に基づいて当業者には容易に明らかになるであろう。

30

## 【0124】

塩から誘導されるガス状前駆体は、好ましくはアルカリ金属塩、アンモニウム塩、およびそれらの混合物からなる群から選択される。更に好ましくは、この塩は、炭酸塩、重炭酸塩、セスキカーボネート、アミノマロネートおよびそれらの混合物からなる群から選択される。

## 【0125】

塩から誘導される適当なガス状前駆体材料の例としては、例えば、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸リチウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム、重炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム、セスキ炭酸アンモニウム、セスキ炭酸ナトリウム、アミノマロン酸ナトリウム、およびアミノマロン酸アンモニウムが挙げられる。アミノマロン酸塩は当該技術分野で周知であり、その調製は、例えば、Thanassi, Biochemistry, Vol. 9, no. 3, pp. 525-532 (1970); Fitzpatrick et al., Inorganic Chemistry, Vol. 13, no. 3 pp. 568-574 (1974); および Stelmashok et al., Koordinatsionnaya Khimiya, Vol. 3, no. 4, pp. 524-527 (1977)に記載されている。これらの公表文献の開示内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

40

## 【0126】

50

pHの変化に感受性であることの他にまたはこれに代えて、ガス状前駆体材料は温度の変化に感受性の化合物を含んでなることもできる。温度の変化に感受性の適当なガス状前駆体の例は、ペルフルオロカーボンである。当業者であれば理解されるように、脂質組成物を最初に作製するときには特定のペルフルオロカーボンは液体状態で存在することができ、従って、ガス状前駆体として用いられる。あるいは、脂質組成物を作製するときには、ペルフルオロカーボンはガス状状態で存在することができ、従って、ガスとして直接用いられる。ペルフルオロカーボンが液体またはガスとして用いられるかどうかは、一般にその液/気相遷移温度または沸点によって変化する。例えば、好ましいペルフルオロカーボンであるペルフルオロペンタンは液/気相遷移温度(沸点)が29.5 である。これは、ペルフルオロペンタンが、一般に室温(約25 )では液体であるが、正常温度が37 であり、ペルフルオロペンタンの遷移温度より高いヒトの体内では気体に転換することを意味している。従って、正常環境下では、ペルフルオロペンタンはガス状前駆体である。もう一つの例として、ペルフルオロペンタンの同族体であるペルフルオロブタンおよびペルフルオロヘキサンがある。ペルフルオロブタンの液/気相遷移は4 であり、ペルフルオロヘキサンのそれは57 である。従って、ペルフルオロブタンはガス状前駆体として有用であるが、ガスとしての方が一層適当であるのに対して、ペルフルオロヘキサンはその沸点が比較的高いのでガス状前駆体として用いることができる。当業者には知られているように、物質の有効沸点は、物質が暴露される圧力に関係することがある。この関係は、理想気体法則  $PV = nRT$  (式中、Pは圧力であり、Vは体積であり、nは物質のモル数であり、Rは気体定数であり、Tは温度である)によって示される。理想気体法則は、圧力が増加すると、有効沸点も増加することを示している。逆に、圧力が減少すると、有効沸点は減少する。

10

20

## 【 0 1 2 7 】

様々な材料を、本発明の組成物でガス状前駆体として用いることができる。材料は適当な温度中を通過する際にガス相に相遷移を行うことができることだけが必要である。適当なガス状前駆体としては、例えば、ヘキサフルオロアセトン、イソプロピルアセチレン、アレン、テトラフルオロアレン、三フッ化ホウ素、1,2-ブタジエン、2,3-ブタジエン、1,3-ブタジエン、1,2,3-トリクロロ-2-フルオロ-1,3-ブタジエン、2-メチル-1,3-ブタジエン、ヘキサフルオロ-1,3-ブタジエン、ブタジイン、1-フルオロブタン、2-メチルブタン、ペルフルオロブタン、1-ブテン、2-ブテン、2-メチル-1-ブテン、3-メチル-1-ブテン、ペルフルオロ-1-ブテン。ペルフルオロ-2-ブテン、4-フェニル-3-ブテン-2-オン、2-メチル-1-ブテン-3-イン、ブチルナイトレート、1-ブチン、2-ブチン、2-クロロ-1,1,1,4,4,4-ヘキサフルオロブチン、3-メチル-1-ブチン、ペルフルオロ-2-ブチン、2-プロモ-ブチラルデヒド、硫化カルボニル、クロトノニトリル、シクロブタン、メチルシクロブタン、オクタフルオロシクロブタン、ペルフルオロシクロブテン、3-クロロシクロペンテン、ペルフルオロシクロ-ペンタン、オクタフルオロシクロ-ペンテン、シクロプロパン、ペルフルオロシクロプロパン、1,2-ジメチル-シクロプロパン、1,1-ジメチル-シクロプロパン、1,2-ジメチルシクロプロパン、エチルシクロプロパン、メチルシクロプロパン、ジアセチレン、3-エチル-3-メチルジアジリジン、1,1,1-トリフルオロジアゾエタン、ジメチルアミン、ヘキサフルオロジメチルアミン、ジメチルエチルアミン、ビス(ジメチルホスフィン)-アミン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘブタン、ペルフルオロオクタン、2,3-ジメチル-2-ノルボルナン、ペルフルオロジメチルアミン、ジメチルオキシニウムクロリド、1,3-ジオキソラン-2-オン、4-メチル-1,1,1,2-テトラフルオロエタン、1,1,1-トリフルオロエタン、1,1,2,2-テトラフルオロエタン、1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタン、1,1-ジクロロエタン、1,1-ジクロロ-1,2,2,2-テトラフルオロエタン、1,2-ジフルオロエタン、1-クロロ-1,1,2,2,2-ペンタフルオロエタン、2-クロロ-1,1-ジフルオロエタン、1,1-ジクロロ-2-フルオロエタン、1-クロロ-1,1,2,2-テトラフルオロエタン、2-クロロ-1,1-ジフルオロエタン、クロロエタン、クロロペンタフルオロエタン、ジクロロトリフルオロエタン、フルオロエタン、ペルフルオロエタン、ニトロペンタフルオロエタン、ニトロソペンタフルオロエタン、ペルフルオロエチルアミン、エチルビニルエーテル、1,1-ジクロロエタン、1,1-ジクロロ-1,2-ジフルオロエタン、1,2-ジフルオロエタン

30

40

50

、メタン、トリフルオロメタンスルホニルクロリド、トリフルオロメタンスルホニルフルオロリド、プロモジフルオロニトロソメタン、プロモフルオロメタン、プロモクロロフルオロメタン、プロモトリフルオロメタン、クロロジフルオロニトロメタン、クロロジニトロメタン、クロロフルオロメタン、クロロトリフルオロメタン、クロロジフルオロメタン、ジプロモジフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロフルオロメタン、ジフルオロメタン、ジフルオロヨードメタン、ジシラノメタン、フルオロメタン、ヨードメタン、ヨードトリフルオロメタン、ニトロトリフルオロメタン、ニトロソトリフルオロメタン、テトラフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、トリフルオロメタン、2-メチルブタン、メチルエーテル、メチルイソプロピルエーテル、酢酸メチル、亜硝酸メチル、硫化メチル、メチルビニルエーテル、ネオペンタン、亜酸化窒素、1,2,3-ノナデカン-トリカルボン酸2-ヒドロキシトリメチルエステル、1-ノネン-3-イン、1,4-ペンタジエン、n-ペンタン、ペルフルオロペンタン、4-アミノ-4-メチルペンタン-2-オン、1-ペンテン、2-ペンテン(シスおよびトランス)、3-プロモペンタ-1-エン、ペルフルオロペンタ-1-エン、テトラクロロフタル酸、2,3,6-トリメチル-ピペリジン、プロパン、1,1,1,2,2,3-ヘキサフルオロプロパン、1,2-エポキシプロパン、2,2-ジフルオロ-プロパン、2-アミノプロパン、2-クロロプロパン、ヘプタフルオロ-1-ニトロプロパン、ヘプタフルオロ-1-ニトロソプロパン、ペルフルオロプロパン、プロペン、ヘキサフルオロプロパン、1,1,1,2,3,3-ヘキサフルオロ-2,3-ジクロロプロパン、1-クロロプロパン、クロロプロパン-(トランス)、2-クロロプロパン、3-フルオロプロパン、プロピン、3,3,3-トリフルオロプロピン、3-フルオロスチレン、サルファー(ジ)-デカフルオリド( $S_2F_{10}$ )、2,4-ジアミノトルエン、トリフルオロアセトニトリル、トリフルオロメチルペルオキシド、トリフルオロメチルスルフィド、タングステンヘキサフルオリド、ビニルアセチレン、およびビニルエーテルが挙げられる。

10

20

30

40

#### 【0128】

ペルフルオロカーボンは、本発明の方法で用いられる組成物に関して用いる好ましいガスおよび好ましいガス状前駆体である。このようなペルフルオロカーボンとしては、飽和ペルフルオロカーボン、不飽和ペルフルオロカーボン、および環状ペルフルオロカーボンが挙げられる。飽和ペルフルオロカーボンは通常好ましいものであり、式 $C_nF_{2n+2}$ を有する。好ましい態様では、ガスまたはガス状前駆体は、1-約12の炭素原子、好ましくは約2-約10の炭素、更に好ましくは約3-約8の炭素、更に一層好ましくは約3-約6の炭素を有するペルフルオロカーボン(およびその範囲の総ての組合せおよび下位組合せ)である。適当なペルフルオロカーボンとしては、例えば、ペルフルオロメタン、ペルフルオロエタン、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサン、ペルフルオロヘプタン、ペルフルオロオクタン、ペルフルオロノナン、ペルフルオロデカン、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロウンデカンおよびペルフルオロドデカン、およびそれらの混合物が挙げられる。好ましくは、ペルフルオロカーボンは、ペルフルオロプロパン、ペルフルオロブタン、ペルフルオロシクロブタン、ペルフルオロペンタン、ペルフルオロヘキサンおよびペルフルオロオクタンからなる群から選択され、ペルフルオロブタンが特に好ましい。式 $C_nF_{2n}$ (式中、nは約3-約8であり、好ましくは約3-約6である)を有する環状ペルフルオロカーボンも好ましく、例えば、ヘキサフルオロシクロプロパン、オクタフルオロシクロブタン、およびデカフルオロシクロペンタンが挙げられる。

#### 【0129】

ペルフルオロカーボンの他に、完全にはフッ素化されていない安定なフッ化炭素を用いるのが望ましいことがある。このようなフッ化炭素としては、ヘプタフルオロプロパン、例えば、1,1,1,2,3,3,3-ヘプタフルオロプロパンおよびその異性体である1,1,2,2,3,3,3-ヘプタフルオロプロパンが挙げられる。

#### 【0130】

ガス状前駆体材料は、ジアゾニウムイオンおよびアミノマロネートのような光活性化材料であってもよい。以下において更に詳細に説明するように、ある種の脂質および/また

50

は小胞組成物、特に小胞組成物は、ターゲット組織でまたは脂質組成物に音を作用させることによってガスが形成されるように処方することができる。ガス状前駆体の例は、例えば、米国特許第5,088,499号明細書および5,149,319号明細書に記載されており、その内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。上記で示したものの以外の他のガス状前駆体は、本発明の開示に基づいて当業者には容易に明らかになるであろう。

#### 【0131】

ガス状物質および/またはガス状前駆体は、好ましくは組成物の物理的性質には関係なく脂質および/または小胞組成物に組込まれる。従って、ガス状物質および/またはその前駆体は、例えば、脂質がランダムに凝集する脂質組成物並びに脂質から処方される小胞組成物を含むミセルおよびリポソームのような小胞組成物に組込むことができると思われる。ガス状物質および/またはその前駆体の脂質および/または小胞組成物への組込みは、多数のポリのいずれかを用いて行うことができる。例えば、脂質を基剤とする小胞の場合には、ガスを満たした小胞は、ガスまたはガス状前駆体と1以上の脂質を含んでなる水性混合物を振盪または攪拌することによって形成することができる。これにより、ガスまたはガス前駆体をカプセル化した安定化した小胞の形成が促進される。

#### 【0132】

更に、ガスを脂質および/または小胞形成化合物の水性混合物に直接通じることができ、あるいは、例えば、米国特許第5,352,435号明細書および5,228,446号明細書に開示されているように、ガス滴下法を用いることもでき、上記明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。ガスまたはガス前駆体をカチオン性脂質組成物に組込むための適当な方法は、米国特許第4,865,836号明細書にも開示されており、上記明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。他の方法は、本発明の開示に基づけば当業者には明らかであろう。好ましくは、ガスは、安定化材料の添加後または中、および/または小胞の形成中に脂質および/または小胞組成物に滴下することができる。

#### 【0133】

好ましい態様では、ガス状物質および/またはガス状前駆体材料が小胞組成物に組込まれ、ミセルおよびリポソームが好ましい。以下において詳細に説明するように、ガスまたはガス状前駆体または両方がカプセル化されている小胞は、イン・ビボでの反射率が向上する点において有利である。

#### 【0134】

以後において詳細に説明するように、脂質組成物、特に小胞組成物を、脂質および任意の安定化化合物から処方して、安定な小胞の形成を促進するのが好ましい。更に、脂質および/または小胞組成物が極めて安定なガスを含んでなることも同様に好ましい。「極めて安定なガス」という用語は、水性媒質中の溶解度および拡散性が限定されているガスを表す。典型的な極めて安定なガスとしては、一般に拡散性が小さく且つ水性媒質では比較的不溶性であることからペルフルオロカーボンが挙げられる。従って、それらを用いることによって、極めて安定な小胞の形成を促進することができる。

#### 【0135】

ある種の態様では、フッ素化合物、特にペルフルオロカーボン化合物であって、脂質および/または小胞組成物の使用温度、例えば、人体のイン・ビボ温度では液体状態であり、脂質および/または小胞組成物、特にガスを満たした小胞の安定性を補助しまたは高めることができるものを用いるのが望ましいことがある。適当なフッ素化合物としては、例えば、ZONYL(登録商標)界面活性剤(the DuPont Company, Wilmington, DE)として市販されているフッ素化界面活性剤、並びに液状のペルフルオロカーボン、例えば、ペルフルオロオクチルブロミド(PFOB)、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロドデカリン、ペルフルオロオクチルヨウダイド、ペルフルオロトリプロピルアミン、およびペルフルオロトリブチルアミンのようなフッ素化界面活性剤が挙げられる。一般に、約6以上の炭素原子を含んでなるペルフルオロカーボンは、正常な人体温度で液体である。これらのペルフルオロカーボンの中、室温で液体のペルフルオロオクチルブロミドおよびペルフルオロヘキ

10

20

30

40

50

サンが好ましい。存在するガスは、例えば、窒素またはペルフルオロプロパンでよく、またはガス状前駆体であって、ペルフルオロカーボン、例えば、ペルフルオロペンタンでもよいものから誘導することができる。後者の場合に、脂質および/または小胞組成物は、所定の例について、ペルフルオロプロパン(ガス)またはペルフルオロペンタン(ガス状前駆体)およびペルフルオロオクチルブロミド(液体)であるペルフルオロカーボンの混合物から調製することができる。いかなる理論または操作の理論によって束縛しようとするものではないが、小胞組成物の場合には、液体フッ素化合物は、ガスと小胞の膜または壁の間の界面に配置することができると思われる。従って、小胞を形成するのに用いる生体適合性脂質のような安定化化合物の内面に液体フッ素化合物の更なる安定化相を形成させることができ、このペルフルオロカーボン層はまた小胞膜を通してガスが拡散するのを防止することもできる。本発明に関しては、ガス状前駆体は製造および/または保管の温度では液体であるが、少なくとも使用時または中にはガスになる。

#### 【0136】

従って、ペルフルオロカーボンのような液体フッ素化合物を、通常は本明細書に記載の脂質および/または小胞組成物を作製する目的で用いられるガスまたはガス状前駆体と組み合わせると、ガスまたはガス状前駆体のみでは得ることができない安定性の程度を高めることができることを見出した。従って、ペルフルオロカーボンガス状前駆体、例えば、ペルフルオロペンタンのようなガスまたはガス状前駆体を、患者に投与した後に液状のままである、すなわち、その液-気相遷移温度が患者の体温より高い、ペルフルオロオクチルブロミドのようなペルフルオロカーボンと共に用いることは、本発明の範囲内にある。ZONYL(登録商標)フッ素化界面活性剤のようなペルフルオロ界面活性剤を用いて、脂質および/または小胞組成物を安定化し、小胞のコーティングとして作用することができる。好ましいペルフルオロ界面活性剤は、部分的にフッ素化したホスホコリン界面活性剤である。これらの好ましいフッ素化界面活性剤では、2種類のアルキル化合物を末端アルキル鎖でフッ素化し、基部の炭素を水素化することができる。これらのフッ素化ホスホコリン界面活性剤を、本発明のターゲティングした脂質および/または小胞組成物の作製に用いることができる。

#### 【0137】

小胞組成物を含む態様に関して、小胞の大きさを例えば診断および/または治療用途などの特定の目的とする最終用途に調整することができる。小胞の大きさは、好ましくは直径が約30ナノメートル(nm)-約100マイクロメートル( $\mu\text{m}$ )、およびその範囲の総ての組合せおよび下位組合せの範囲であることができる。更に好ましくは、小胞は直径が約100nm-約10 $\mu\text{m}$ であり、約200nm-約7 $\mu\text{m}$ の直径が更に一層好ましい。特定の用途、例えば、血管系の磁気共鳴画像化などの血管内用途に関しては、小胞の直径が約30 $\mu\text{m}$ 以下であるのが好ましいことがあり、小さめの小胞、例えば直径が約12 $\mu\text{m}$ 以下の小胞が好ましい。ある種の好ましい態様では、小胞の直径は約7 $\mu\text{m}$ 以下であり、平均直径が約5 $\mu\text{m}$ 以下の小胞が一層好ましく、平均直径が約3 $\mu\text{m}$ 以下の小胞が更に一層好ましい。これらの小さめの小胞は微小血管系のような小さな血管チャンネルを灌流することができ、同時に血管チャンネル内に赤血球が小胞を滑り抜けるのに十分な空間または余地を提供することができる。

#### 【0138】

ガスを満たした小胞の大きさは、所望ならば、例えば、振盪、微小乳化、渦流攪拌、押出し、濾過、音波処理、均質化、反復凍結融解サイクル、規定した大きさの細孔からの圧力での押出し、および同様な方法などの様々な処置によって調整することができる。

#### 【0139】

上記のように、本明細書で用いられる組成物は、それらの調製、形成および使用に関して、温度、pH、光、およびエネルギー(例えば、超音波)によって液体または固体状態からガスへ変化するように活性化することができるガス状前駆体を含むこともできる。ガス状前駆体は、前駆体を減圧で保管することによってガスにすることができる。例えば、減圧で保管したバイアルは、投与前に予備成形したガス生成するのに有用なペルフルオロペンタンまたはペルフルオロヘキサンガスを生成することができる。好ましくは、ガス状前駆

体は、温度によって活性化することができる。下記に、正常体温(37℃)以下に比較的近くで液体からガス状状態への相遷移を行う一連のガス状前駆体、および10μmの最小サイズの小胞を形成するのに必要な乳化した液滴の大きさを示す表を示す。

【0140】

【表2】

表2

ガス状前駆体の物性および10μmの小胞を形成ための乳化液滴の直径\*

化合物	分子量	沸点(°C)	密度	10μmの小胞を形成ための乳化液滴の直径
ペルフルオロペンタン	288.04	28.5	1.7326	2.9
1-フルオロブタン	76.11	32.5	0.67789	1.2
2-メチルブタン(イソペンタン)	72.15	27.8	0.6201	2.6
2-メチル-1-ブテン	70.13	31.2	0.6504	2.5
2-メチル-2-ブテン	70.13	38.6	0.6623	2.5
1-ブテン-3-イン-2-メチル	66.10	34.0	0.6801	2.4
3-メチル-1-ブチン	68.12	29.5	0.6660	2.5
オクタフルオロシクロブタン	200.04	-5.8	1.48	2.8
デカフルオロブタン	238.04	-2	1.517	3.0
ヘキサフルオロエタン	138.01	-78.1	1.607	2.7

\* 供給元: Chemical Rubber Company Handbook of Chemistry and Physics, Robert C. Weast and David R. Lide監修, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida (1989-1990).

【0141】

上記のように、ペルフルオロカーボン、ガスまたはガス状前駆体、並びに追加安定化成分として用いるのに好ましい。

【0142】

上記のように、限定された溶解度のガスを用いることによって脂質および/または小胞組成物、特に脂質から処方された小胞組成物の有用性を最適にするのが好ましい。「限定された溶解度」という用語は、ガスが周囲の水性媒質中の溶解度により小胞から拡散する能力を表す。水性媒質での溶解度が大きくなれば、小胞中のガスにグラディエントが生じ、ガスが小胞から拡散しやすくなることがある。一方、水性媒質での溶解度が小さくなれば、小胞と界面の間のグラディエントが減少しまたはなくなり、小胞からのガスの拡散が妨げられることがある。好ましくは、小胞に取り込まれているガスは、溶解度が酸素より小さく、すなわち、約1部のガス/約32部の水である。Matheson Gas Data Book, 1966, Matheson Company Incを参照されたい。更に好ましくは、小胞に取り込まれているガスは、水への溶解度が空気より小さく、更に一層好ましくは、小胞に取り込まれているガスは、水への溶解度が窒素より小さい。

【0143】

ある態様では、小胞を、実質的に不透過性ポリマー材料などのポリマー材料から処方するのが望ましいことがある。これらの態様では、極めて不溶性でもあるガスを用いることは一般に必要な。例えば、実質的に不透過性ポリマー材料を含んでなる安定な小胞組成物は、溶解度が一層高いガス、例えば、空気または窒素を用いて処方することができる。

【0144】

上記の脂質および/またはポリマー化合物の他にまたはこれに代えて、本明細書に記載の組成物は1以上の安定化材料を含んでなることができる。このような安定化材料の例は、例えば、生体適合性ポリマーである。安定化材料を用いて、小胞の形成を補助し、および/またはガスまたはガス状前駆体の実質的なカプセル化を確保することができる。ペルフルオロプロパンまたは六フッ化硫黄のような比較的不溶性の非拡散性ガスについても、

1以上の安定化材料をガスおよびガス状前駆体を満たした小胞の形成に用いるときには、改良された小胞組成物を得ることができる。これらの化合物は、小胞の大きさ、形状および/または他の属性に関して安定性および完全な状態の向上を助けることができる。

【0145】

本明細書で用いられる「安定な」または「安定化した」という用語は、小胞が、有用な期間、分解、例えば小胞構造またはカプセル化したガスまたはガス状前駆体の喪失などに実質的に耐性を有することがあることを意味する。典型的には、本発明で用いられる小胞は所望な保管寿命を有し、通常の周囲条件では少なくとも約2-3週間の期間その元の構造の少なくとも約90容積%を保持することが多い。好ましい形態では、小胞は、望ましいことには少なくとも約1ヶ月、更に好ましくは、少なくとも約2ヶ月間、更に一層好ましくは少なくとも約6ヶ月間、更に一層好ましくは約18ヶ月間、更に一層好ましくは約3年まで安定である。ガスおよびガス状前駆体を満たした小胞などの本明細書に記載の小胞は、通常の周囲条件下で体験したものより高いまたは低い温度および圧力のような不利な条件下であっても安定であることができる。

10

【0146】

本明細書に記載の小胞の安定性は、少なくとも部分的には例えば、上記の脂質および/またはポリマーなど小胞が作られる材料にあるとすることができ、また追加安定化材料を用いる必要はないことが多いが、これは任意であり且つこれを用いることが好ましいことがある。このような追加安定化材料およびそれらの特徴は、以後に詳細に説明する。

【0147】

小胞を構成する材料は、好ましくは生体適合性脂質またはポリマー材料であり、これらの中、生体適合性脂質が好ましい。更に、投与の直前に小胞を調製することができるなど処方容易であるため、これらの小胞は好都合に部位に作製することができる。

20

【0148】

ガスおよびガス状前駆体を満たした小胞を調製するための安定化材料として有用な生体適合性ポリマー天然、半合成(修飾された天然)または合成起源のものでよい。本明細書で用いられるポリマーという用語は、2種類以上の反復モノマー単位、および好ましくは10以上の反復モノマー単位から構成される化合物を表す。本明細書で用いられる半合成ポリマー(または修飾した天然ポリマー)は、ある種のやり方で化学的に修飾した天然ポリマーを表す。本発明で用いるのに適当な典型的な天然ポリマーとしては、天然に存在する多糖類が挙げられる。このような多糖類としては、例えば、アラビナン、フルクタン、フカン、ガラクトン、ガラクトツロナン、グルカン、マンナン、キシラン(例えば、イヌリン)、レバン、フコイダン、カラゲナン、ガラクトカロロース、ペクチン酸、ペクチン、例えば、アミロース、ブルラン、グリコーゲン、アミロペクチン、セルロース、デキストラン、デキストリン、デキストロース、ポリデキストロース、パスツラン、キチン、アガロース、ケラタン、コンドロイタン、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンタンガム、澱粉、および様々な他の天然ホモポリマーまたはヘテロポリマー、例えば、1以上の下記のアルドース、ケトース、酸またはアミン、すなわち、エリトロース、トレオース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、エリトルロース、リブロース、キシルロース、プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、マルトース、セロピオース、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、ヒスチジン、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクトツロン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、およびノイラミン酸、および天然に存在するそれらの誘導体を含むものが挙げられる。従って、適当なポリマーとしては、例えば、アルブミンのようなタンパク質が挙げられる。典型的な半合成ポリマーとしては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、およびメトキシセルロースが挙げられる。本発明で用いるのに適当な典型的な合成ポリマーとしては、ポリエチ

30

40

50

レン(例えば、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン、およびポリエチレンテレフタレート)、ポリプロピレン(例えば、ポリプロピレングリコール)、ポリウレタン(例えば、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルクロリドおよびポリビニルピロリドン、ナイロンなどのポリアミド、ポリスチレン、ポリ乳酸、フッ素化炭化水素、フッ素化炭素(例えば、ポリテトラフルオロエチレン)、およびポリメチルメタクリレート、およびそれらの誘導体が挙げられる。ポリマーを安定化化合物として用いる小胞の製造方法は、本発明の開示内容をUnger, 米国特許第5,205,290号明細書に記載されているおよびこれに引用されているような当該技術分野で知られている情報と結合すると、本発明の開示内容を理解してしまえば、当業者には容易に明らかになるであろう。上記明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

10

## 【0149】

本発明の特に好ましい態様は、3成分:(1)中性脂質、例えば、ノニオン性または双性イオン性脂質、(2)負に帯電した脂質、および(3)安定化材料、例えば、親水性ポリマーを担持する脂質を含んでなる小胞を伴うことがある。好ましくは、負に帯電した脂質の量は、存在する総脂質の約1モル%より大きく、親水性ポリマーを担持する脂質の量は、存在する総脂質の約1モル%より大きくなる。典型的且つ好ましい負に帯電した脂質としては、ホスファチジン酸が挙げられる。親水性ポリマーを担持する脂質は、望ましくはポリマーに共有結合した脂質であり、ポリマーは好ましくは重量平均分子量が約400-約100,000である。適当な親水性ポリマーは、好ましくはポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、およびポリビニルピロリドンおよびそのコポリマーからなる群から選択され、PEGポリマーが好ましい。好ましくは、PEGポリマーは分子量が約1000-約7500であり、約2000-約5000の分子量が一層好ましい。PEGまたは他のポリマーを、共有結合、例えば、アミド、カルバメートまたはアミン結合を介して脂質、例えば、DPPEに結合することができる。更に、PEGまたは他のポリマーを、例えば、アミド、エステル、エーテル、チオエステル、チオアミドまたはジスルフィド結合などの共有結合によりターゲティングリガンド、または他のリン脂質に連結することができる。親水性ポリマーがPEGであるときには、このようなポリマーを担持する脂質は「ペジル化(ペジル化)」されていると言われる。好ましい形態では、親水性ポリマーを担持する脂質は、DPPE-PEG、例えば、DPPE-PEG5000であって、重量平均分子量が約5000のポリエチレングリコールポリマーを結合させたDPPEを表す(DPPE-PEG5000)。他の適当なペジル化脂質としては、例えば、DSPE-PEG5000などのジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-ポリエチレングリコール(DSPE-PEG)、ジパルミトイル-グリセロ-スクシネート-ポリエチレングリコール(DPGS-PEG)、ステアリル-ポリエチレングリコールおよびコレステリル-ポリエチレングリコールが挙げられる。

20

30

## 【0150】

本発明のある種の好ましい態様では、脂質組成物は、約77.5モル%のDPPC、12.5モル%のDPPA、および10モル%のDPPE-PEG5000を含むことがある。約80-約90モル%のDPPC、約5-約15モル%のDPPAおよび約5-約15モル%のDPPE-PEG5000を含んでなる組成物も好ましい。特に好ましいものは、DPPC、DPPAおよびDPPE-PEG5000をモル%の比でそれぞれ82:10:8を含んでなる組成物である。ホスファチジル部分は負に帯電し、且つコリン部分は正に帯電している。DPPE-PEGは小胞の脂質膜または皮にDPPE残基によって結合したペジル化材料を提供し、PEG残基は自由に小胞膜または皮を取り巻いており、これにより機能がこのような異物を分解することである身体の様々な酵素的および他の内在性薬剤に対する物理的障壁を形成する。DPPE-PEGは、DPPCおよびDPPAのような他の脂質と所定の比で組み合わせるときに、圧力に対して安全且つ安定なサイズが一層小さな小胞を更に提供することができる。また、ペジル化材料はその構造が水に類似しているため、異物を取り囲んで除去する傾向を有するヒト免疫系のマクロファージの作用をうち負かすことができると理論化されている。その結果、安定化した小胞が診断用画像化コントラスト媒体として機能することができる時間が増加する。

40

50

## 【0151】

小胞組成物は、調製した小胞が本明細書に記載の安定性および他の基準に合うという条件で、上記の材料の他に、他の材料から調製することもできる。これらの材料は基本的且つ基礎的であり、安定化したガスおよびガス状前駆体を満たした小胞を作製しまたは設定するための主要な基礎を形成する。一方、それらは補助的であり、且つ基本的安定化材料または複数の材料の機能を高めることができるまたは基本的安定化材料によって与えられるものの他にある所望な特性に寄与することができる補助または補足的薬剤として作用することができる。

## 【0152】

しかしながら、所定の材料は基本的または補助的薬剤であるかどうかを決定することは、問題の材料が、例えば、安定化した小胞の生成に関して得られた結果によって経験的に決定されるので、常に可能であるとは限らない。これらの基本的小胞および補助的薬剤がどのように機能することができるかの例として、生体適合性脂質と水または食塩水の単純な組合せは、振盪を行うと、殺菌のためのオートクレーブ処理の後に濁った溶液を生じることが多いことが観察されている。このような濁った溶液はコントラスト剤として働くことができるが、美観上は異論があり、未溶解または未分散脂質粒子の形態での不安定性を示唆することがある。濁った溶液は、未溶解粒状物質の直径が約 $7\mu\text{m}$ を上回り、特に約 $10\mu\text{m}$ を上回る場合には、望ましくないこともある。滅菌濾過のような製造段階も、未溶解粒状物質を含む溶液では問題となることがある。従って、プロピレングリコールを加えて、脂質粒子の分散または溶解を促進することによってこの濁りを除去することができる。プロピレングリコールは、小胞膜または皮上の表面張力を増加させることによって小胞形成および安定化を向上することができる湿潤剤として働くこともできる。プロピレングリコールは、小胞の膜または皮をコーティングすることによって追加安定化を提供する追加層として働くこともできる。このような更に基本的または補助的安定化材料の例としては、用いることができる通常の界面活性剤がある。D'Arrigo, 米国特許第4,684,479号明細書および5,215,680号明細書を参照されたい。

## 【0153】

追加の補助的および基本的安定化材料としては、落花生油、カノーラ油、オリーブ油、ベニバナ油、トウモロコシ油、または摂取可能であることが一般に知られている任意の他の油であって、本明細書の教示に従って安定化化合物として用いるのに適当な薬剤が挙げられる。様々な補助的および基本的安定化材料は、例えば、Unger, 米国特許第5,736,121号明細書に開示されており、上記明細書の開示内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

## 【0154】

更に、混合ミセル系を作製するのに用いる化合物は基本的または補助的安定化材料として用いるのに適当であることがあり、これらとしては、例えば、ラウリルトリメチルアンモニウムプロミド(ドデシル-)、セチルトリメチルアンモニウムプロミド(ヘキサデシル-)、ミリスチルトリメチルアンモニウムプロミド(テトラデシル-)、アルキルジメチル-ベンジルアンモニウムクロリド(但し、アルキルは $C_{12}$ 、 $C_{14}$ または $C_{16}$ )、ベンジルジメチルドデシル-アンモニウムプロミド/クロリド、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムプロミド/クロリド、ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムプロミド/クロリド、セチルジメチルエチルアンモニウムプロミド/クロリド、またはセチルピリジニウムプロミド/クロリドが挙げられる。

## 【0155】

本発明で用いられるガスおよびガス状前駆体を満たした小胞は、本明細書に記載の様々な追加または補助的安定化材料の中から選択することによって、大きさ、溶解度および熱安定性に従って制御することができる。これらの材料は、膜とのそれらの物理的相互作用によるだけでなく、ガスおよびガス状前駆体を満たした小胞の表面の粘度および表面張力を修正するそれらの能力によって、小胞、特に脂質から処方した小胞のこれらのパラメーターに影響を与えることができる。従って、本発明で用いられるガスおよびガス状前駆体

を満たした小胞は、例えば、1以上の様々な(a)粘度調節剤、例えば、炭水化物およびそれらのホスホリル化およびスルホン化誘導体；ポリエーテルであって、好ましくは分子量が400-100,000の範囲であるもの；およびジ-およびトリヒドロキシアールカンおよびそれらのポリマー、好ましくは分子量が200-50,000の範囲のもの；(b)乳化および/または可溶化剤、例えば、アラビアゴム、コレステロール、ジエタノールアミン、グリセリルモノステアレートのようなステアリン酸塩、ラノリンアルコール、レシチン、モノ-およびジ-グリセリド、モノ-エタノールアミン、オレイン酸、オレイルアルコール、ポロキサマー188、ポロキサマー184、およびポロキサマー181などのポロキサマー、ポロキサミン、ポリオキシエチレン50ステアレート、ポリオキシシル35ヒマシ油、ポリオキシシル10オレイルエーテル、ポリオキシシル20セトステアリルエーテル、ポリオキシシル40ステアレート、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80、プロピレングリコールジアセテート、プロピレングリコールモノステアレート、ナトリウムラウリルスルフェート、ナトリウムステアレート、ソルビタンモノ-ラウレート、ソルビタンモノ-オレエート、ソルビタンモノ-パルミテート、ソルビタンモノステアレート、ステアリン酸、トロラミン、パルミテール(palmitates)、および乳化ワックス；(c)懸濁および/または増粘剤、例えば、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、アルミニウムモノ-ステアレート、ベントナイト、マグマ、カルボマー934P、カルボキシメチルセルロース、カルシウムおよびナトリウムおよびナトリウム12、カラゲナン、セルロース、デキストラン、ゼラチン、グーアガム、イナゴマメゴム、ビーガム(veegum)、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マグネシウム-アルミニウム-シリケート、Zeolites(登録商標)、メチルセルロース、ペクチン、ポリエチレンオキシド、ポピドン、プロピレングリコールアルギネート、二酸化ケイ素、ナトリウムアルギネート、トラガカントガム、キサンタンガム、 $\beta$ -D-グルコノラクトン、グリセロールおよびマンニトール；(d)合成懸濁剤、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリプロピレングリコール(PPG)、およびポリソルベート；および(e)安定化を行い且つ張度を加える張度上昇剤、例えば、ソルビトール、マンニトール、トレハロース、スクロース、プロピレングリコールおよびグリセロールを加えることによって、好ましく修正し且つ更に安定化することができる。

#### 【0156】

上記のように、本発明の組成物は、更に1以上のターゲッティングリガンドを含んでなる。本発明の組成物組込むことができるターゲッティングリガンドは、好ましくは受容体および/または組織をイン・ビボでターゲッティングすることができる物質である。上記のように、組織のターゲッティングに関しては、本明細書に記載のターゲッティングリガンドは、望ましくは血管斑に関連した細胞または受容体をターゲッティングすることができる。従って、本発明の方法および組成物を有利に用いて診断薬で斑をターゲッティングすることにより、斑の検出並びに血管における病変の特性決定を向上させることができる。これらの薬剤はある種の斑に優先的に蓄積することができるので、本発明を用いて、表面に塞栓を形成しまたは血栓を形成する前に危険な斑の検出を容易にすることができる。これに関して、一層危険な斑は、斑を含む活動性炎症になりやすい。これは、活動性斑におけるマクロファージのような炎症性細胞の存在によって明らかにすることができる。このような炎症性細胞を欠いている不活性斑は危険性が余り高くないことがあり、本発明の方法および組成物を用いてこれらの異なる斑の識別を容易にし、一層危険性のある病変を治療することができる。

#### 【0157】

好ましい態様では、本発明の方法および組成物に用いられるターゲッティングリガンドは、酸残基、すなわち水に溶解したときに水素イオンを生じることができ、水素原子を金属または塩基性ラジカルによって置換することができ、または塩基と反応して塩と水を形成する残基を含んでなる材料である。このような残基としては、例えば、カルボン酸残基(-COOH)、リン酸残基(-P(O)(OH)<sub>3</sub>)、スルホン酸残基(-SO<sub>2</sub>OH)などが挙げられる。好ましい態様では、ターゲッティングリガンドは酸残基を含む脂質の形態であり、酸残基を含む

リン脂質が一層好ましい。酸性残基を含むリン脂質であって、本発明の組成物にターゲットングリガンドとして用いることができるものは、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、およびホスファチジルイノシトールが好ましい。

【0158】

酸性リン脂質(すなわち、酸残基を含むリン脂質)を含む態様に関しては、リン脂質は、好ましくは少なくとも1個の無極性脂肪族鎖を含んでなる。単一脂肪族鎖を有するリン脂質の形態のターゲットングリガンドは、本明細書では「単鎖リン脂質」と呼ばれる。ある種の他の好ましい態様では、リン脂質の形態のターゲットングリガンドは、1を上回る、好ましくは少なくとも2または3個の無極性脂肪族鎖を含んでなる。このような化合物を、本明細書では「ポリ鎖リン脂質」と呼ぶ。

10

【0159】

好ましい態様では、本発明の組成物は、ポリ鎖リン脂質化合物の形態のターゲットングリガンドを含んでなり、二鎖リン脂質(すなわち、2本の無極性脂肪族鎖を有するリン脂質)が好ましい。更に好ましくは、ターゲットングリガンドは、ジアシルリン脂質であって、それぞれのアシル基の炭素数が例えば、約10-約20(およびその炭素数の範囲および特定の数の総ての組合せおよび下位組合せ)の範囲であることができるものを含んでなる。好ましい形態では、アシル基は約16または約17個の炭素を含む。更に一層好ましくは、本発明の組成物は、ジパルミトイルホスファチジン酸であるホスファチジン酸、ジパルミトイルホスファチジル-セリン(DPPS)であるホスファチジルセリン、またはジパルミトイルホスファチジルイノシトールであるホスファチジルイノシトールを含んでなり、酸性残基によってターゲットングが行われ、ジパルミトイル残基によって安定化することができる。

20

【0160】

他の態様では、本発明の方法および組成物で用いられるターゲットングリガンドはホスホリル化セリン残基を含んでなる材料である。本明細書で用いられる「ホスホリレート」という用語は、例えば $PO_2$ 、 $PO_3$ および $PO_4$ 基など様々な原子価のホスフェート基を包含する。従って、好ましい形態では、ターゲットングリガンドは、セリン残基( $HOCH_2CH(NH_2)CO_2H$ )、または $P(O)_x$ 基(但し、 $x$ は2、3または4)に結合したその残基を含んでなる。好ましくは、エステルはセリン残基のヒドロキシル基と $P(O)_x$ 基との間に形成されるが、他の結合、例えば、セリン残基のアミノ基と $P(O)_x$ 基の間のホスホリアミド結合も本発明の範囲内に包含され、当業者は本発明の開示内容を理解すれば容易に理解されるであろう。

30

【0161】

ある種の好ましい態様では、ホスホリル化セリン残基が脂質化合物に含まれていてもよく、リン脂質が一層好ましい。ホスホリル化セリン残基が脂質に共有結合してリン脂質を提供する態様を、例えば、ある種の好ましい態様に関して、式グリセロール- $P(O)_x$ -セリン(式中、 $x$ は2、3または4である)によって表すことができる。このような態様では、ホスホリル化セリン部分は血管斑に関連した細胞または受容体を標的とし、脂質またはグリセロール部分は組成物に有利な安定化特性を提供することができる。これらの態様に関して、リン脂質は、酸性リン脂質の形態でのターゲットングリガンドを含む態様に関して上記したように、好ましくは一鎖リン脂質またはポリ鎖リン脂質であり、ポリ鎖リン脂質が好ましい。更に好ましくは、ターゲットングリガンドは、ジアシルホスファチジルセリンであって、それぞれのアシル基の炭素数が例えば、約10-約20(およびその炭素数の範囲および特定の数の総ての組合せおよび下位組合せ)の範囲であることができるものを含んでなる。好ましい形態では、アシル基は約16または約17個の炭素を含む。更に一層好ましくは、本発明の組成物は、リン脂質であるジパルミトイルホスファチジル-セリン(DPPS)を含んでなり、ホスホリル化セリン残基によってターゲットングを行うことができ、且つジパルミトイル残基によって安定化することができる。

40

【0162】

また、好ましい態様では、ターゲットングリガンドは、親水性ポリマーを有することがある。従って、ターゲットングリガンドがホスファチジルセリンのようなリン脂質を

50

含んでなる態様では、ポリマーは、例えばホスホリル化セリン残基のホスフェート基またはセリン基に共有結合することができる。ポリマーは、好ましくは重量平均分子量が約400-約100,000(およびその分子量範囲および特定の分子量の総ての組合せおよび下位組合せ)である。適当な親水性ポリマーとしては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、およびポリビニルピロリドンおよびそのコポリマーが挙げられ、PEGポリマーが好ましい。好ましくは、PEGポリマーは分子量が約1000-約20000であり、約3500-約5000の分子量が一層好ましい。PEGまたは他のポリマーは、ホスフェートセリン残基に、共有結合、例えば、アミド、カルバメート、エーテルまたはアミン結合を介して結合させることができる。ホスホリル化セリン残基を含む態様では、生成するターゲッティンググリガンは、式PEG-P(O)<sub>x</sub>-セリン(式中、xは2、3または4である)によって包括的に表すことができる。 10

#### 【0163】

あるいは、親水性ポリマーは、ターゲッティンググリガンズの脂質部分に結合させることができる。このような態様の化学構造は、PEG-グリセロール-P(O)<sub>x</sub>-セリン(式中、xは2、3または4である)として表すことができる。これらの態様では、PEGまたは他のポリマーは、例えば、アミド、エステル、エーテル、チオエステル、チオアミドまたはジスルフィド結合を介して共有結合することができる。親水性ポリマーがPEGである上記の脂質安定化材料と同様に、このようなポリマーを有するターゲッティンググリガンズは、「ペジル化」されていると言われる。 20

#### 【0164】

従って、典型的な態様では、ターゲッティンググリガンズは、式PEG-P(O)<sub>x</sub>-セリンまたはPEG-グリセロール-P(O)<sub>x</sub>-セリンを有することができる。これらの態様によれば、PEGポリマーの遠位末端、すなわちセリンまたはグリセロール残基に結合していないポリマーの末端は、本発明の組成物の他の成分、例えば、他の脂質またはポリマー、安定化材料、生物活性薬などと結合または共役することができる。ある種の好ましい態様では、PEGポリマーの遠位末端は脂質に結合して、小胞壁に組込むことができる生物接合体を提供する。このような生物接合体は、式 脂質-PEG-P(O)<sub>x</sub>-セリンによって包括的に表すことができる。 30

#### 【0165】

従って、脂質組成物の場合には、ホスホリル化セリン残基の形態のターゲッティンググリガンズは、所望ならば、例えば、共有結合を介して、組成物に組込まれる脂質の少なくとも1個に結合させることができる。クラスレートおよびエーロゲルのような脂質以外の物質から処方される小胞の場合には、ターゲッティンググリガンズを、小胞壁に取り込まれる材料の1以上に共有または非共有的に結合させることができる。所望ならば、ターゲッティンググリガンズを共有および/または非共有的に他の安定化材料、例えば、組成物に含まれていることがある生体適合性ポリマーに結合させることもできる。 40

#### 【0166】

本発明の組成物の他の成分、例えば、脂質、ポリマー、タンパク質、小胞、生物活性薬など、並びに他の安定化材料に共有的に結合させることができるターゲッティンググリガンズに関しては、ターゲッティンググリガンズは、好ましくはこのような共有結合の形成などに用いることができる官能基を含むことができる。このような官能基としては、例えば、アミノ(-NH<sub>2</sub>)、ヒドロキシ(-OH)、カルボキシル(-COOH)、チオール(-SH)、ホスフェート、ホスフィネート、スルフェートおよびスルフィネートが挙げられる。 40

#### 【0167】

本明細書に記載のターゲッティンググリガンズ、例えば、酸性でありおよび/またはホスホリル化セリン残基を含むリン脂質、例えば、酸性ジアシルリン脂質などのターゲッティング材料を用いて、任意の超音波コントラスト剤を攻撃を受けやすい斑に標的を定めることができる。ターゲッティングを行うコントラスト剤は、例えば、米国特許第5,547,656号明細書に記載されているように、例えば、ImRx Therapeutics Inc. (Tucson, AZ)によって開発され、Bristol Myers Squibb Company (New York, NY)からDefinity(登録商標) 50

として発売されているガスを満たした脂質微小気泡であることができる。超音波による画像化のために攻撃を受けやすい斑に標的を定めることができる他のコントラスト剤としては、例えば米国特許第5,505,932号明細書および5,362,478号明細書に記載されているようなポリマー殻を基剤とした薬剤、米国特許第5,567,415号明細書および5,701,899号明細書に記載されているようなPESDA(過フッ化炭素で音波処理を高めたデキストロースアルブミン)微小気泡のようなタンパク質を基剤とする殻粒子、またはAmersham Health AS (Oslo, Norway)から発売されているヒトアルブミン微小球であるOptison(登録商標)、米国特許第5,928,626号明細書に記載されているような炭水化物を基剤とした微小粒子、スクロース安定化アルブミン微小気泡が挙げられる。

**【0168】**

ターゲッティングリガンドは、様々な方法で本発明の組成物に組込むことができる。一般的に言えば、ターゲッティングリガンドは、例えば、脂質、タンパク質またはポリマーなど組成物に含まれる材料の1以上、並びに任意の補助的安定化材料と共有的または非共有的に会合させることによって本発明の組成物に組込むことができる。例えば、リン脂質、例えば、酸性リン脂質および/またはホスホリル化セリン残基を含むリン脂質の形態のターゲッティングリガンドを、微小気泡調製の際に酸性リン脂質を殻成分と共に攪拌または音波処理することによって超音波コントラスト剤に組込むことができる。コントラスト剤に含まれるターゲッティングリガンドの濃度は殻の約5-約40重量%(およびその範囲および特定の百分率の総ての組合せおよび下位組合せ)の範囲であることができ、従って、殻材料を重量パーセントで約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%または約40% 20  
含んでなることができる。本明細書に記載されているように、超音波コントラスト剤は、ペジル化されていてもまたはペジル化されていなくともよい。ある態様では、脂質殻を有する超音波コントラスト剤は、約1-約5重量%のコレステロールを例えば、殻の厚みを増すために含むことがある。

**【0169】**

ある種の好ましい態様では、ターゲッティングリガンドは本発明の組成物に含まれる上記材料の1以上と共有的に会合している。上記のように、本発明の好ましい組成物は脂質またはポリマー化合物を含んでなる。これらの組成物において、ターゲッティングリガンドは、好ましくは脂質またはポリマー化合物と共有的に会合している。

**【0170】**

ターゲッティングリガンドが脂質、ポリマー、生物活性薬、および/または小胞と会合することによる典型的な共有結合としては、例えば、アミド(-CONH-)、チオアミド(-CSNH-)、エーテル(ROR', 但し、RおよびR'は同一であるかまたは異なっており、且つ水素以外のものである)、エステル(-COO-)、チオエステル(-COS-)、-O-;-S-、-Sn-(但し、nは1より大きく、好ましくは約2-約8であり、更に好ましくは約2である)、カルバメート、-NH-、-NR-, (但し、Rはアルキル、例えば、1-約4個の炭素を有するアルキルである)、ウレタン、および置換イミデート、およびこれらの2種類以上の組合せが挙げられる。ターゲッティングリガンドと例えば、脂質との共有結合は、リガンドの形態的およびトポロジー的柔軟性を増すためのスペーサーとして作用することができる分子を用いることによって達成することができる。このようなスペーサーの例としては、例えば、コハク酸、1,6-ヘキサ 40  
サン二酸、1,8-オクタン二酸など、並びに修飾したアミノ酸、例えば、6-アミノヘキサン酸、4-アミノブタン酸などが挙げられる。従って、式 脂質-PEG-P(O)<sub>x</sub>-セリンによって包括的に表される生物接合体の典型的態様は、ジステアロイルジアミノブタン-PEG-P(O)<sub>x</sub>-セリンである。

**【0171】**

ターゲッティングリガンドの脂質および/またはポリマーなど本発明の組成物の材料への共有結合は、本発明の開示に基づいて当業者には容易に明らかになる合成有機技術を用いて行うことができる。例えば、ターゲッティングリガンドは、周知のカップリングまたは活性化剤を用いることによって脂質などの材料に結合することができる。当業者に知られているように、活性化剤は一般に親電子性である。この親電子性を用いて、共有結合の 50

10

20

30

40

50

形成を誘発させることができる。用いることができる典型的な活性化剤としては、例えば、カルボニルジイミダゾール(CDI)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、メチルスルホニルクロリド、Castro試薬、およびジフェニルホスホリルクロリドが挙げられる。

#### 【0172】

共有結合架橋および/または重合を含むことがある。架橋は、好ましくはポリマー分子の2本の鎖が、元素、基または化合物から構成され、鎖のある炭素原子に共有化学結合によって連結する橋によって結合することを表す。例えば、架橋は、シスチン残基のジスルフィド結合によって結合しているポリペプチドで起こる可能性がある。架橋は、例えば、(1) 化学物質(架橋剤)を加え、混合物を熱に暴露し、または(2) ポリマーを高エネルギー放射線に暴露することによって行うことができる。様々な架橋剤、または様々な長さおよび/または官能価の「テーター(tethers)」が例えば、R. L. Lunblaud, 「タンパク質修飾の手法」, CRC Press, Inc., Ann Arbor, MI, pp. 249-68 (1995)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。典型的な架橋剤としては、例えば、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)、ジメチルスベリミデートおよび炭化水素の長さに基づくその変体、およびビス-N-マレイミド-1,8-オクタンが挙げられる。

#### 【0173】

ある種の好ましい態様では、ターゲッティングリガンドは、脂質またはポリマー、または他の安定化材料に連結基を介して連結または結合させることができる。様々な連結基が利用可能であり、本発明の開示を理解すれば、当業者には明らかであろう。好ましくは、連結基は親水性ポリマーである。適当な親水性リンカーポリマーとしては、例えば、ポリアルキレンオキシド、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)およびポリプロピレングリコール(PPG)、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリアクリルアミド、例えば、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミドおよびポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ポリヒドロキシプロピルメタクリレート、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリビニルアルコール、ポリホスファゼン、ポリ(ヒドロキシアルキルカルボン酸)、ポリオキサゾリジン、およびポリアスパルタミドが挙げられる。親水性ポリマーは、好ましくはPEG、PPG、ポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドン、およびそれらのコポリマーからなる群から選択され、PEGおよびPPGポリマーが更に好ましく、PEGポリマーが更に一層好ましい。従って、DPP E-PEGなどのポリマーを有する脂質を含んでなる脂質組成物を含む態様では、ターゲッティングリガンドを、脂質に結合しているポリマーに直接連結して、例えば、接合体DPPE-PEG-TL、(但し、TLはターゲッティングリガンド)を提供することができる。従って、例DPPE-PEG、例えば、DPPE-PEG5000を用いると、上記接合体はDPPE-PEG5000-TLと表すことができる。連結基として用いられる親水性ポリマーは、好ましくは二官能価ポリマーであり、例えば、ジアミノ-PEGのような二官能価PEGである。この場合に、PEG基の一端を、例えば、脂質化合物に連結し、自由末端ではアミド結合を介してターゲッティングリガンドに結合している。一端の末端カルボキシレート基と他端の末端アミノ基で置換された親水性ポリマー、例えば、PEGを用いることもできる。これらの後者の二官能価親水性ポリマーは、アミノ酸と様々な類似性を有するので、好ましいことがある。

#### 【0174】

2個の独特な末端官能基を有するリンカー基を用いるときには、標準的ペプチド法を用いて、ターゲッティングリガンドを脂質に連結することができる。二官能価親水性ポリマー、特に二官能価PEGは、標準的有機合成法を用いて合成することができる。更に、これらの材料の多くは市販されている。例えば、-アミノ、-カルボキシPEGは、Shearwater Polymers (Huntsville, AL)から発売されている。PEG材料を連結基として用いることの利点は、PEGの大きさを変化させ、エチレングリコールのモノマーサブユニットの数を例えば、約5程度とし、または例えば、約500以上の程度とすることができることである。従

10

20

30

40

50

って、「テーター」または結合の長さを、所望に応じて変化させることができる。これは、例えば、用いる特定のターゲットングリガンドによっては重要であることがある。例えば、大きなタンパク質分子を含んでなるターゲットングリガンドは、短いテーターを必要とし、膜結合タンパク質をシミュレートするようにすることがある。短いテーターにより、小胞が細胞への近接を保持できるようにもなる。これは、生物活性薬をも含んでなる小胞に関して、細胞に輸送される生物活性薬の濃度を好都合に増加させることができる点で、有利に用いることができる。

#### 【0175】

短いテーターを提供することができるもう一つの適当な連結基は、グリセルアルデヒドである。グリセルアルデヒドは、例えば、DPPEにSchiff塩基反応によって結合させることができる。次のAmadori転移により、実質的に短い連結基を提供することができる。Schiff塩基のカルボニルを、次にターゲットングタンパク質またはペプチドのリシンまたはアルギニンと反応させて、ターゲットングした脂質形成することができる。

#### 【0176】

更に具体的には、本発明の組成物に用いた脂質および/またはポリマーなどの化合物は、例えば、ヒドロキシ、チオおよびアミン基のような様々な官能基を含み、これが、本発明の開示を理解したならば当業者には明な適当なカップリング条件を用いて親水性ポリマーリンカーのカルボン酸またはカルボン酸誘導体と反応させることができる。カルボン酸基(またはその誘導体)が官能基、例えば、ヒドロキシ、チオまたはアミン基と反応してエステル、チオエステルまたはアミド基を形成した後、任意の保護官能基を当業者に周知の手続きを用いて脱保護することができる。本明細書で用いられる保護基という用語は、官能基の反応をブロックするのに用い且つ所望ならば除去して保護されていない官能基を得ることができる任意の残基を表す。様々な保護基のいずれを用いることもでき、これらは、例えば保護を行う基がアミン、ヒドロキシルまたはカルボキシル残基であるかどうかによって変化する。官能基がヒドロキシル基であるときには、適当な保護基としては、例えば、ある種のエーテル、エステルおよび炭酸塩が挙げられる。このような保護基は、例えば、Greene, TW and Wuts, PGM, 「有機合成における保護基」, John Wiley, New York, 第2版(1991)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。アミン基の典型的な保護基としては、例えば、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、ベンジルオキシカルボニル(Cbz)、o-ニトロベンジルオキシカルボニル、およびトリフルオロアセテート(TFA)が挙げられる。

#### 【0177】

小胞に含まれるポリマーの主鎖などに存在することがあるアミン基は、例えば、グルタルアルデヒドのようなカップリング剤を用いてSchiff塩基を形成することによって親水性連結ポリマー上のアミン基にカップリングすることができる。このカップリングの一例は、Allcock et al., Macromolecules Vol. 19 (6), pp. 1502-1508 (1986)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。例えば、小胞をポリリシンから処方するときには、遊離アミノ基が小胞の表面に露出することがあり、これらの遊離アミン基は上記の方法で活性化することができる。また、活性化したアミン基を用いて、例えば、-アミノ- -ヒドロキシ-PEGであって、-ヒドロキシ基がカーボネート基で保護されているものなどの官能化した親水性ポリマーにカップリングすることができる。反応が完了した後、カーボネート基を開裂させることにより、末端ヒドロキシ基を活性化して適当なターゲットングリガンドに反応させることができる。ある態様では、小胞の表面を、例えば、ポリジクロロホスファジンのような塩素含有ホスファゼン残基の塩素原子を置換することによって活性化することができる。次のターゲットングリガンドの添加および残っているクロリド基を水または水性メタノールで中和すると、カップリング生成物が得られる。

#### 【0178】

更に、ポリ(ジフェノキシホスファゼン)を合成し(Allcock et al., Macromolecules Vol. 1. (1986) 19 (6), pp. 1502-1508)、例えば、DPPE上に固定した後、硝酸と無水酢酸の混

10

20

30

40

50

合物を加えてフェノキシ残基をニトロ化することができる。次に、生成したニトロ基を、例えば、(1) 0.1Mホスフェート緩衝液(pH 11)中で臭化シアンで処理した後、遊離アミノ残基を含むターゲットングリガンドを加えてカップリングした尿素類似体を生成し、(2) 亜硝酸ナトリウム/HClを用いてジアゾニウム塩を形成した後、ターゲットングリガンドを加えてカップリングしたリガンドを形成し、および/または(3) ジアルデヒド、例えば、上記のようなグルタルアルデヒドを用いてSchiff塩基を形成することによって活性化することができる。DPPEを親水性ポリマーおよびターゲットングリガンドに連結した後、小胞を本明細書に記載の手法を用いて処方することができる。

#### 【0179】

ポリマー上のアルデヒド基を上記のアミンとSchiff塩基を形成することによってカップリングすることができる。このカップリング法の一例は、Allcock and Austin, *Macromolecules* vol 14, p1616 (1981)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。 10

#### 【0180】

上記手続きにおいて、ポリマーまたは脂質の末端、例えば、ホスファチジルグリセロールまたはホスファチジエタノールアミンは、好ましく活性化されて、末端が適当な方法でブロックされている親水性ポリマーリンカーにカップリングされる。この方法の一例として、t-Boc保護末端アミノ基と遊離カルボキシレート末端を有する -アミノ、 -カルボキシPEG-4000を、N-メチルピロリドン中ヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下にて、1'-カルボニルジイミダゾールで活性化することができる。ホスファチジエタノールアミンを添加した後、t-Boc基をトリフルオロ酢酸(TFA)を用いて除き、遊離アミンを残すことができる。次に、アミンを、リガンドの同様な活性化によってターゲットングリガンドと反応させて、脂質-リンカー-ターゲットングリガンド接合体を提供することができる。上記したもの他に、他の方法を用いて、脂質-リンカー-ターゲットングリガンド接合体を調製することができる。一般的に言えば、これらの方法は、合成有機化学の当業者には一般に知られている合成法を用いる。 20

#### 【0181】

追加のリンカーは、二官能価スペーサーへのカップリングに有用な脂質の他の誘導体を包含する。例えば、ホスファチジエタノールアミン(PE)を二官能価剤にカップリングすることができる。例えば、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミド-フェニル)ブチレート(SMPB)およびN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジルトランス-4-(N-マレイミジルメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート(SMCC)、およびN-スクシンイミジル3-マレイミジルベンゾエート(SMB)を、特に用いて、例えば、官能化脂質MPB-PEおよびPDP-PEを生成することができる。 30

#### 【0182】

ポリエチレングリコールエチルアミンのような反応性基、例えば、アミンまたはヒドロキシル基を含む親水性スペーサーの遊離末端を用いて、補助因子または他のターゲットングリガンドを結合することができる。例えば、ポリエチレングリコールエチルアミンをN-スクシンイミジルピオチンまたはp-ニトロフェニルピオチンと反応させて、スペーサー上に有用なカップリング基を導入することができる。例えば、ピオチンをスペーサーにカップリングすることができ、これは容易にタンパク質に非共有的に結合する。一例として、MPB-PEG-DPPEは、下記のようにして合成することができる。PEGの末端に遊離アミノ基を有するDPPE-PEGは、上記の方法で提供される。次に、SMPB:PEG-DPPEの合成は、クロロホルム中1当量のトリエチルアミンを用いて、1:5 SMPB:DPPE-PEGのモル比で行うことができる。3時間後、反応混合物をアルゴン下にて蒸発乾固させる。過剰の未反応SMPBと主要な副生成物を、調製用薄層クロマトグラフィー(TLC, シリカゲル、50%アセトン/クロロホルムで展開)によって除去する。脂質バンドの上部を、約20-30%メタノール/クロロホルム(V:V)でシリカから抽出し、純粋な完全なMPB-Peg-DPPEを単離することができる。次に、ストレプトアビジンをタンパク質にカップリングして、次にタンパク質をMPB-PEG-DPPEにカップリングさせるようにすることができる。簡単に説明すれば、SPDPをストレプトアビ 40 50

ジンと共に室温で30分間インキュベーションして、クロマトグラフィーを用いて未反応SP DPを除去する。ジチオトレイトール(DTT)を反応混合物に加え、10分後に2-チオピリドン を343nMの濃度で加えた。反応混合物の残りを、DTTで還元した(25 mM、10分間)。チオール 化生成物をゲル排除によって単離する。次に、生成するストレプトアビジン標識タンパ ク質を用いて、脂質残基に付加したビオチン化スパーサーに結合させることができる。

#### 【0183】

ターゲッティングリガンドの脂質またはポリマー、小胞、生物活性薬または他の安定化 材料への共有結合に用いることができる追加の方法は、例えば、Unger, et al., 米国特 許第6,090,800号明細書およびUnger, 米国特許第6,028,066号明細書に記載されており、 上記明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

10

#### 【0184】

本発明の好ましい態様では、ターゲッティングした化合物、すなわちターゲッティング した脂質およびポリマーを、例えば、ターゲッティングしたミセル、ターゲッティングし たリポソーム、ターゲッティングしたタンパク質微小球および/またはターゲッティング したポリマーコーティングした微小球などの標的小胞の形成に用いられる組成物に組み込む ことができる。小胞が調製される化合物に結合したターゲッティングリガンドは、例えば、 小胞の表面から外側に向けることができる。従って、受容体および組織のターゲッティ ングに用いることができるターゲッティングした小胞が提供される。

#### 【0185】

本発明の組成物で用いられるターゲッティングリガンドの濃度は、例えば、用いる特定 20 のターゲッティング剤、ターゲッティングを行う受容体または組織、組成物の他成分、ター ゲッティングリガンドが組成物の他成分、例えば、脂質、ポリマーまたは小胞などと共 有的および/または非共有的に会合しているかどうかによって変化することがある。典型 的には、本発明の組成物におけるターゲッティングリガンドの濃度は、低めのレベルから 開始して、所望なコントラスト増強効果が達成されるまで増加させることができる。ター ゲッティングした疎水性化合物、例えば、ターゲッティングリガンドが脂質などに共有結 合している接合体を、組成物で用いられる他の安定化材料に対して約0.05重量%-約40重量 % (およびその範囲およびその特定の百分率の総ての組合せおよび下位組合せ)の範囲の濃 度で組成物に用いることができる。好ましくは、ターゲッティングリガンドは、約0.5重 量%-約30重量%の濃度で組成物に用いることができ、約1重量%-約20重量%の濃度が一層好 30 ましい。更に一層好ましくは、ターゲッティングリガンドを約1重量%-約2重量%の濃度で 本発明の組成物に用いることができ、約1.25重量%が特に好ましい。他の態様では、約5重 量%の濃度が特に好ましい。

30

#### 【0186】

本発明の教示を理解したならば、当業者には明らかなように、本発明の組成物に用いる ことができるターゲッティングした疎水性化合物および/または未結合のターゲッティ ングリガンドの濃度をモル%で表すこともできる。これに関連して、ターゲッティングした 疎水性化合物および/または未結合のまたは遊離ターゲッティングリガンドを、本発明の 組成物に、組成物に用いられる未結合の安定化材料のモル数に対して0.05モル%-約30モル % (およびその範囲およびその特定の百分率の総ての組合せおよび下位組合せ)の範囲の濃 40 度で用いることができる。好ましくは、接合体または遊離ターゲッティングリガンドを、 組成物に約0.5モル%-約20モル%の濃度で用いることができ、約1モル%-約5モル%の濃度 が一層好ましい。更に一層好ましくは、接合体または遊離ターゲッティングリガンドを、 本発明の組成物で約1モル%-約2モル%の濃度で用いることができ、約1.8モル%の濃度が 特に好ましい。

#### 【0187】

上記のように、本発明の脂質および/または小胞組成物は、水性環境で望ましく処方さ れる。これにより、脂質の疎水性/親水性により、脂質が小胞の形成を誘発することがで き、このような環境で達成することができる最も安定な配置とすることができる。リン脂 質の場合には、極性頭基は小胞の表面に配向することができ、無極性の疎水性部分は小胞 50

の内部に向かって配向する。従って、ホスホリル化セリン基を含んでなる小胞の場合には、ホスホリル化セリン残基が好都合に小胞の表面に露出することがあり、これにより、これと会合した所望なターゲット、例えば、斑またはマクロファージと相互作用することができる。このような水性環境を生成するのに用いることができる希釈剤としては、例えば、水、脱イオン水、または好ましくは小胞の形成および/または安定性、またはそれらの超音波コントラスト剤、MRIコントラスト剤またはCTコントラスト剤のような診断薬としての使用を妨げない塩、および通常の食塩水および生理食塩水のような1種類以上の溶解した溶質を含む水などの水が挙げられる。

#### 【0188】

上記のように、本発明の組成物は、場合によっては油を含んでなることもできる。本発明の開示の目的に対して、本出願明細書を通して用いられる「油」、「油類」という用語、およびそれらの変化は油脂を包含するものと理解される。好ましい油、ワックス、および脂肪は、融点が100 を下回るものである。特に好ましいものは、融点が-20 - 66 の合成油であり、更に好ましくは融点が60 未満のもの、および最も好ましくは融点が42 未満のものである。この態様では、油およびワックスは一般に生物活性薬を溶解するのに用いられるが、乾燥した生物活性薬、例えば、エトポシドまたはブレオマイシンの結晶を懸濁するのに用いることもできる。60 を上回る温度で融解するワックスを用いることができるが、一般に低融点ワックスが好ましい。文献で知られている多くの天然油sを、本発明で用いることができる。幾つかの通常の油の融点は、状態変化時分解する多成分性により決定が困難である。

#### 【0189】

本発明の方法および組成物で用いられる油の中で好ましいものは、低粘度油である。本明細書で用いられる「低粘度」という用語は、周囲室温で約1センチポアズ-約4,000センチポアズの範囲の粘度、およびその範囲および特定の粘度の総ての組合せおよび下位組合せを有することができる材料を表す。好ましくは、低粘度油は周囲室温での粘度が約1センチポアズ-約2,000センチポアズであり、約1-約1,000センチポアズの粘度が好ましく、約1-約500センチポアズ以下の粘度が一層好ましい。低粘度油は、特に脂質を基剤とするコントラスト剤、例えば、脂質を基剤とする微小気泡に関するコントラスト剤の音響特性を望ましく維持することができる。特に好ましい低粘度油としては、例えば、トリアセチン、ジアセチン、および低粘度鉱油が挙げられる。

#### 【0190】

他の市販の合成油および界面活性剤も、上記の油の代わりに用いるのにも適当である。このような油には、Owen et al., 米国特許第5,633,226号明細書に記載されているものがあり、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されており、Captex 200(5,633,226号明細書に記載の組成物)、Whitepsol H-15およびMYVACET 9-45Kが挙げられる。同じ文献から場合によって包含することができる界面活性剤としては、カプムル(capmul) MCM、Myverol 18-92、Cremophor EL、Centrophase 31、ポリオキシエチレンの誘導体、およびBrown, 米国特許第5,573,781号明細書に開示されているものが挙げられ、上記開示内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

#### 【0191】

本発明の微小球に適当な油、ワックスおよび脂肪としては、下表に示すものが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0192】

表1: ワックス、脂肪および油の融点( )

油/ワックス/脂肪	融点
ホホバ	11
ケイ-ケイ	30
ウールワックス(無水ラノリン)	39.5
ウクフバ	42.5
鯨脳	44

10

20

30

40

50

水素化ヤシ油	44		
パラフィン	45-68		
オレンジの皮	46		
ベイラム	47		
セチルアルコール	49		
木蝋	49-52		
ソルビトールジステアレート	50		
Lanetteワックス	50		
Spermafol 52	51		
セチルパルミテート	52		10
昆虫ワックス (Ceroplastes)	55		
ジグリコールステアレート	56.5		
Indian Arjun	59		
Pliowax	55.5		
Ponderosa樹皮	58		
Chineseタローツリー	57		
カーボワックスステアレート	57		
セチルアセタミド	59		
ジャスミン・フローラル	60		
ビーズワックス	62		20
【0193】			
飽和脂肪酸	融点	天然起源	
ギ酸	8.4		
酢酸	16.6		
プロピオン酸	-22		
酪酸	-8	乳脂肪	
吉草酸	-34.5		
カブロン酸	-3.4	ヤシ油, 0.5%	
エナント酸	-7.5		
カプリル酸	16.7	ヤシ油, 9%	30
ペラルゴン酸	12.3		
カプリン酸	31.6	ヤシ油, ニレ種子油	
ヘンデカン酸	28.5		
ラウリン酸	44.2	ヤシ油, ヤシ核油	
トリデカン酸	41.5		
ミリスチン酸	54.4	ナツメグ脂肪	
ペンタデカン酸	52.3		
パルミチン酸	62.9	パームヤシ油, 綿実油	
【0194】			
不飽和脂肪酸	融点	天然起源	40
リンデル酸	5.3	種子脂肪	
ツズ酸	18.5	種子脂肪	
パルミトール酸	0.5	大豆油, 海藻	
ペトロセリン酸	30	パセリ種子油	
オレイン酸	16.3	広く分布	
エライジン酸	43.7	部分水素化脂肪	
エルス酸	33.5	アブラナ種子油	
ブラシド酸	60	エルス酸のトランス異性体	
リノール酸	-5	極めて広く分布	
リノレン酸	-11	亜麻仁油	50

サントルブ酸	42	種子脂肪	
-エレオステアリン酸	49	アブラギリ油	
ブニス酸	44	Pomegranite種子油	
【0195】			
合成脂肪	融点		
トリオレイン	-4.5		
トリミリスチン	56		
トリアセチン	-78		
トリバルミチン	66		
トリストアリンリン	55		10
トリブチリン	-75		
グリセリルモノオクタノエート	29		
グリセリルモノステアレート	57		
【0196】			
天然脂肪	融点		
牛脂	43		
羊脂	47		
豚脂	41.5		
バター	31		
カカオ脂	24.5		20
月桂樹油	33		
パームヤシ油	30		
ココナツ油	24		
ナツメグ脂	43.5		
大豆油	-13 (平均)		
ナタネ油	-6 (平均)		
トウモロコシ油	-14 (平均)		
ヒマシ油	-14 (平均)		
日本アニス油	-12.5 (平均)		
ユーカリ油	-15.5		30
カラシナ種子油	-12 (平均)		
バラ油	20		
アーモンド油	-20		

## 【0197】

フッ素化トリグリセリド油は、反応性フッ素化種、例えば、フッ素ガスを不飽和トリグリセリド油と反応させ、所望のフッ素化トリグリセリドを生成することによって調製することができる。

## 【0198】

様々な診断薬を、本発明の方法および組成物を用いて斑にターゲッティングすることができる。このような診断薬の例としては、例えば、超音波画像化のためのガスおよび/またはガス状前駆体を満たした小胞、核医薬のための放射性核種、磁気共鳴画像化のための常磁性および超常磁性材料、X線画像化のためのラジオデンス(radiodense)材料、光学的画像化のための光学活性材料、およびHall効果画像化および光音響画像化のための組合せ薬剤が挙げられる。

40

## 【0199】

本発明の組成物は、診断用および治療用超音波などの超音波に関して特に有用であると考えられる。本発明の組成物の超音波での使用は、本発明の開示中に記載されている。

## 【0200】

上記のように、本発明の組成物は、コンピューター断層撮影法(CT)画像化に関して用いることもできる。CTには様々な欠点があり、一般に上記の診断手法と比較して余り有効で

50

はない。しかしながら、本発明のコントラスト媒体、特にガスを満たした小胞組成物を十分な高濃度で目的とする領域、例えば、血餅に運ぶと、血餅は血餅の全般的密度の減少によりCT画像に検出することができる。一般に、ガスを満たした小胞の1%の約1/10以上の濃度(容積比較)が、CTによって検出される上記血餅を含む目的とする領域に運ぶのに必要となることがある。

#### 【0201】

本発明の組成物で用いるのに適当な典型的な常磁性および超常磁性コントラスト剤としては、例えば、安定なフリーラジカル、例えば、安定なニトロキシド、並びに遷移元素、ランタニドおよびアクチニド元素を含んでなる化合物であって、所望ならば、塩の形態であることができ、または共有的または非共有的に錯形成剤およびその親油性誘導体、またはタンパク質性高分子に結合することができるものが挙げられる。

10

#### 【0202】

好ましい遷移、ランタニドおよびアクチニド元素としては、例えば、Gd(III)、Mn(II)、Cu(II)、Cr(III)、Fe(II)、Fe(III)、Co(II)、Er(II)、Ni(II)、Eu(III)およびDy(III)が挙げられる。更に好ましくは、元素は、Gd(III)、Mn(II)、Cu(II)、Fe(II)、Fe(III)、Eu(III)およびDy(III)、特にMn(II)およびGd(III)であることができる。追加の常磁性および超常磁性材料は、米国特許第5,312,617号明細書に記載されており、上記明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

#### 【0203】

上記元素は、所望ならば、マンガン塩、例えば、塩化マンガン、炭酸マンガン、酢酸マンガンのような無機塩、およびグルコン酸マンガンおよびマンガンヒドロキシルアパタイトのような有機塩の形態であることができる。他の典型的な塩としては、鉄の塩、例えば、硫化鉄および塩化第二鉄のような第二鉄塩が挙げられる。

20

#### 【0204】

これらの元素は、所望ならば、共有または非共有会合などを介して錯形成剤およびその親油性誘導体またはタンパク質性高分子に結合することもできる。好ましい錯形成剤としては、例えば、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、エチレン-ジアミン四酢酸(EDTA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'''-三酢酸(DOTA)、3,6,9-トリアザ-12-オキサ-3,6,9-トリカルボキシメチレン-10-カルボキシ-13-フェニル-トリデカン酸(B-19036)、ヒドロキシベンジルエチレンジアミン二酢酸(HBED)、N,N'-ビス(ピリドキシル-5-ホスフェート)エチレンジアミン、N,N'-ジアセテート(DPDP)、1,4,7-トリアザシクロノナン-N,N',N'''-三酢酸(NOTA)、1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(TETA、クリプタンド(大環状錯体)、およびデスフェリオサミンが挙げられる。更に好ましくは、錯形成剤は、EDTA、DTPA、DOTA、D03Aおよびクリプタンドであり、最も好ましくは、DTPAである。好ましい親油性錯体としては、錯形成剤EDTA、DOTAのアルキル化誘導体、例えば、N,N'-ビス-(カルボキシデシルアミドメチル-N-2,3-ジヒドロキシプロピル)-エチレンジアミン-N,N'-ジアセテート(EDTA-DDP)、N,N'-ビス-(カルボキシ-オクタデシルアミド-メチル-N-2,3-ジヒドロキシプロピル)エチレンジアミン-N,N'-ジアセテート(EDTA-ODP)、N,N'-ビス(カルボキシ-ラウリルアミドメチル-N-2,3-ジヒドロキシプロピル)エチレンジアミン-N,N'-ジアセテート(EDTA-LDP)など米国特許第5,312,617号明細書に記載されているものなどが挙げられ、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。好ましいタンパク質性高分子としては、例えば、アルブミン、コラーゲン、ポリアルギニン、ポリリシン、ポリヒスチジン、 $\alpha$ -グロブリンおよび $\beta$ -グロブリンが挙げられ、アルブミン、ポリアルギニン、ポリリシン、およびポリヒスチジンが一層好ましい。

30

40

#### 【0205】

従って、適当な錯体としては、Mn(II)-DTPA、Mn(II)-EDTA、Mn(II)-DOTA、Mn(II)-D03A、Mn(II)-クリプタンド、Gd(III)-DTPA、Gd(III)-DOTA、Gd(III)-D03A、Gd(III)-クリプタンド、Cr(III)-EDTA、Cu(II)-EDTA、または鉄-デスフェリオサミン、特にMn(II)-DTPAまたはGd(III)-DTPAが挙げられる。

50

## 【0206】

ニトロキシドは、ニトロキシド分子に不対電子が存在するためMRIでのT1およびT2緩和速度をいずれも増加する常磁性コントラスト剤である。当業者に知られているように、MRIコントラスト剤としての所定の化合物の常磁性有効性は、少なくとも部分的には常磁性核または分子の不対電子の数、特に不対電子の数の二乗に関係している可能性がある。例えば、ガドリニウムは7個の不対電子を有し、一方、ニトロキシド分子は1個の不対電子を有する。従って、ガドリニウムは、一般にニトロキシドよりずっと強力なMRIコントラスト剤である。しかしながら、コントラスト剤の有効性を評価するためのもう一つの重要なパラメーターである有効相関時間は、ニトロキシドに対して潜在的な増加リラクシビティー(relaxivity)を与える。常磁性コントラスト剤が大きな分子に結合することなどによってタンプリング速度が低下すると、これは一層ゆっくりタンブルするようになるので、更に効果的にエネルギーを移動し、水プロトンの緩和を速める。しかしながら、ガドリニウムでは、電子スピン緩和時間は迅速であり、低回転相関時間がリラクシビティーを増加することができる程度が制限される。しかしながら、ニトロキシドについては、電子スピン相関時間は一層好ましく、これらの分子の回転相関時間を遅くすることによって緩和率を著しく増加させることができる。本発明のガスを満たした小胞は、低下した回転相関時間および得られる緩和率の向上の目的を達成するのに理想的である。任意の特定の操作の理論に束縛しようとするものではないが、ニトロキシドは、例えば、そのアルキル誘導体を作製することによって小胞の周囲をコーティングするようにデザインすることができるので、得られる相関時間を最適にすることができる。更に、本発明の生成するコントラスト媒体は、緩和率を最大にする幾何学的配置である磁気球として考えることができる。

## 【0207】

所望ならば、ニトロキシドは、アルキル化あるいは誘導体形成して、ニトロキシド2,2,5,5-テトラメチル-1-ピロリジニルオキシ、フリーラジカル、および2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ、フリーラジカル(TMPO)とすることができる。

## 【0208】

本発明の組成物で用いるのに適する典型的な超常磁性コントラスト剤としては、磁区、強またはフェリ磁性化合物、例えば、純鉄、磁性酸化鉄、例えば、マグネタイト、 $-Fe_2O_3$ 、 $Fe_3O_4$ 、マンガンフェライト、コバルトフェライトおよびニッケルフェライトを体験する金属オキシドおよびスルフィドが挙げられる。酸素 $^{17}O_2$ のような常磁性ガスを、本発明の組成物に用いることもできる。更に、超分極したキセノン、ネオン、またはヘリウムガスを用いることもできる。次に、MR全身画像化を用いて、血栓症などについて身体を速やかにスクリーニングすることができ、また超音波を応用して、所望ならば、血栓症を援助することができる。

## 【0209】

上記の常磁性および超常磁性コントラスト剤のようなコントラスト剤を、脂質および/または小胞組成物中の成分として用いることができる。小胞組成物の場合には、上記コントラスト剤を内部空隙中に取り込み、小胞を有する溶液として投与し、任意の追加安定化材料と共に組込み、または小胞の表面または膜上にコーティングすることができる。

## 【0210】

所望ならば、常磁性または超常磁性剤は、組成物、特に小胞の脂質壁に組込まれたアルキル化または他の誘導体として送達することができる。特に、ニトロキシドである2,2,5,5-テトラメチル-1-ピロリジニルオキシ、フリーラジカル、および2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ、フリーラジカルは、例えば、アセチルオキシ結合などの様々な結合を介してメチル基によって占められていない環の位置における長鎖脂肪酸と付加物を形成することができる。このような付加物は、本発明の脂質および/または小胞組成物への組込みを極めて受けやすい。

## 【0211】

任意の1以上の常磁性剤および/または超常磁性剤の混合物を、本発明の組成物で用いることができる。常磁性および超常磁性剤は、所望ならば、別々に同時投与することもでき

る。

【0212】

本発明の脂質および/または小胞組成物、特に小胞組成物は、上記の超常磁性剤の効果的キャリアーとして働くだけでなく、磁化率コントラスト剤の効果を上向きにさせることもできる。超常磁性コントラスト剤としては、酸化金属、特に酸化マンガンを含む酸化鉄、および様々な量のマンガン、コバルトおよびニッケルを含み、磁区を体験している酸化鉄が挙げられる。これらの薬剤はナノ粒子または微小粒子であり、体積磁化率および緩和速度が極めて高い。大きめの粒子、例えば、直径が約100nmの粒子はR1リラクシビティーと比較してずっと高R2リラクシビティーを有する。小さめの粒子、例えば、直径が約10-約15nmの粒子は幾分低めのR2リラクシビティーを有するが、R1およびR2値は遙かにバランスがとれている。ずっと小さめの粒子、例えば、直径が約3-約5nmの単結晶性酸化鉄粒子は低R2リラクシビティーを有するが、恐らくは最もバランスのとれたR1およびR2緩和速度を有する。フェリチンを処方して、非常に高い緩和速度の超常磁性鉄のコアをカプセル化することもできる。脂質および/または小胞組成物、特にガスを満たした小胞を含む小胞組成物は、これらの通常の酸化鉄を基剤としたMRIコントラスト剤の有効性および安全性を増加することができることを見出されている。

10

【0213】

酸化鉄は、脂質および/または小胞組成物に簡単に組込むことができる。好ましくは、脂質から処方した小胞の場合には、酸化鉄を例えば、小胞の表面に吸着させることによって小胞の壁に組込むことができ、または米国特許第5,088,499号明細書に記載されているように小胞の内部に取り込むことができ、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

20

【0214】

任意の特別な理論または操作の理論に束縛されることなく、本発明の小胞は幾つかの機構によって超常磁性コントラスト剤の有効性を増加すると思われる。第一に、小胞は、酸化鉄粒子の見かけの磁性濃度を増加させられると思われる。また、小胞は、常磁性および超常磁性剤を含むMRIコントラスト剤の見かけの回転相関時間を増加させ、緩和速度を増加すると思われる。更に、小胞は、以後に記載する方法によってコントラスト媒体の見かけの磁区を増加すると思われる。

30

【0215】

本発明のある種の小胞、特に脂質から処方した小胞は、例えば、血管内注射または他の身体部位への注射の場合には、例えば、コントラスト媒体の水性懸濁液、または血液または他の体液などの懸濁媒質とは異なる磁化率の柔軟な球状磁区として視覚化することができる。フェライトまたは酸化鉄粒子の場合には、これらの薬剤によって提供されるコントラストは粒子の大きさによって変化することに留意すべきである。この現象はごく普通に見られるものであり、水分子の「永年(secular)」緩和と呼ばれることが多い。更に物理的用語で記載すれば、この緩和機構は常磁性原子または常磁性分子、または分子が存在する分子複合体の有効サイズによって変化する。一つの物理的説明は、下記のSolomon-Blombergen方程式で記載され、常磁性寄与を常磁性イオンによって摂動を加えた磁気回転比gを有するスピン1/2核のT1およびT2緩和時間の関数として定義している：

40

$$1/T_1 M = (2/15) S(S+1) \frac{g^2 \mu_B^2}{r^6} [3 \frac{c}{(1+c^2)} + 7 \frac{c}{(1+s^2+c^2)}] + (2/3) S(S+1) A^2 / h^2 [ \frac{c}{(1+s^2+e^2)} ], \text{ および}$$

$$1/T_2 M = (1/15) S(S+1) \frac{g^2 \mu_B^2}{r^6} [4 \frac{c}{(1+c^2)} + 13 \frac{c}{(1+w_s^2+c^2)}] + (1/3) S(S+1) A^2 / h^2 [ \frac{e}{(1+s^2+e^2)} ]$$

(式中、

Sは電子スピン量子数であり、

gは電子g因子であり、

$\mu_B$ はBohr磁子であり、

$\omega_s$  および  $\omega_e$  (657) は核スピンおよび電子スピンのLarmor角歳差運動振動数であり、

rはイオン-核間距離であり、

50

Aは超微細カップリング定数であり、

。および。はそれぞれ双極およびスカラー相互作用の相関時間であり、

hはPlanck定数

である)。

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

#### 【0216】

小数の大粒子は、主として相関時間が大きいいため、より多数のずっと小さめの粒子より遙かに大きな効果を有することができる。しかしながら、酸化鉄粒子を極めて大きくしようとする、毒性が増加することがあり、また肺が塞栓を形成したり補体カスケード系が活性化されることがある。更に、粒子の全体の大きさは、その端または外部表面における粒子の直径ほど重要ではないと思われる。磁化または磁化率効果の領域は、粒子の表面から指数的に減少する。一般的に言えば、(空間を介する)双極緩和機構の場合には、この指数的減少は常磁性双極子-双極子相互作用に対する $r^6$ 依存性を示している。字義通りに解釈すれば、常磁性表面から4オングストローム離れている水分子は同じ常磁性表面から2オングストローム離れている水分子の1/64の影響を受けることとなる。コントラスト効果を最大にすることに関する理想的状態は、酸化鉄粒子を中空にし、柔軟にし、できるだけ大きくすることである。これまでは、これを達成することはできなかったのであり、またその利益もこれまでは認識されていなかったと思われる。個々のコントラスト剤、例えば、酸化鉄ナノ粒子または常磁性イオンが比較的小さな構造であっても、小胞の内部または外部表面にコントラスト剤をコーティングすることによって、コントラスト剤の有効性を大幅に向上させることができる。そうすることによって、コントラスト剤は、磁化の有効領域が小胞の直径によって決定され且つ小胞の表面で最大となる実際上遙かに大きな球として機能することができる。これらの薬剤により、柔軟性、すなわちコンプライアンスの利益が得られる。堅い小胞は肺または他の臓器につかえて、毒性反応を生じることがあるが、これらの柔軟小胞は遙かに容易に毛細血管中を滑らかに移動する。

#### 【0217】

上記の柔軟小胞とは対照的に、ある種の環境では、例えば、ポリメチルメタクリレートなどの実質的に不透過性ポリマー材料から小胞を処方するのが望ましいことがある。これにより、一般的には、実質的に不透過性であり且つ比較的弾性がなく脆い小胞が形成される。診断用画像化、例えば、超音波を含む態様では、このような脆い小胞を含んでなるコントラスト媒体は一般に柔軟小胞が提供し得る所望な反射率を提供しない。しかしながら、超音波での出力を増加することによって、脆い微小球を破裂させることによって音響を放出し、これを超音波変換器で検出することができる。

#### 【0218】

核医学画像化(NMI)を、本発明の診断および治療方法の態様に関して用いることもできる。例えば、NMIを用いて放射性ガス、例えば、上記のガスの他にまたは代わりに本発明の組成物に組込むことができる $Xe^{133}$ を検出することができる。このような放射性ガスは、例えば、血栓症の検出に用いる小胞内に取り込むことができる。好ましくは、二官能価キレート誘導体を小胞の壁に取り込み、生成する小胞をNMIおよび超音波の両方に用いることができる。この場合には、高エネルギー高品質核医学画像化同位体、例えば、テクネシウム、インジウム、ヨウ素、ガリウムおよび他の放射性元素を小胞の壁に取り込むことができる。次に、全身線掃引カメラを用いて、イン・ビボでの小胞取り込みの領域を突き止めることができる。所望ならば、超音波は核医学の手法と比較して一般に向上した解像度を提供するので、超音波を用いて血管内の斑などの存在を確認することもできる。NMIを用いて患者の前進をスクリーニングして、血管の血栓部位を検出することもでき、また超音波をこれらの部位に局部的にあてて小胞の破裂を促進することによって斑を治療することができる。上記の同位体を含む態様では、組成物は更にEDTA、DTPA、DOTAおよび他の大環状化合物のようなキレートを含んでなることができる。その他の適当なキレートは、米国特許第5,458,127号明細書に開示されており、上記特許明細書の内容は、その開示

10

20

30

40

50

の一部として本明細書に引用されている。PET掃引については、本発明の組成物を用いてフッ素および酸素のPET同位体、ルビジウムおよび他の陽電子放射同位体を運ぶことができる。放射能による治療には、本発明の組成物を用いて、同位体、例えば、イットリウムおよびストロンチウムのような治療用同位体を運ぶことができる。

【0219】

X線画像化については、本発明の組成物を用いて、ターゲティングを行う斑とそれを用いられる薬剤との間の放射能密度に差を有する薬剤を運ぶことができる。適当な薬剤は、上記のガスのような低密度材料を含んでなることができるが、更に好ましくは高放射能密度を有する金属、例えば、ヨータラメート、イオキサグレートなどのヨウ素化薬剤、またはビスマス、鉛、ストロンチウムおよびタングステンのような他の高密度材料である。光学的画像化については、組成物を用いて飛行画像化(例えば、反射光を使用)、透過光画像化、光干渉断層撮影法(optical coherence tomography)並びに他の光学的画像化法の計測を行うことができる。ターゲティングリガンドによって斑に運ばれる材料は、斑の音響反射率や吸収率を変化させる。このような材料は、アルゴンまたはネオンのような気体または金属イオンを含んでなることができるが、好ましくはポルフィリン誘導体のような蛍光材料を含んでなり、これを用いることもできる。本発明の組成物で用いることができる他の光感受性薬剤は、米国特許第6,123,923号明細書に記載されており、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

10

【0220】

エラストグラフィ(elastography)は、一般に1MHzを上回る周波数を含むことができる超音波と比較して、ずっと低い周波数の音、例えば、約60KHzを用いる画像化法である。エラストグラフィでは、音エネルギーを通常は組織にあてた後、組織の弾性を決定することができる。高弾性小胞を含む本発明の好ましい態様に関しては、このような小胞が血管斑などに沈着することにより、斑の周りの組織および/または空間の局所的弾性が増加する。次に、この弾性の増加をエラストグラフィで検出することができる。所望ならば、エラストグラフィを、MRIおよび超音波のような他の画像化法と共に用いることができる。

20

【0221】

組合せ型の画像化では、本発明の組成物を用いて、1以上の薬剤を複数のエネルギー供給源との相互作用の目的で運ぶことができる。Hall効果画像化では、組織を磁場中で振動させることができる。このような振動は、例えば、組織を磁場中でインソネート(insonating)することによって超音波画像化により行うことができる。材料の磁性特性、音響特性または電気的特性を変化させる材料を組み込むことによって、Hall効果画像化領域では、ターゲティングしたコントラスト剤が斑からのシグナルを増幅することができる。同様に、光と音を用いているが、このような材料が光学および/または音響活性であるときには、光音響画像化を用いて斑に結合したキャリアーを検出することができる。組合せ型画像化を行うのに適当な方法および装置は、例えば、米国特許第5,558,092号明細書に開示されており、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

30

【0222】

本発明のターゲティングした組成物を用いて、電氣的インピーダンス画像化のための電氣的に活性な材料を運ぶことができる。これらの薬剤には、3-アセチルアミノ-2,4,6-トリヨード安息香酸、3,5-ジアセタミド-2,4,6-トリヨード安息香酸、2,4,6-トリヨード-3,5-ジプロピオンアミド-安息香酸、3-アセチルアミノ-5-((アセチルアミノ)メチル)-2,4,6-トリヨード安息香酸、3-アセチルアミノ-5-(アセチルメチルアミノ)-2,4,6-トリヨード安息香酸、5-アセタミド-2,4,6-トリヨード-N-((メチルカルバモイル)メチル)-イソフタラム酸、5-(2-メトキシアセタミド)-2,4,6-トリヨード-N-[2-ヒドロキシ-1-(メチルカルバモイル)-エチル]-イソフタラム酸、5-アセタミド-2,4,6-トリヨード-N-メチルイソフタラム酸、5-アセタミド-2,4,6-トリヨード-N-(2-ヒドロキシエチル)-イソフタラム酸、2-[2,4,6-トリヨード-3-[(1-オキソブチル)-アミノ]フェニル]メチル]ブタン酸、-(3-アミノ2,4,6-トリヨードフェニル)-エチル-プロパン酸、3-エチル-3-ヒドロキシ2,4,6

40

50

-トリヨードフェニルプロパン酸、3-[[[(ジメチルアミノ)-メチル]アミノ]-2,4,6-トリヨードフェニル-プロパン酸 (Chem. Ber. 93:2347 (1960)参照)、-エチル-(2,4,6-トリヨード-3-(2-オキソ-1-ピロリジニル)-フェニル)-プロパン酸、2-[2-[3-(アセチルアミノ)-2,4,6-トリヨードフェノキシ]エトキシメチル]ブタン酸、N-(3-アミノ-2,4,6-トリヨードベンゾイル)-N-フェニル-アミノプロパン酸、3-アセチル-(3-アミノ-2,4,6-トリヨードフェニル)アミノ]-2-メチルプロパン酸、5-[(3-アミノ-2,4,6-トリヨードフェニル)メチルアミノ]-5-オキソペンタン酸、4-[エチル-(2,4,6-トリヨード-3-(メチルアミノ)フェニル)アミノ]-4-オキソ-ブタン酸、3,3'-オキシビス[2,1-エタンジイルオキシ-(1-オキソ2,1-エタンジイル)イミノ]ビス-2,4,6-トリヨード安息香酸、4,7,10,13-テトラオキサヘキサデカン-1,16-ジイル-ビス(3-カルボキシ-2,4,6-トリヨードアニリド)、5,5'-(アゼラオイルジイミノ)-ビス[2,4,6-トリヨード-3-(アセチルアミノ)メチル-安息香酸、5,5'-(アピドールジイミノ)ビス(2,4,6-トリヨード-N-メチル-イソフタラム酸)、5,5'-(セバコイル-ジイミノ)-ビス(2,4,6-トリヨード-N-メチルイソフタラム酸)、5,5'-[N,N-ジアセチル-(4,9-ジオキシ-2,11-ジヒドロキシ-1,12-ドデカンジイル)ジイミノ]ビス(2,4,6-トリヨード-N-メチルイソフタラム酸)、5,5',5''-(ニトリロ-トリアセチルイミノ)トリス(2,4,6-トリヨード-N-メチル-イソフタラム酸)、4-ヒドロキシ-3,5-ジヨード-フェニルベンゼンプロパン酸、3,5-ジヨード-4-オキソ-1(4H)-ピリジン酢酸、1,4-ジヒドロ-3,5-ジヨード-1-メチル-4-オキソ-2,6-ピリジンジカルボン酸、および5-ヨード-2-オキソ-1(2H)-ピリジン酢酸、およびN-(2-ヒドロキシエチル)-2,4,6-トリヨード-5-[2-[2,4,6-トリヨード-3-(N-メチルアセタミド)-5-(メチルカルバモイル)ベンズアミノ]アセタミド]-イソフタラム酸の生理学的に許容可能な塩がある。

#### 【0223】

他のEIIコントラスト剤としては、MRIコントラスト剤としての使用に提案されたイオン性化合物(例えば、GdDTPAおよびGdDOTA)、特に生理学的に適合性の対イオンとの常磁性金属錯体(好ましくは、キレート錯体)、並びにsimilar錯体 in which錯体形成した金属イオンが反磁性(常磁性はEIIコントラスト剤がそのものとして機能するのに求められる特性ではない)である同様な錯体の塩が挙げられる。好ましい錯体形成した常磁性金属イオンとしては、Gd、Dy、Eu、Ho、Fe、CrおよびMnのイオンが挙げられ、好ましい非常磁性錯体形成イオンとしては、Zn、BiおよびCaのイオンが挙げられる。

#### 【0224】

錯形成剤は、好ましくは線状、分岐状または環状ポリアミンまたはその誘導体のようなキレート化剤であり、例えば、ポリアミノカルボン酸またはポリアミノポリリン酸またはこのような酸の誘導体、例えば、そのアミドまたはエステルである。これに関しては、特にDTPA、DTPA-ビスアミド(例えば、DTPA-ビスメチルアミドおよびDTPA-ビスモルホリド)、DTPA-ビス(ヒドロキシ化アミド)、DOTA、DO3A、ヒドロキシプロピル-DO3A、TETA、OTTA(1,4,7-トリアザ-10-オキサシクロドデカントリカルボン酸)、EHPG、HIDA、PLED、DCTA、およびDCTPが挙げられる。

#### 【0225】

上記の診断用画像化法の他に、本発明の組成物は、様々な治療法に用いることができる。例えば、生物活性薬、例えば、薬剤を本発明の組成物に組込むことができる。有用な生物活性薬としては、例えば、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、アトロバスタチン、エプタスタチンまたはメバスタチンのようなスタチン、白金化合物(例えば、スピロプラチン、シスプラチン、およびカルボプラチン)、メトトレキセート、アドリアマイシン、マイトマイシン、アンサミトシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシド、アラビノシルアデニン、メルカプトポリリシン、ピンクリスチン、プスルファン、クロラムブシル、メルファラン(例えば、PAM、L-PAMまたはフェニルアラニンマスタード)、メルカプトプリン、ミトタン、プロカルバジンヒドロクロリドダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ダウノルピシンヒドロクロリド、ドクソルピシンヒドロクロリド、タキソール、マイトマイシン、プリカマイシン(ミトラマイシン)、アミノグルテチミド、エストラムスチンホスフェートナトリウム、フルタミド、リ

ュープロリドアセテート、メゲストロールアセテート、タモキシフェンシトレート、テストラクトン、トリロスタン、アムサクリン(m-AMSA)、アスパラギナーゼ(L-アスパラギナーゼ)、Erwinaアスパラギナーゼ、エトポシド(VP-16)、インターフェロン -2a、インターフェロン -2b、テニポシド(VM-26)、ピンプラスチンスルフェート(VLB)、ピンクリスチンスルフェート、プレオマイシン、プレオマイシンスルフェート、メトトレキセート、アドリアマイシン、およびアラビノシルのような抗新生物薬、非経口鉄、ヘミン、ヘマトポルフィリンおよびそれらの誘導体のような血液産物、ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド、微生物細胞壁成分、リンホカイン(例えば、リポ多糖類、マクロファージ活性化因子のような細菌性エンドトキシン)、細菌のサブユニット(例えば、ミコバクテリア、コリネバクテリア)、合成ジペプチドN-アセチル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミンのような生物反応調節剤、ケトコナゾール、ニスタチン、グリセオフルピン、フルシトシン(5-fc)、ミコナゾール、アンホテリシンB、リシン、および -ラクタム抗生物質(例えば、スルファゼシン)のような抗真菌薬、生長ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、エストラジオール、ベクロメタゾンジプロピオネート、ベタメタゾン、ベタメタゾンアセテートおよびベタメタゾンナトリウムホスフェート、ベタメタゾンジナトリウムホスフェート、ベタメタゾンナトリウムホスフェート、コルチゾンアセテート、デキサメタゾン、デキサメタゾンアセテート、デキサメタゾンナトリウムホスフェート、フルニソリド、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンアセテート、ヒドロコルチゾンシプロネート(cypionate)、ヒドロコルチゾンナトリウムホスフェート、ヒドロコルチゾンナトリウムスクシネート、メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロンアセテート、メチルプレドニゾロンナトリウムスクシネート、パラメタゾンアセテート、プレドニゾロン、プレドニゾロンアセテート、プレドニゾロンナトリウムホスフェート、プレドニゾロンテブテート、プレドニゾン、トリアンシノロン、トリアンシノロンアセトニド、トリアンシノロンジアセテート、トリアンシノロンヘキサアセトニドおよびフルドロコルチゾンアセテートのようなホルモン、シアノコバラミンネイン酸、レチノイドおよびレチノールパルミテートのような誘導体、および -トコフェロールのようなビタミン、マンガンスーパーオキシドジスムターゼのようなペプチド、アルカリホスファターゼのような酵素、アメレキサノックスのような抗アレルギー薬、フェンプロクモンおよびヘパリンのような血液凝固防止薬、プロプラノロールのような循環薬、グルタチオンのような代謝増強剤、パラ-アミノサリチル酸、イソニアジド、カプレオマイシンスルフェートシクロセリン、エタンブトールヒドロクロリドエチオナミド、ピラジンアミド、リファンピン、およびストレプトマイシンスルフェートのような抗結核薬、アシクロビル、アマンタジンアジドチミジン(AZTまたはZidovudine)、リバビリンおよびビダラビリン水和物(アデニンアラビノシド, ara-A)のような抗ウイルス薬、ジルチアゼム、ニフェジピン、ベラパミル、エリトリトールテトラニトレート、イソソルビドジニトレート、ニトログリセリン(グリセリルトリニトレート)およびペンタエリトリトールテトラニトレートのような抗狭心症薬、フェンプロクモン、ヘパリンのような抗凝固薬、ダブソン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、セファクロル、セファドロキシル、セファレキシン、セフラジンエритроマイシン、クリンダマイシン、リンコマイシン、アモキシシリン、アンピシリンヒヒ、バカンピシリン、カルベニシリン、ジクロキサシリン、シクラシリン、ピクロキサシリン、ヘタシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリンG、ペニシリンV、チカルシリン リファンピンおよびテトラサイクリンのような抗生物質、ジフルニザール、イブプロフェン、インドメタシン、メクロフェナメート、メフェナム酸、ナプロキセン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダック、トルメチン、アスピリンおよびサリチル酸塩のような抗炎症薬、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、メトロニダゾール、キニンおよびメグルミンアンチモネートのような抗原生動物薬、ペニシラミンのような抗リウマチ薬、パレゴリックのような麻酔薬、コデイン、ヘロイン、メタドン、モルフィンおよびアヘンのようなアヘン薬、デスラノシド、ジギトキシン、ジゴキシン、ジギタリンおよびジギタリスのような強心配糖体、アトラクリウムメシレート、ガラミントリエチオダイド、ヘキサフルオレニウムブロミド、メトクリンヨード、パンクロニウムブロミド、ス

10

20

30

40

50

クシニルコリンクロリド(スクサメトリウムクロリド)、ツボクラリンクロリドおよびベクロニウムプロミドのような神経筋遮断薬、アモバルビタール、アモバルビタールナトリウム、アプロバルビタール、ブタバルビタールナトリウム、抱水クロラール、エトクロルピノール、エチナメート、フルラゼパムヒドロクロリド、グルテチミド、メトトリメプラジンヒドロクロリド、メチプピロン、ミダゾラムヒドロクロリド、パラアルデヒド、ペントバルビタール、ペントバルビタールナトリウム、フェノバルビタールナトリウム、セコバルビタールナトリウム、タルブタール、テルマゼパムおよびトリアゾラムのような鎮静薬(催眠薬)、プチバカインヒドロクロリド、クロロプロカインヒドロクロリド、エチドカインヒドロクロリド、リドカインヒドロクロリド、メピバカインヒドロクロリド、プロカインヒドロクロリドおよびテトラカインヒドロクロリドのような局所麻酔薬、ドロペリドール、エトミデート、ドロペリドールを含むフェentanilシトレート、ケタミンヒドロクロリド、メトヘキシタールナトリウムおよびチオペンタールナトリウムのような一般麻酔薬、およびストロンチウム、レニウムヨウダイドおよびイットリウムのような放射性粒子またはイオンが挙げられる。他の適当な生物活性薬としては、カンプトテカアルカロイドおよびその誘導体、例えば、カンプトテシンおよびそのエステルまたはアミド誘導体、特に7、9、10、11および20位の環の位置の誘導体、並びにイリノテカン、トポテカン、およびSN-38が挙げられる。

10

**【0226】**

本発明の組成物で用いることができるその他の生物活性薬は、米国特許第5,770,222号明細書に開示されており、その内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

20

**【0227】**

好ましくは、本発明の方法および組成物に用いられる生物活性薬は、スタチンであり、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、アトロバスタチン、エプタスタチンおよびメバスタチンのスタチン類が一層好ましい。

**【0228】**

本発明の脂質および/または小胞組成物は、様々な適当な方法のいずれかを用いて調製することができる。これらは、脂質組成物およびガスを満たした小胞を包含するガスを含む態様、および脂質組成物およびガス状前駆体を満たした小胞を包含するガス状前駆体を含む態様について以下に別々に記載するが、ガスおよびガス状前駆体を両方とも含んでなる組成物は本発明の一部を形成する。

30

**【0229】**

ターゲットイングリガンドは、上記のような脂質、ポリマーおよび/または補助的安定化材料などが作製される組成物に用いられる材料の1以上に結合することによってガスまたはガス状前駆体を満たした小胞に結合することができる。

**【0230】**

様々な方法が、ミセルおよび/またはリポソームのような小胞組成物を含む組成物の調製に用いることができる。これらの方法としては、例えば、振盪、乾燥、ガス-組込み、噴霧乾燥などが挙げられる。小胞組成物を調製するための適当な方法は、例えば、米国特許第5,469,854号明細書に記載されており、その内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。上記のように、小胞は、好ましくはゲル状態のままである脂質から調製される。

40

**【0231】**

特にミセル組成物の調製に関して、下記の検討を行う。ミセルは、当業者には明らかな様々な通常のみセル調製法のいずれか一つを用いて調製することができる。これらの方法は、典型的には脂質化合物の有機溶媒中での懸濁、溶媒の蒸発、水性媒質への再懸濁、音波処理、および遠心分離を含む。上記の方法、並びに他の方法は、例えば、Canfield et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 189, pp. 418-422 (1990); El-Gorab et al., *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 306, pp.58-66 (1973); 「コロイド界面活性剤」, Shinoda, K., Nakagana, Tamamushi and Isejura, Academic Press, NY (1963) (特に、「ミセルの形

50

成」, Shinoda, Chapter 1, pp. 1-88); 「ミセルおよび高分子系における接触反応」, F endler and Fendler, Academic Press, NY (1975)で検討されている。上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

#### 【0232】

上記のように、小胞組成物はリポソームを含んでなることがある。任意の所定のリポソームでは、(複数の)脂質化合物は単分子層または二分子層の形態であることができ、単または二分子層脂質を用いて1以上の単または二分子層を形成することができる。1を上回る単または二分子層の場合には、単または二分子層は一般に同心である。従って、脂質を用いて、ユニラメラリポソーム(1種類の単分子層または二分子層から構成される)、オリゴラメラリポソーム(2または3種類の単分子層または二分子層から構成される)、またはマルチラメラリポソーム(3を上回る種類の単分子層または二分子層から構成される)を形成することができる。

10

#### 【0233】

様々な方法を、リポソーム組成物の調製に関して用いることができる。従って、リポソームは、当業者に明らかな様々な通常のリポソーム調製法のいずれか一つを用いて調製することができる。これらの手法は、例えば、溶媒透析、Frenchプレス、押出し(凍結-融解を用いるまたは用いない)、逆相蒸発、単純凍結-融解、音波処理、キレート透析、均質化、溶媒浸出、微小乳化、自発的形成、溶媒蒸発、溶媒透析、French受圧器法、制御された洗剤透析などを含み、それぞれが様々な方法での小胞の調製を含んでいる。例えば、Madden et al., 「脂質の化学および物理学」, 1990 53, 37-46を参照されたい。上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。適当な凍結-融解の技術は、例えば、1989年11月8日出願の国際出願連続番号PCT/US89/05040号明細書に記載されており、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。凍結-融解法を含む方法が、リポソームの調製に関して好ましい。リポソームの調製は、溶液、例えば、水性食塩溶液、水性ホスフェート緩衝溶液、または滅菌水で行うことができる。リポソームは、振盪または渦流攪拌を伴う様々な工程によって調製することもできる。これは、例えば、Wig-L-Bug(登録商標)(Crescent Dental, Lyons, IL)、Mixomat(Degussa AG, Frankfurt, ドイツから発売)、Capmix(Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GMBH & Co., Seefeld, Oberay, ドイツから発売)、Silamat Plus(Vivadent, リヒテンシュタインから発売)、またはVibros(Quayle Dental, Sussex, 英国から発売)のような機械的振盪装置を用いることによって行うことができる。Microfluidizer(登録商標)(Microfluidics, Woburn, MA)のような通常の微小乳化装置を用いることもできる。

20

30

#### 【0234】

噴霧乾燥を用いて、ガスを満たした小胞を調製することもできる。この手続きを用いて、脂質を水性環境で予備混合した後、噴霧乾燥してガスを満たした小胞を製造することができる。小胞は、所望なガスの頭隙下に保管することができる。

#### 【0235】

小胞組成物の調製で用いるのに適した多くのリポソーム調製法は、例えば、米国特許第4,728,578号明細書、英国特許出願第GB 2193095 A号明細書、米国特許第4,728,575号明細書、米国特許第4,737,323号明細書、国際出願連続番号PCT/US85/01161号明細書、Mayer et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol.858, pp. 161-168 (1986)、Hope et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 812, pp. 55-65 (1985)、米国特許第4,533,254号明細書、Mayhew et al., Methods in Enzymology, Vol. 149, pp. 64-77 (1987)、Mayhew et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 755, pp. 169-74(1984)、Cheng et al., Investigative Radiology, Vol. 22, pp. 47-55 (1987)、国際出願連続番号PCT/US89/05040号明細書、米国特許第4,162,282号明細書、米国特許第4,310,505号明細書、米国特許第4,921,706号明細書、および「リポソーム技術」, Gregoriadis, G.,監修, Vol. 1, pp. 29-31, 51-67および79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL1984)で検討されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

40

#### 【0236】

50

ガスを含んでなる脂質組成物は、所望ならば、安定化材料を含む水溶液をガスの存在下で攪拌することによって調製することができる。本明細書で用いられる「攪拌」という用語は、水性溶液の任意の振盪運動により、ガスが局所的周囲環境から水性溶液中に導入されるようにすることを意味する。この攪拌は、好ましくは脂質のゲル-液晶相遷移温度を下回る温度で行われる。溶液の攪拌に伴う振盪は、好ましくは小胞組成物、特にガスを満たした小胞を含んでなる小胞組成物を包含する脂質組成物を形成するのに十分な力のものである。振盪は、回転によって、例えば、渦流攪拌、横振り、または上下運動によるものでよい。異なる種類の運動を組み合わせてもよい。また、振盪は、水性脂質溶液を保持している容器を振盪することによって、または容器自身は振盪せずに容器中の水性溶液を振盪することによって行うことができる。

10

#### 【0237】

振盪は、手動でまたは機械によって行うことができる。用いることができる機械式振盪機としては、例えば、VWR Scientific (Cerritos, CA)製のシェーカーテーブルのようなシェーカーテーブル、並びに上記の振盪装置のいずれもが挙げられ、Capmix (Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GMBH & Co., Seefeld, Oberay, ドイツ)が好ましい。ある種の様式の振盪または渦流攪拌を用いて、好ましい粒度範囲内の小胞を作製することができることを見出した。振盪が好ましく、振盪をEspe Capmix機械式振盪機を用いて行うのが好ましい。この好ましい方法によれば、往復運動を用いて脂質組成物、特に小胞組成物を生成させるのが好ましい。運動はアーク状で往復するのが更に一層好ましい。往復速度並びにそのアークは、小胞の形成に関して特に重要であると考えられる。好ましくは、往復または最大サイクルでの振動の数は、毎分約1000-約20,000である。更に好ましくは、往復または振動の数は約2500-約8000であり、約3300-約5000の往復または振動が更に一層好ましい。周波数は攪拌を行う内容物の量によって変化させることができることは勿論である。一般的に言えば、量が増加すれば、周波数を少なくする必要がある。振盪を行うもう一つの手段としては、高速度または圧力下で放射されるガスの作用が挙げられる。

20

#### 【0238】

好ましくは、水性溶液の容積を増加すると、力の総量はこれに応じて増加するとも理解される。激しい振盪は、毎分少なくとも約60回の振盪運動として定義され、好ましい。約60-約300回転/分の渦流攪拌が、更に好ましい。約300-約1800回転/分の渦流攪拌が更に一層好ましい。

30

#### 【0239】

上記の単純振盪法の他に、更に精巧な方法を用いることもできる。このような精巧な方法としては、例えば、液晶振盪ガス滴下法および真空乾燥ガス滴下法、例えば、Unger, et al., 米国特許第5,580,275号明細書に記載されている方法が挙げられ、その内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。多数の様々な手法のいずれを用いることもできるが、本発明で用いられる小胞組成物は好ましくは振盪法を用いて調製される。好ましくは、振盪法は、例えば、Unger, et al., 米国特許第5,542,935号明細書に開示されている手法を用いるEspe Capmix (Seefeld, Oberay, ドイツ)のような機械的振盪装置による攪拌を伴い、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

40

#### 【0240】

ガスを満たした小胞の大きさは、所望ならば、微小乳化、渦流攪拌、押出し、濾過、音波処理、均質化、反復凍結融解サイクル、画定した大きさの細孔からの加圧押出しなどの様々な手続きによって調節することができる。本明細書に記載の方法によって調製したガスを満たした小胞の大きさは、約1 $\mu$ m未満から約100 $\mu$ mを上回るまでの範囲にわたることができる。更に、詳細は下記に説明される押出しおよび滅菌処理の後に、攪拌または振盪により、溶液の残りにおける残留の無水脂質相は実質的にないかまたは最小限になる小胞組成物が得られる(Bangham, A. D., Standish, M.M, & Watkins, J.C., J. Mol. Biol. Vol. 13, pp. 238-252 (1965))。所望ならば、本発明の小胞を、その大きさを更に修正しようとはせずに形成されたままで用いることができる。血管内の使用には、小胞は、好ま

50

しくは直径が約30 $\mu\text{m}$ 未満であり、更に好ましくは約12 $\mu\text{m}$ 未満である。例えば、癌組織のような所定の組織への結合などのターゲティングした血管内での使用については、小胞をかなり小さめにし、例えば、直径が約100nm未満とすることができる。腸または胃腸での使用については、小胞をかなりおおきくし、例えば、ミリメートルまでの大きさとすることができる。好ましくは、小胞を直径が約2 $\mu\text{m}$ -約100 $\mu\text{m}$ となるようにする。

#### 【0241】

ガスを満たした小胞は、フィルターから押し出す単純な方法であって、フィルター細孔径により生成するガスを満たした小胞の粒度分布を制御する方法によって一定の大きさにすることができる。2種類以上のフィルターカスケードまたはスタック、例えば、10 $\mu\text{m}$ フィルターに続いて8 $\mu\text{m}$ フィルターとしたものを用いることによって、ガスを満たした小胞が約7-9 $\mu\text{m}$ の極めて狭い粒度分布を有するものを選択することができる。濾過の後に、これらのガスを満たした小胞は、24時間以上安定なままであることができる。

10

#### 【0242】

整粒または濾過段階は、使用前に組成物滅菌バイアルから取り出すときにフィルター組立体などを用いて行うことができ、更に好ましくは、フィルター組立体を使用中に注射器に組込むことができる。次に、小胞の整粒方法は、円筒部、少なくとも1個のフィルター、および針を含んでなる注射器の使用を含んでなり、円筒部から注射器の円筒部と針の間に取り付けられたフィルターを通して小胞を押し出すことによって、患者に投与する前に小胞を整粒することを含んでなる抽出の段階によって行われる。抽出の段階はまた、小胞を注射器に採取することを含んでなることがあり、ここでフィルターが同じやり方で機能して小胞が注射器に入るときに整粒する。もう一つの代替法は、このような注射器に何らかの他の手段で既に整粒してある小胞を満たすことであり、この場合には、フィルターは、所望な粒度範囲内または所望な最大粒度の小胞だけが次に注射器から押し出すことによって投与されるようにする働きをする。

20

#### 【0243】

ある種の好ましい態様では、小胞組成物を熱滅菌またはフィルター滅菌を行い、フィルターを通して押し出した後に振盪することができる。一般的に言えば、ガスを含んでなる小胞組成物は熱滅菌を行うことができ、ガス状前駆体を含んでなる小胞組成物はフィルター滅菌を行うことができる。ガスを満たした小胞が形成されたならば、それらを濾過して上記のように整粒することができる。ガスおよびガス状前駆体を満たした小胞の形成前にこれらの段階を行うことによって、患者に投与する準備のできた滅菌ガスを満たした小胞が得られる。例えば、バイアルまたは注射器のような混合容器に濾過した脂質組成物を満たすことができ、また組成物を混合容器中オートクレーブ処理などによって滅菌することができる。ガスを組成物に少しずつ加えて、滅菌容器を振盪することによってガスを満たした小胞を形成することができる。好ましくは、滅菌容器は、ガスを満たした小胞が患者に接触する前にフィルターを通過するように配置されたフィルターを備えている。

30

#### 【0244】

脂質化合物の溶液をフィルターを通して押し出す段階は、任意の乾燥材料を粉碎して、水和用の表面積を一層大きく露出することによって未水和材料の量が減少する。好ましくは、フィルターの細孔径は約0.1-約5 $\mu\text{m}$ であり、更に好ましくは、約0.1-約4 $\mu\text{m}$ であり、更に一層好ましくは約0.1-約2 $\mu\text{m}$ であり、更に一層好ましくは、約1 $\mu\text{m}$ である。一般に望ましくない未水和化合物は、不均一な粒度の非晶質凝集塊として生じる。

40

#### 【0245】

滅菌段階は、例えば、超音波またはCTなどの診断画像化のために患者に容易に投与することができる。ある種の好ましい態様では、滅菌は熱滅菌によって、好ましくは、溶液を少なくとも約100 の温度でオートクレーブ処理することによって、更に好ましくは、約100 -約130 、更に一層好ましくは約110 -約130 で、更に一層好ましくは約120 -約130 、および更に一層好ましくは約130 でのオートクレーブ処理によって行うことができる。好ましくは、加熱は少なくとも約1分間、更に好ましくは約1-約30分間、更に一層好ましくは約10-約20分間、および更に一層好ましくは約15分間行う。

50

## 【0246】

所望ならば、上記の押し出しおよび加熱段階を逆にしたり、またはこれらの2段階の一方のみを行うことができる。線への暴露など他の滅菌様式を用いることもできる。

## 【0247】

上記の態様の他に、小胞に含まれるガス状前駆体は、例えば、高温、様々なpHまたは光への暴露によって活性化したときに、例えば、小胞に取り込まれている液体などの液体からガスへ相遷移を行い、膨張して上記のガスを満たした小胞を生成するように処方することができる。この手法は、Unger, et al., 米国特許第5,542,935号明細書およびUnger et al., 米国特許第5,585,112号明細書に詳細に記載されており、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

10

## 【0248】

ガス状前駆体を活性化する好ましい方法は、高温に暴露する方法である。活性化または遷移温度、および類似の用語は、ガス状前駆体の沸点を表し、ガス状前駆体の液体からガス状相への遷移が起こる温度である。有用なガス状前駆体は、沸点が約-100 -約70 の範囲であるものである。活性化温度は、それぞれのガス状前駆体に特有のものである。約37 またはほぼ体温の活性化温度が、本発明に関するガス状前駆体にとって好ましい。従って、好ましい形態では、液体ガス状前駆体は約37 以下で活性化されてガスとなる。ガス状前駆体は、本発明の方法で用いる目的で液または気相であることができる。

## 【0249】

ガス状前駆体を満たした小胞の調製方法は、ガス状前駆体の沸点を下回る温度で行って、液体が例えば、小胞に取り込まれるようにすることができる。更に、この方法をガス状前駆体の沸点で行って、ガスが例えば小胞に取り込まれるようにすることができる。沸点が低温のガス状前駆体については、脂質前駆体を低温に冷却した微小流動化装置を用いて乳化することができる。沸点は、脂質媒質中で溶媒を用いて降下させ、液状の前駆体を用いることもできる。更に、温度を工程中を通して増加させることによって、工程を液体としてのガス状前駆体で開始し、ガスで終了する方法を行うことができる。

20

## 【0250】

ガス状前駆体は、イン・シテューでターゲッティングした組織または流体で、イン・ピボで患者または動物に入ったときに、使用前に、保管中、または製造中にガスを形成するように選択することができる。温度で活性化したガス状前駆体を満たした小胞の製造方法は、ガス状前駆体の沸点を下回る温度で行うことができる。この態様では、ガス状前駆体を相遷移が製造中に起こらないように小胞内に取り込む。代わりに、ガス状前駆体を満たした小胞をガス状前駆体の液相で製造する。相遷移の活性化は、温度が前駆体の沸点を超えられる任意の時間に起こることができる。また、液体のガス状前駆体の液滴中の液体の量を知れば、ガス状状態に達するときの小胞の粒度を決定することができる。

30

## 【0251】

あるいは、ガス状前駆体を用いて、使用前に予備成形する安定なガスを満たした小胞を生成することができる。この態様では、ガス状前駆体を、それぞれのガス状前駆体の液-気相遷移温度を下回る温度で脂質組成物を収容している容器に加える。温度を増加させ、ガス状前駆体と脂質溶液の間にエマルジョンを形成すると、ガス状前駆体は、液体から気体状態へ遷移する。この加熱およびガス形成の結果、ガスは液体混合物上部の頭隙中の空気に取って代わり、ガス状前駆体のガス、周囲ガス(例えば、空気)を取り込む、またはガス状態のガス状前駆体および周囲空気を同時に取り込むガスを満たした小胞を形成する。この相遷移は、コントラスト剤の最適混合および形成に用いることができる。例えば、ガス状前駆体であるペルフルオロブタンを脂質小胞に取り込むことができ、温度がペルフルオロブタンの沸点(4 )を超えて上昇したならば、ペルフルオロブタンガスが小胞に取り込まれる。

40

## 【0252】

従って、ガス状前駆体を選択してガスを満たした小胞をイン・ピボで形成させることができ、またはガスを満たした小胞をイン・シテュー、製造工程中、保管時、または使用前

50

の適当な時間に生成するようにデザインすることができる。水槽、超音波処理装置、または閉じた栓に抗して注射器のプランジャーを引くことによる水圧活性化を用いて、温度感受性ガス状前駆体からターゲティングしたガスを満たした小胞を活性化した後、静脈内注射を行うことができる。

【0253】

水性エマルション中に液体状態のガス状前駆体を予備成形することによる本発明のもう一つの態様として、ガス状状態への遷移を実現したならば、理想気体法則を用いて小胞の最大粒度を評価することができる。ガス状前駆体からガスを満たした小胞を作製するため、ガス相が即時に形成され、新たに形成された小胞中のガスは、自然では一般に水性である液体中への拡散により激減することはほとんどないと仮定する。従って、エマルション中の既知の液体容積から、ガスを満たした小胞の粒度の上限を予測することができる。

10

【0254】

本発明の態様では、画定された粒度の液滴を含む脂質化合物とガス状前駆体の混合物を、特定の温度、例えば、ガス状前駆体の沸点に達したとき、液滴が膨張して画定した粒度のガスを満たした小胞となるように処方することができる。画定した粒度は、現実的な粒度の上限を表しており、理想気体法則は、ガスの溶液中への拡散、ガスの大気への損失、および圧力増加の効果のような因子を説明することはできないからである。

【0255】

液体から気体状態への遷移時に気泡の容積の増加の計算に用いることができる理想気体法則は、下記の通りである：

$$PV = nRT$$

(式中、

Pは大気の圧力であり(気圧)、

Vリットルで表した体積であり(L)、

nは気体のモル数であり、

TはKelvin温度で表した温度であり(K)、

Rは理想気体定数である(22.4 L・気圧/K・モル)。

液体混合物中の液体の体積、密度、および温度を知れば、気体に転換すると、膨張して既知の体積の小胞となる液体前駆体の例えば、モル数での量および体積を計算することができる。気体を満たした小胞へ瞬間的に膨張し且つ膨張時の気体の拡散は無視し得ると仮定すると、算出した体積はガスを満たした小胞の粒度の上限を反映している。

30

【0256】

従って、前駆体液滴が球状である混合物での液体状態の前駆体を安定させるため、前駆体液滴の体積を、式：

$$\text{体積(球状小胞)} = 4/3 r^3$$

(式中、

rは球の半径である)

によって決定することができる。

従って、体積を予測したならば、所望な温度での液体の密度を知れば、液滴中の液体のガス状前駆体の量を決定することができる。一層記述的な用語では、下記の

40

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

を用いることができ、理想気体法則による

$$PV = nRT$$

を置き換えると

$$V_{\text{気体}} = nRT/P_{\text{気体}}、または$$

$$(A) n = 4/3 [ r_{\text{気体}}^3 ] P/RT$$

$$\text{量は } n = 4/3 [ r_{\text{気体}}^3 P/RT ] \cdot MW_n$$

となり、液体体積に転換し直すと、

$$(B) V_{\text{液体}} = [4/3 [ r_{\text{気体}}^3 ] P/RT] \cdot MW_n / D]$$

(式中、Dは前駆体の密度である)

50

となる。

液滴の直径について求めると、

$$(C) \text{ 直径}/2 = [3/4 \cdot [4/3 \cdot [r_{\text{気体}}^3] P/RT] MW_n / D]^{1/3}$$

となり、これは

$$\text{直径} = 2[[r_{\text{気体}}^3] P/RT [MW_n / D]]^{1/3}$$

と変換される。

【0257】

本発明の方法で用いる所望な粒度の小胞のもう一つの調製手段として、および液滴の体積、特に半径について知識が得られれば、適当な粒度に合わせたフィルターを用いてガス状前駆体の液滴を整粒して適当な直径の球とすることができる。

10

【0258】

典型的なガス状前駆体を用いて、画定した粒度、例えば、直径が10 $\mu$ mの小胞を形成することができる。この例では、小胞はヒトの血流で形成され、従って、典型的な温度は37または310Kとなる。圧力が1気圧で(A)の式を用いると、 $7.54 \times 10^{-17}$ モルのガス状前駆体が10 $\mu$ m直径小胞の体積を満たすのに必要となる。

【0259】

上記で計算した量のガス状前駆体、および分子量が76.11、沸点が32.5、20での密度が0.7789g/mLの1-フルオロブタンを用いて、更に計算を行うと、 $5.74 \times 10^{-15}$ gのこの前駆体が10 $\mu$ mの小胞について必要となることが予測される。更に補外を行い、密度を知れば、式(B)から、10 $\mu$ mの上限を有する小胞を形成するには、 $8.47 \times 10^{-16}$ mLの液体前駆体が必要であると予測される。

20

【0260】

最後に、式(C)を用いて、混合物、例えば、半径が0.0272 $\mu$ mまたは対応する直径が0.0544 $\mu$ mの液滴を含むエマルジョンを形成し、10 $\mu$ mの上限を有するガス状前駆体を満たした小胞を作製する。

【0261】

この特別な粒度のエマルジョンは、適当な粒度に設定したフィルターを用いることによって容易に達成することができた。更に、画定した粒度のガス状前駆体液滴を形成するのに必要なフィルターの粒度から分かるように、フィルターの粒度はあらゆる可能性のある細菌性混入部を除去するのに十分であり、従って、滅菌濾過としても同様に用いることができる。

30

【0262】

ガスを満たした小胞の調製のこの態様は、温度によって活性化される総てのガス状前駆体に応用することができる。実際に、溶媒系の凍結点を降下することによって、0を下回る温度で液-気相遷移を行うガス状前駆体を用いることができる。溶媒系を選択して、ガス状前駆体の懸濁液の媒質を提供することができる。例えば、緩衝食塩水に混和性の20%プロピレングリコールは、水単独の凍結点を遙かに下回る凍結点降下を示す。プロピレングリコールの量を増加させまたは塩化ナトリウムのような材料を加えることによって、凍結点を更に降下させることができる。

【0263】

適当な溶媒系は、物理的方法によっても決定することができる。本明細書で以後溶質と表される固体または液体の物質を水を基剤とする緩衝液などの溶媒に溶解すると、凍結点は溶液の組成によって変化する量だけ低下する。従って、Wallによって定義されるように、溶媒の凍結点降下を下記の式：

40

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

(式中、

$x_a$ は溶媒のモル分率であり、

$x_b$ は溶質のモル分率であり、

$H_{\text{融合}}$ は溶媒の融合の熱であり、

$T_0$ は溶媒の通常凍結点である)

50

によって表すことができる。溶媒の通常凍結点は、方程式を解くことによって得ることができる。x<sub>b</sub>がx<sub>a</sub>に比較して小さければ、上記の方程式は下記のように書き直すことができる。

$$x_b = H_{\text{融 合}} / R [T - T_0 / T_0 T] = H_{\text{融 合}} T / RT_0^2$$

上記方程式は、温度変化 TがT<sub>2</sub>に比較して小さいと仮定している。この式は、溶質の濃度をモル濃度m(溶媒1000g当たりの溶質のモル数)で表すことによって更に単純化することができる。従って、この式は、下記のように書き直すことができる。

$$X_b = m / [m + 1000 / m_a] = m M_a / 1000$$

(式中、M<sub>a</sub>は溶媒の分子量である)。

【0264】

従って、分率X<sub>b</sub>の代わりに

$$T = [M_a R T_0^2 / 1000 - H_{\text{融 合}}] m \text{ または}$$

$$T = K_f m$$

(式中、K<sub>f</sub>=M<sub>a</sub>R T<sub>0</sub><sup>2</sup>/1000 - H<sub>融 合</sub>である)

を用いる。K<sub>f</sub>はモル凍結点であり、1気圧の水についてのモル濃度の単位当たり1.86°である。上記の式を用いて、ガス状前駆体を満たした小胞のモル凍結点を正確に決定することができる。従って、上式を応用して凍結点降下を予測し、溶媒凍結温度を適当な値まで下げるのに必要な液体または固体溶質の適当な濃度を決定することができる。

【0265】

温度によって活性化したガス状前駆体を満たした小胞の調製方法は、

(a)ガス状前駆体と、所望ならば、例えば、安定化材料、増粘剤および/または分散剤などの追加材料との水性混合物の渦流攪拌および/または振盪。この方法の場合による変更としては、渦流攪拌または振盪の前のオートクレーブ処理、ガス状前駆体の水性混合物の加熱、混合物/懸濁液を含む容器を空けること、ガス状前駆体を満たした小胞を振盪または自発的に形成し、ガス状前駆体を満たした小胞の懸濁液を冷却すること、およびガス状前駆体の水性懸濁液を約0.22 μmのフィルターを通して押し出すことが挙げられる。あるいは、濾過を小胞のイン・ピボ投与の際に行って、約0.22 μmのフィルターを用いるようにすることができる、

(b)微小乳化であって、これによってガス状前駆体の水性混合物が攪拌によって乳化され、加熱を行って、例えば、小胞を形成した後、患者に投与し、

(c)混合物中のガス状前駆体を攪拌を行いながらまたは行わずに加熱することによって、余り稠密でないガス状前駆体を満たした小胞は膨張によって溶液の最上部に浮遊し、容器中の他の小胞を除き、容器を空けて空気を放出し、

(d)上記の方法のいずれかに密封容器を用いてガス状前駆体の水性懸濁液を保持し、ガス状前駆体の相遷移温度を下回る温度に懸濁液を保持した後、オートクレーブ処理によって温度を場合によっては振盪を行いながら相遷移温度を上回る温度に上昇させ、またはガス状前駆体小胞を自発的に形成させ、これによって密封した容器中の膨張したガス状前駆体が容器中で圧力を増し、ガスを満たした小胞懸濁液を冷却した後、振盪を行うこともできる

を包含する。

【0266】

凍結乾燥は、振盪組込み法の前に水や有機溶媒を除くのに有用である。乾式組込み法を用いて、小胞から水を除くことができる。加温の後、ガス状前駆体を乾燥した小胞(すなわち、乾燥前)に予備取り込みを行うことによって、ガス状前駆体を膨張させて小胞を満たすことができる。小胞を真空に暴露した後に、ガス状前駆体を用いて乾燥した小胞を満たすこともできる。乾燥した小胞はゲル状態から液晶温度までを下回る温度に保持されるので、乾燥室を徐々にガス状状態のガス状前駆体で満たすことができる。例えば、ペルフルオロブタンを用いて、4 (ペルフルオロブタンの沸点)を上回る温度で乾燥した小胞を満たすことができる。

【0267】

10

20

30

40

50

温度活性化ガス状前駆体を満たした小胞の好ましい調製方法は、液体状態を下回る温度からガス状前駆体のガス状相遷移温度まででガス状前駆体の存在下で脂質化合物を有する水性溶液を振盪することを含んでなる。これは、好ましくは脂質の状態から液晶状態相遷移温度を下回る温度で行われる。次に、混合物をガス状前駆体の液体状態からガス状態相遷移温度を上回る温度まで加熱することによって、前駆体が揮発して膨張する。次に、加熱を中止した後、混合物の温度をガス状前駆体の液体状態から気体状態への相遷移温度を下回る温度に下げる。混合物の振盪は加熱段階中または次の混合物を冷却した後におこなうことができる。

【0268】

ガス状前駆体を満たした小胞を調製する他の方法は、例えば、脂質とガス状前駆体の水溶液の振盪、および生成するガス状前駆体を満たした小胞の分離を伴うことができる。 10

【0269】

従来技術の通常の水で満たしたりポソームは、一層柔軟であり従って液晶状態で生物学的系で用いられるので、それらを作製するのに用いられる脂質の相遷移温度を上回る温度で日常的に形成される。例えば、Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. 1978, 75, 4194-4198を参照されたい。対照的に、本明細書に記載のある種の好ましい態様に準じて作製した小胞はガス状前駆体を満たしており、ガス状前駆体はガス形成の後に水性溶液よりも一層圧縮性で且つ従順であるので、更に大きな柔軟性が得られる。

【0270】

本発明によって考えられる方法は、温度活性化可能なガス状前駆体の存在下で脂質を含んでなる水溶液の振盪を提供する。好ましくは、振盪は、短時間内、例えば、約30分間、好ましくは約20分間以内、および更に好ましくは約10分以内にフォームが形成されるような十分強力なものである。振盪は、微小乳化、微小流動化、渦巻き(渦流攪拌によるなど)、横振りまたは上下運動を含む。液体状態でガス状前駆体を添加する場合には、音波処理を上記の振盪方法の他に用いることができる。更に、異なる種類の運動を組み合わせることができる。また、振盪は、水性脂質溶液を保持している容器を振盪することによって、または容器自身は振盪せずに容器中の水溶液を振盪することによって行うことができる。更に、振盪は、手動でまたは機械によって行うことができる。用いることができる機械式振盪機としては、例えば、上記の機械式振盪機が挙げられ、VWR Scientific (Cerritos, CA)製のシェーカーテーブルのようなシェーカーテーブル、並びに上記の振盪装置のいずれが挙げられ、Espe Capmix (Seefeld, Oberay, ドイツ)が好ましい。振盪を行うもう一つの手段としては、高速度または圧力下で放射されるガス状前駆体の作用が挙げられる。 20 30

【0271】

本明細書に記載の方法によれば、ガス、例えば、空気は局所的周囲大気によって提供することもできる。局所的周囲大気としては、密封容器内の大気並びに外部環境が挙げられる。あるいは、例えば、ガスを水性脂質溶液を含む容器に、または水性脂質溶液自身に注入しあるいは添加して、空気以外のガスを供給することができる。空気より軽いガスは一般に密封容器に加えられるが、空気より重いガスは密封したまたは密封していない容器に入れることができる。従って、本発明は、空気および/または他のガスをガス状前駆体と共に同時取り込みすることを含む。 40

【0272】

従って、温度またはpHのような因子を用いてガスを発生させることができる宿主の組織に加えることによって活性化したならば、ガス状前駆体を満たした小胞を本明細書に記載のガスを満たした小胞と実質的に同様に用いることができる。ガス状前駆体は宿主の正常体温附近で液体から気体状態への相遷移を行い、それにより、例えば、宿主のイン・ビボ温度によって活性化されて、その中で気相へ遷移するのが好ましい。例えば、熱、機械的、または任意の手段によって、代替の静脈内投与の前の活性化を用いることもできる。この活性化は、例えば、宿主組織が正常温度が約37のヒト組織であり且つガス状前駆体が37附近で液体からガス状態への相遷移を行う場合に起こる可能性がある。

【0273】

上記のように、オートクレーブまたは滅菌濾過の工程を組み込み段階前または組成物中の温度感受性ガス状前駆体の温度依存性転換の前に行うときには、脂質および/または小胞組成物をこれらの工程によって滅菌することができる。あるいは、1以上の抗殺菌薬および/または防腐剤、例えば、安息香酸ナトリウム、第四アンモニウム塩、ナトリウムアジド、メチルパラベン、プロピルパラベン、ソルビン酸、アスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、クロロブタノール、デヒドロ酢酸、エチレンジアミン、モノチオグリセロール、安息香酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、ソルビン酸カリウム、重亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、および有機水銀塩を組成物の処方に入れることもできる。放射線照射のような他の通常的手段によって行うこともできるこのような滅菌は、安定化した小胞を、侵襲性環境下、例えば、血管内または腹腔内の画像化に用いる場合に必要となる。滅菌の適当な手段は、本発明の開示に基づけば当業者には明らかであろう。

10

#### 【0274】

ポリマーから処方された小胞を含んでなる小胞組成物は、本発明の開示内容を理解すれば、当業者には容易に明らかになるように、様々な方法によって調製することができる。典型的な方法としては、例えば、界面重合、相分離およびコアセルベーション、マルチオリフィス遠心分離調製、および溶媒蒸発が挙げられる。本発明の開示に準じて用いまたは変更してポリマーから小胞を調製することができる適当な処理としては、Garner et al., 米国特許第4,179,546号明細書、Garner, 米国特許第3,945,956号明細書、Cohrs et al., 米国特許第4,108,806号明細書、特開昭62/286534号明細書、英国特許第1,044,680号明細書、Kenaga et al., 米国特許第3,293,114号明細書、Morehouse et al., 米国特許第3,401,475号明細書、Walters, 米国特許第3,479,811号明細書、Walters et al., 米国特許第3,488,714号明細書、Morehouse et al., 米国特許第3,615,972号明細書、Baker et al., 米国特許第4,549,892号明細書、Sands et al., 米国特許第4,540,629号明細書、Sands et al., 米国特許第4,421,562号明細書、Sands, 米国特許第4,420,442号明細書、Mathiowitz et al., 米国特許第4,898,734号明細書、Lencki et al., 米国特許第4,822,534号明細書、Herbig et al., 米国特許第3,732,172号明細書、Himmel et al., 米国特許第3,594,326号明細書、Sommerville et al., 米国特許第3,015,128号明細書、Deasy, 「微小カプセル化および関連薬剤工程」, Vol. 20, Chs. 9 and 10, pp. 195-240 (Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1984)、Chang et al., Canadian J. of Physiology and Pharmacology, Vol 44, pp. 115-129 (1966)、および Chang, Science, Vol. 146, pp. 524-525 (1964)に開示されている処理法が挙げられ、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

20

30

#### 【0275】

好ましい合成プロトコールによれば、小胞は、例えば、Garner et al., 米国特許第4,179,546号明細書、Garner, 米国特許第3,945,956号明細書、Cohrs et al., 米国特許第4,108,806号明細書、英国特許第1,044,680号明細書、および特開昭62/286534号明細書に記載の方法のような熱膨張法を用いて調製することができる。一般的用語では、熱膨張法は、ボイド(キャビティー)に揮発性液体(ガス状前駆体)を含むことができる膨張性ポリマーまたはコポリマーの小胞を調製することによって行うことができる。次に、小胞を加熱して、小胞を可塑化して揮発性液体をガスに転換し、小胞を元の大きさの約数倍まで膨張させる。加熱を停止したときに、熱可塑性ポリマーはその膨張した形状の少なくとも幾らかを保持している。この方法で生成した小胞は特に低密度になりやすいので、好ましい。上記の方法は当該技術分野で周知であり、低密度小胞の調製の熱膨張法と呼ばれることがある。

40

#### 【0276】

熱膨張法に用いられるポリマーは当業者には容易に明らかになるであろうし、上記のモノマーの多くのポリマーまたはコポリマーなどの熱可塑性ポリマーまたはコポリマーを包含する。上記のポリマーまたはコポリマーの好ましいものとしては、下記のコポリマー、すなわちポリビニリデン-ポリアクリロニトリル、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリル

50

-ポリメチル-メタクリレート、およびポリスチレン-ポリアクリロニトリルが挙げられる。最も好ましいコポリマーは、ポリビニリデン-ポリアクリロニトリルである。

【0277】

熱膨張法で用いられる揮発性液体は当業者には周知であろうし、エタン、エチレン、プロパン、プロペン、ブタン、イソブタン、ネオペンタン、アセチレン、ヘキサン、ヘプタンのような脂肪族炭化水素;  $\text{CCl}_3\text{F}$ 、 $\text{CCl}_2\text{F}_3$ 、 $\text{CClF}_3$ 、 $\text{CClF}_2$ - $\text{CCl}_2\text{F}_2$ 、クロロヘプタフルオロ-シクロブタン、および1,2-ジクロロヘキサフルオロシクロブタンのようなクロロフッ化炭素; テトラメチルシラン、トリメチルエチルシラン、トリメチルイソプロピルシラン、およびトリメチルn-プロピルシランのようなテトラアルキルシラン; 並びに上記のペルフルオロカーボンのようなペルフルオロカーボンが挙げられる。一般に、揮発性液体は用

10

【0278】

例えば、合成ポリマーから小胞を製造するために、ビニリデンおよびアクリロニトリルを、上記の修飾したまたは未修飾の文献の処理法の1以上を用いてイソブタン液体の媒質中で共重合して、イソブタンが小胞中に取り込まれるようにすることができる。次に、このような小胞を約80 - 約120 の温度に加熱すると、イソブタンガスが膨張し、これが次に小胞を膨張させる。加熱を停止した後、膨張したポリビニリデンとアクリロニトリルのコポリマー小胞はその膨張した位置に実質的に固定されたままである。生成する低密度小胞は、乾燥時でもまた水性媒質に懸濁した場合でも極めて安定である。イソブタンは、本明細書では単なる例示用液体として用いられており、これらの小胞の合成および加熱時に極めて低密度の小胞の形成に有用な温度で液/気遷移を行う他の液体をイソブタンの代わりに用いることができることが理解される。同様に、ビニリデンおよびアクリロニトリル以外のモノマーを、小胞の調製に用いることができる。

20

30

【0279】

ある種の好ましい態様では、合成ポリマーから処方され且つ本発明の方法で用いることができる小胞は、EXPANCEL 551 DE(登録商標)微小球などがExpancel, Nobel Industries (Sundsvall, スウェーデン)から市販されている。EXPANCEL 551 DE(登録商標)微小球は、イソブタン液体をカプセル化したビニリデンとアクリロニトリルのコポリマーから構成されている。このような微小球は乾燥組成物として発売されており、粒度が約 $50\mu\text{m}$ である。EXPANCEL 551 DE(登録商標)微小球は比重が0.02-0.05に過ぎず、水の密度の1/50-1/20である。

【0280】

ポリマーを基剤とした小胞について上記した手法のいずれかにおいて、当業者が本発明の開示内容を理解したならば明らかなように、小胞の形成の前、中または後にターゲットイングリガンドをポリマーで取り込むことができる。

40

【0281】

脂質および/または小胞組成物の調製と同様に、様々な手法を脂質処方物の調製に利用することができる。例えば、脂質および/または小胞処方物は、脂質化合物、生物活性薬およびガスまたはガス状前駆体の混合物から調製することができる。この場合に、脂質組成物は上記の方法で調製され、組成物は生物活性薬をも含んでなる。従って、例えば、ミセルは生物活性薬の存在下で調製することができる。ガスを含んでなる脂質組成物に関しては、調製は、例えば、ガスを脂質化合物と1以上の追加材料の混合物に直接通じることを含むことがある。あるいは、脂質組成物は脂質化合物とガスまたはガス状前駆体から予

50

備成形することができる。後者の場合には、次に生物活性薬を脂質組成物に加えた後に使用する。例えば、リポソームとガスの水性混合物であって、これに生物活性薬を加え、攪拌を行ってリポソーム処方物を提供するものを調製することができる。ガスおよび/または生物活性薬を満たしたリポソーム小胞は一般に水溶液の最上部に浮遊するので、リポソーム処方物を容易に単離することができる。過剰の生物活性薬を、残りの水溶液から回収することができる。

#### 【0282】

当業者であれば理解されるように、脂質および/または小胞組成物、および/または脂質および/または小胞処方物のいずれを凍結乾燥して保管し、例えば、水性媒質(例えば、滅菌水、リン酸緩衝液、または水性食塩溶液)で、激しく攪拌を加えながら再構成することができる。凍結乾燥の結果としての脂質および/または小胞の凝集または融合を防止するため、このような融合または凝集が起こるのを防止する添加剤を包含することが有用であることがある。用いることができる添加剤としては、ソルビトール、マンニトール、塩化ナトリウム、グルコース、トレハロース、ポリビニルピロリドンおよびポリ(エチレングリコール)(PEG)、例えば、PEG400が挙げられる。これらおよび他の添加剤は、U.S. Pharmacopeia、USP XXII、NF XVII、The United States Pharmacopeia、The National Formulary、United States Pharmacopeial Convention Inc.、12601 Twinbrook Parkway、Rockville、MD 20852のような文献に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。凍結乾燥製剤は、一般に保管寿命が長いという利点を有する。

10

20

#### 【0283】

上記のように、ガスおよび/またはガス状前駆体を満たした小胞を含む本発明の組成物は診断画像化、例えば、超音波画像化(US)、コンピューター断層撮影法(CT)による画像化、例えば、CT血管造影法(CTA)による画像化、磁気共鳴(MR)画像化、磁気共鳴血管造影法(MRA)、核医学、光学的画像化およびエラストグラフィーのコントラスト剤として有用である。

#### 【0284】

本発明によれば、患者の1以上の部位を画像化する方法が提供される。本発明は、患者の病気に罹っている組織の存在または非存在を診断する方法も提供する。本発明の方法は、脂質および/または小胞組成物の形態のコントラスト媒体を患者に投与することを含む。患者を、超音波画像化などの診断画像化を用いて掃引して、患者の内部領域の可視画像を得る。この方法は、心臓領域の画像を提供し且つこれによって血管斑の存在を検出しおよび/または特性決定するのに特に有用である。本発明の方法は、生物活性薬を患者の内部領域に運ぶことに関して用いることもできる。

30

#### 【0285】

当業者であれば理解されるように、本発明の脂質および/または小胞組成物は、様々なやり方で、すなわち非経口、経口、または腹腔内に投与することができる。非経口投与が好ましく、下記の経路、すなわち、静脈内、筋肉内、間質内、動脈内、腔内、皮下、眼球内、滑液内、経皮などの経上皮、吸入による肺、眼、舌下および口内、眼などの局所、皮膚、眼、直腸、および通気による鼻内吸入による投与が挙げられる。静脈内投与は、非経口投与の経路の中で好ましい。投与を行う有用な投薬量および特定の投与法は、年齢、体重および特定の哺乳類、および掃引を行う領域、および用いられる特定のコントラスト剤によって変化する。典型的には、投薬量は低レベルから開始して、所望なコントラスト増加が得られるまで増加する。脂質組成物の様々な組合せを用いて、粘度、浸透圧または嗜好性などの特性を所望なように変更することができる。本発明の画像化法を行う場合に、コントラスト媒体を単独でまたは診断、治療または他の薬剤と組み合わせて用いることができる。このような他の薬剤としては、香味または着色材料のような賦形剤が挙げられる。用いられるCT画像化法は通常のものであり、例えば、「コンピューターによる身体の断層撮影法」、Lee, J.K.T., Sagel, S.S.、および Stanley, R.J.監修、1983, Ravens Press, New York, N.Y.、特に「物理的原理および装置」、Ter-Pogossian, M.M.、および

40

50

「処理方法」, Aronberg, D.J.という標題の最初の2章に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

【0286】

診断応用の場合には、超音波エネルギーを患者の少なくとも一部分に当てて、標的組織を画像化する。次に、患者の内部領域の可視画像を得て、疾患組織の存在または皮存在を突き止めることができる。超音波に関しては、第二の調和画像化およびゲートド画像化などの超音波画像化法が当該技術分野で周知であり、例えば、Uhlendorf, 「超音波コントラスト画像化の物理学:線形範囲における散乱」, IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control, Vol. 14(1), pp. 70-79 (1994)、および Sutherland, et al., 「カラードプラー心筋画像化:心筋機能の評価のための新技術」, Journal of the American Society of Echocardiography, Vol. 7(5), pp. 441-458 (1994)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。超音波は、通常のプロープ、例えば、経皮体外超音波を用いて、またはカテーテルを取り付けた変換器、例えば、動脈内法からのものを用いて行うことができる。超音波の周波数は約20KHz-約100MHz(およびその範囲およびその特定の値の総ての組合せおよび下位組合せ)の範囲であることができるが、更に好ましくは約500KHz-約30MHzで変化し、更に一層好ましくは約1MHz-約20MHzまでである。Grayスケール、カラーDoppler、Power Doppler、パルス反転Dopplerおよび他の超音波手法を用いることができる。一般に、コントラスト剤は疾患状態で活性化斑、特に炎症性細胞が活性化である斑の鮮明度を向上させる。

10

【0287】

超音波を、診断および治療目的の両方に用いることができる。診断用超音波では、超音波または超音波のパルスの列を変換器を用いて加えることができる。超音波は、一般に連続的よりはパルス状であるが、所望ならば、連続的であることができる。従って、診断用超音波は一般にエコーのパルスの適用を含み、その後聴取期間中に超音波変換器が反射シグナルを受け取る。和音、超和音、または下位和音を用いることができる。2x周波数(但し、xは副次的周波数である)を受け取る第二の和音方式を好都合に用いることができる。これはバックグラウンド材料からのシグナルを減少させ且つ血餅などの所望な部位にターゲティングすることができる本発明のターゲティングしたコントラスト媒体を用いる変換器からのシグナルを増強する働きをすることができる。奇数和音シグナル、例えば、3xまたは5xのような他の和音シグナルも、同様にこの方法を用いて受け取る。下位和音シグナル、x/2およびx/3を受けて処理を行い、画像を形成させることもできる。

20

30

【0288】

本発明によって得られる新規且つ特に有利な特徴は、超音波技術が血管斑の検出のためだけでなく、斑の治療にも同様に用いられることである。例えば、ガスを満たした小胞を含む態様では、超音波エネルギーを増幅して、斑に濃縮することができる。この超音波エネルギーの増幅と濃縮を用いて、斑を溶解することができる。一般的に言えば、これは、超音波エネルギーのパルスを適当なエネルギーおよび周波数で当てることによって行うことができる。

【0289】

パルス法の他に、連続波の超音波、例えば、Power Dopplerを用いることができる。これは、堅い小胞、例えば、ポリメチルメタクリレートから処方した小胞を用いる場合に特に有用である。この場合に、比較的高エネルギーのPower Dopplerを小胞に共鳴させることによって、それらの破裂を促進することができる。これは、加えた超音波の下位和音または超和音範囲にあり、または幾つの場合には、同じ周波数であることができる音響放射を生じることができる。この方法で放出される音響シグネチャのスペクトルがあり、このようにして用いられる変換器が音響放射を受けて、血餅の存在などを検出することができる。更に、小胞破裂の方法を用いて、運動エネルギーを例えば斑の表面に移し、斑の溶解を促進しおよび/または生物活性薬、特にスタチンを放出することができる。従って、治療的処置は、診断および治療用超音波の組合せ中に行うことができる。スペクトル状Dopplerを用いることもできる。一般に、診断用超音波からのエネルギーレ

40

50

ベルは小胞の破裂を促進し且つ生物活性薬の放出および細胞による摂取を促進するには不十分である。上記のように、診断用超音波は、音の1以上のパルスの適用を含むことがある。パルスの中断中に、反射した音シグナルを受け取って、解析することができる。診断超音波に用いられるパルスの数が限定されているため、検討を行おうとする組織に運ばれる有効エネルギーが限定される。

#### 【0290】

高めのエネルギー超音波、例えば、治療用超音波装置が発生する超音波は、一般に小胞種を破裂させることができる。一般に、治療用超音波装置は、超音波で治療を行う組織の面積によって約10-約100%の効率サイクルを用いる。一般に多量の筋肉質量を特徴とする身体の一部、例えば、背中および大腿部、並びに高度に血管化した組織、例えば、心臓組織は、例えば、約100%までのより大きな効率サイクルが求められることがある。

10

#### 【0291】

治療用超音波では、連続波の超音波を用いて、高エネルギーレベルを運ぶ。小胞の破裂には連続波の超音波が好ましいが、音エネルギーはパルス状であってもよい。パルス状音エネルギーを用いるときには、音は一般に一度に約8-約20以上のパルスのエコー列の長さでパルス状になる。好ましくは、エコー列の長さは、一度に約20パルスである。更に、用いられる音の周波数は、約0.025-約100メガヘルツ(MHz)で変化することができる。一般に、治療用超音波の周波数は、好ましくは約0.75-約3MHzの範囲にあり、約1-約2MHzが一層好ましい。更に、エネルギーレベルは、約0.5ワット(W)/平方センチメートル( $\text{cm}^2$ )-約5.0  $\text{W}/\text{cm}^2$ の範囲であることができ、約0.5-約2.5  $\text{W}/\text{cm}^2$ のエネルギーレベルが好ましい。高体温を伴う治療用超音波のエネルギーレベルは、一般に約5  $\text{W}/\text{cm}^2$ -約50  $\text{W}/\text{cm}^2$ である。極めて小さな小胞、例えば、直径が約0.5  $\mu\text{m}$ 未満の小胞については、高周波数の音が一般に好ましい。これは、小さな小胞の方が高周波数の音でより効果的に音エネルギーを吸収することができるからである。例えば、約10MHzを上回る極めて高い周波数を用いると、音エネルギーは一般に流体および組織を限定された深さまでしか透過しない。従って、音エネルギーの外部適用は、皮膚や他の表面組織について適することがある。しかしながら、深さのある構造に対しては、超音波エネルギーの焦点を合わせて、エネルギーが焦点ゾーン内に優先的に向けられるようにすることが必要である。あるいは、超音波エネルギーは、間質プローブ、血管内の超音波カテーテル、管腔内カテーテルを介して加えられることがある。このようなプローブまたはカテーテルを、例えば、食道で用いて、食道癌の診断および/または治療を行うことができる。上記の治療での使用の他に、本発明の組成物を、食道癌に関してまたはアテローム性動脈硬化症の治療のために冠状動脈で、並びに例えば、米国特許第5,149,319号明細書に記載の治療用途で用いることができ、上記特許明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

20

30

#### 【0292】

超音波の2つの周波数を用いる治療用超音波装置を用いることができる。第一の周波数はxであることができ、第二の周波数は2xであることができる。好ましい形態では、装置は、第一および第二の周波数が単一の焦点ゾーンに収斂するようにデザインされる。次に、装置の焦点ゾーンを、ターゲティングした組織内の標的組成物、例えば、ターゲティングした小胞組成物に向けることができる。この超音波装置は、超音波エネルギーのxおよび2x周波数を同時に当てることによって第二の調和治療を提供することができる。小胞を含む超音波の場合には、この第二調和治療では単一周波数を含む超音波エネルギーと比較して小胞を破壊しやすくすることができると考えられる。また、好ましい周波数範囲が小胞の基本調和周波数中にあることができると考えられる。この装置では、低めのエネルギーを用いることもできる。小胞の第二調和治療に関連して用いることができる超音波装置は、例えば、Kawabata, K. et al., *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 3, pp. 1-5 (1996)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

40

#### 【0293】

レーン光線または他の適当な光源と共に用い、且つ光増感剤を用いるため、本発明の方

50

法および組成物を用いて、斑の光除去治療を行うこともできる。

【0294】

所望な安定化した小胞レベルを形成するのに必要な脂質の濃度は用いられる脂質の種類によって変化し、日常実験によって容易に決定することができる。例えば、好ましい態様では、本発明の方法によって安定化した小胞を形成するのに用いられる1,2-ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)の濃度は、約0.1mg/ml-約30mg/ml食塩水溶液であり、更に好ましくは約0.5mg/ml-約20mg/ml食塩水溶液であり、最も好ましくは約1mg/ml-約10mg/ml食塩水溶液である。好ましい態様で用いられるジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)の濃度は約0.1mg/ml-約30mg/ml食塩水溶液であり、更に好ましくは約0.5mg/ml-約20mg/ml食塩水溶液であり、最も好ましくは約1mg/ml-約10mg/ml食塩水溶液である。患者に投与される組成物の量は、変えることができる。典型的には、静脈内投与量は70Kgの患者に対して約10mL未満とすることができ、更に低投与量が好ましい。

10

【0295】

上記の方法の他に、ターゲティングしたコントラスト媒体を調製するもう一つの態様は、少なくとも1種類の生体適合性脂質とガス状前駆体を組合せ、ガスを満たした小胞が形成されるまで攪拌し、上記ガスを満たした小胞にターゲティングリガンドを加えて、ターゲティングリガンドを上記ガスを満たした小胞に共有結合または非共有結合によって結合させ、ガスを満たした小胞とターゲティングリガンドを含んでなるコントラスト剤が生じるまで攪拌を行うことを含んでなる。ターゲティングリガンドを加える前にガスを満たした小胞が形成されるまで攪拌を行うよりはむしろ、使用時までガス状前駆体はガス状前駆体のままでいた方がよい。すなわち、ガス状前駆体を用いてコントラスト媒体を調製し、前駆体を例えば、温度によってイン・ビボで活性化するのである。

20

【0296】

あるいは、コントラスト媒体の調製方法は少なくとも1種類の生体適合性脂質とターゲティングリガンドを組合せ、ターゲティングリガンドを上記脂質に共有結合または非共有結合によって結合させ、ガス状前駆体を加え、ガスを満たした小胞とターゲティングリガンドを含んでなるコントラスト媒体が生じるまで攪拌を行うことを含んでなることができる。更に、ガス状前駆体を加えて、使用時までガス状前駆体のままでいることもできる。すなわち、ガス状前駆体を用いて、イン・ビボで使用のために生じるガス状前駆体を満たした小胞とターゲティングリガンドを有するコントラスト媒体を調製するのである。

30

【0297】

あるいは、ガス状前駆体を用いて、安定なガスを満たした小胞を、使用前に予備成形を行うターゲティングリガンドを用いて作製することができる。この態様では、ガス状前駆体とターゲティングリガンドを、それぞれのガス状前駆体の液-気相遷移温度を下回る温度で懸濁および/または安定化媒質を収容する容器に加える。次に、温度が超過し、エマルションがガス状前駆体と液体溶液の間に形成すると、ガス状前駆体は液体からガス状態へ遷移する。この加熱およびガス形成の結果、ガスは液体混合物上部の頭隙中の空気にとって代わり、ガス状前駆体のガス、周囲ガス、例えば、空気を取り込む、またはガス状態のガス状前駆体および周囲空気を同時に取り込むガスを満たした小胞を形成する。この相遷移は、コントラスト剤の最適混合および形成に用いることができる。例えば、ガス状前駆体であるペルフルオロブタンを生体適合性脂質または他の安定化化合物に取り込むことができ、温度が4 (ペルフルオロブタンの沸点)を超えて上昇したならば、安定化化合物が取り込まれたフルオロブタンガスが生成する。追加例として、ガス状前駆体フルオロブタンを、グリセロールまたはプロピレングリコールのような乳化および安定化剤を含む水性懸濁液に懸濁させ、市販の渦流攪拌装置で渦流攪拌することができる。攪拌をガス状前駆体が液体である十分低い温度で開始し、試料の温度が液体からガス状態への相遷移温度を過ぎて上昇するので、継続する。このようにして、前駆体は微小乳化工程中にガス状態に転換する。適当な安定化剤の存在下で、意外なほど安定なガスを満たした小胞とターゲティングリガンドが生成する。

40

50

## 【0298】

従って、ガス状前駆体を選択して、ガスを満たした小胞をイン・ビボで形成することができ、または製造工程中、保管時、または使用前のあるときにガスを満たした小胞をイン・シチューで生成するようにデザインすることができる。

## 【0299】

本発明の開示内容を理解すれば、出発材料として用いられる脂質、タンパク質、ポリマーおよび他の安定化化合物、または小胞最終生成物は、本発明によって考えられる方法に暴露する前および後に処理することができることは当業者によって理解されるであろう。例えば、安定化化合物、例えば、生体適合性脂質を水和した後、凍結乾燥し、凍結-融解サイクルによって処理を行い、または単に水和することができる。好ましい態様では、脂質を水和した後に凍結乾燥し、または水和した後凍結-融解サイクルを通して処理した後、凍結乾燥し、その後ガス状前駆体を満たした小胞を形成する。

10

## 【0300】

本発明によって考えられる方法によれば、空気のような、これに限定されないガスの存在は、局所的周囲大気によっても提供される。この局所的周囲大気は密封容器中では大気がよく、または密封されていない容器では、外部環境でよい。あるいは、例えば、ガスを水性脂質溶液を含む容器に注射しあるいは加え、または水性脂質溶液自身に注射して空気以外のガスを提供することができる。空気より重くないガスは密封容器に加えることができ、空気より重いガスは密封したまたは密封されていない容器に加えることができる。従って、本発明は、空気および/または他のガスをガス状前駆体と一緒に同時取り込みを包

20

## 【0301】

安定化化合物を扱う節で既に上記したように、本発明によって考えられる好ましい方法を、用いられる脂質のゲル状態から液晶状態相遷移温度を下回る温度で行うことができる。「ゲル状態から液晶状態相遷移温度」とは、脂質二分子層がゲル状態から液晶状態へ転換する温度を意味する。例えば、Chapman et al., J. Biol. Chem. 1974, 249, 2512-2521を参照されたい。

## 【0302】

従って、上記の安定化した小胞前駆体は、宿主の組織に適用し、温度またはpHのような因子を用いてガスを発生させることによって活性化したならば、本発明で用いられる他の安定化小胞と同じ方法で用いることができる。この態様は、ガス状前駆体が上記宿主の正常体温附近で液体からガス状態への相遷移を行うことによって、上記宿主の組織の温度によって活性化され、ガス状相へ遷移するものであるのが好ましい。更に一層好ましくは、この方法は、宿主組織が約37の正常温度を有するヒト組織であり、ガス状前駆体が37附近で液体からガス状態への相遷移を行うものである。

30

## 【0303】

本発明で用いられる安定化したガスを満たした小胞の調製を含む上記態様の総ては、これらの工程をガス滴下段階前または懸濁液中での温度感受性ガス状前駆体の温度依存性ガス転換の前に行うときには、オートクレーブまたは滅菌濾過によって滅菌することができる。あるいは、安息香酸ナトリウム、総ての第四アンモニウム塩、ナトリウムアジド、メチルパラベン、プロピルパラベン、ソルビン酸、アスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、クロロブタノール、デヒドロ酢酸、エチレンジアミン、モノチオグリセロール、安息香酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、ソルビン酸カリウム、重亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、および有機水銀塩のような1以上の抗殺菌剤および/または防腐剤を、コントラスト媒体の処方物に包含させることができる。放射線照射のような他の通常的手段によって行うこともできるこのような滅菌は、安定化した小胞を、侵襲性環境下、例えば、血管内または腹腔内の画像化に用いる場合に必要となる。滅菌の適当な手段は、当業者には明らかなように、安定化したガスを満たした小胞およびその使用の本明細書の記載によって指示される。コントラスト媒体は、一般に水性懸濁液として保管されるが、乾燥した小胞または乾燥した脂質球の場合には、コン

40

50

トラスト媒体は、使用前に再構成する準備のできた乾燥粉末として保管することができる。

【0304】

本発明の新規組成物、特に小胞組成物は診断画像化におけるコントラスト媒体として用いられ、診断画像化が用いられる総ての部位での使用にも適している。しかしながら、安定化した小胞は、灌流画像化に特に有用である。

【0305】

診断画像化は、患者の体内領域を可視化する手段である。診断画像化としては、例えば、超音波(US)、磁気共鳴画像化(MRI)、核磁気共鳴(NMR)、コンピューター断層撮影法(CT)、電子スピン共鳴(ESR)、コントラスト媒体が放射性材料を含む場合には核医学、および特に蛍光コントラスト媒体を有する光学的画像化が挙げられる。診断画像化は、本発明の方法による小胞の破裂の促進をも含む。例えば、超音波を用いて、小胞を可視化し、ある種の組織における小胞の局在化を確かめることができる。更に、超音波を用いて、小胞が組織および/または受容体の目的地などの目標に達したならば小胞の破裂促進し、これにより生物活性薬および/または診断薬を放出することができる。

10

【0306】

本発明によれば、一般におよび/または患者の疾患組織の存在の具体的診断において、患者を画像化する方法が提供される。本発明の画像化法は、本発明のコントラスト媒体を患者に投与した後、例えば、超音波、コンピューター断層撮影法、および/または磁気共鳴画像化を用いて患者を掃引して患者の内部領域および/またはその領域における任意の疾患組織の可視画像を得ることによって行うことができる。患者の領域とは、患者全体または患者の特定の部位または部分を意味する。コントラスト媒体は、組織、特に血管斑の画像化の提供に特に有用であるが、当業者には容易に明らかになるように、血管系の画像化または他の方法など一層広く用いることもできる。心臓血管領域は、この用語が本明細書で用いられるように、心臓と心臓から直接出入りする血管によって画定される患者の領域を表す。本明細書で用いられる血管系という用語は、身体、または身体の臓器または一部の血管(動脈、静脈など)を表す。患者は、任意の種類の哺乳類であることができるが、最も好ましくは、ヒトである。

20

【0307】

本発明の磁気共鳴画像化法を行う場合に、コントラスト媒体は単独で用いてもまたは他の診断薬、治療薬または他の薬剤と組み合わせて用いることもできる。このような他の薬剤としては、賦形剤、例えば、香味料または着色料が挙げられる。用いられる磁気共鳴画像化法は通常のものであり、例えば、D.M. Kean and M.A. Smith, 「磁気共鳴画像化:原理および応用」, (William and Wilkins, Baltimore 1986)に記載されている。考えられるMRI法としては、核磁気共鳴(NMR)および電子スピン共鳴(ESR)が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい画像化法はNMRである。

30

【0308】

本発明を、下記の例で更に説明する。例1-3は実際の例であり、例4-6は予言的例である。これらの例は例示を目的とするものであり、本発明の範囲を限定しようとするものではない。

40

【実施例】

【0309】

例1

この例は、本発明の範囲内のターゲティングしたガスを満たした小胞の調製、並びにこれらの標的小胞対従来技術の小胞の比較に関する。

【0310】

本発明の範囲内のターゲティングしたガスを満たした脂質小胞の組成物(本明細書では、組成物1Aと表す)を、95%ジパルミトイルホスファチジルコリンと5%ジパルミトイルホスファチジルセリンを用いて調製した。この脂質混合物を凍結乾燥し、8:1:1規定食塩水:プロピレングリコール:グリセロールに5mg/mlで再懸濁した。この懸濁液に、リサミン口

50

ーダミンを標識した10%ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンを混合した。生成する混合物を2 mL血清バイアルに小分けして、頭隙をペルフルオロブタンで置換した。コントロールとして、非ターゲティンググリポソーム(本明細書では、組成物1Bと表す)を、82%ジパルミトイルホスファチジルコリン、10%ジパルミトイルホスファチジン酸および蛍光標識を有する8%ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン-PEG5000から構成された混合物からも調製した。

#### 【0311】

次に、アテローム性動脈硬化症のウサギモデルを下記の実験で用いた。実験的アテローム性動脈硬化症病変を、16羽のNew Zealand Whiteウサギで横隔膜下大動脈のバルーン脱内皮化(de-endothelialization)および12週間の高脂血症食餌によって生じさせた。大動脈のコントロール部分は比較用に用いた。上記で調製したターゲティングおよび非ターゲティング小胞を、アテローム性動脈硬化症ウサギにボラス投与した。動物を、ボラス投与から15分後にPhillips SONOS 5500診断用超音波装置を用いて画像化した。

10

#### 【0312】

組成物1Aを用いたところ、アテローム性動脈硬化症領域が著しく増強されたが、組成物1Bでは、向上は全く見られなかった。これは、取り込まれたマクロファージ上のホスファチジルセリン受容体へのターゲティングした小胞と一致している。しかしながら、マクロファージは、組織学的解析で、組成物1Aで処理した試料よりは組成物1Bで処理したものでローダミンが多く含まれていた。この不一致は、ベジル化脂質による組成物1Bの循環寿命が大きいことによって説明される。この仮定は、20%DPPS、10%DPPE-PEG5000および70%DPPCを含むローダミン標識した脂質小胞である変更処方物がマクロファージで組成物1Bと同様な摂取を示したときに証明された。

20

#### 【0313】

##### 例2

例1の手続きを、70%DPPC、20%DPPSおよび10%DPPE-PEG5000にDPPE-リサミンローダミンをドープしたのから構成される小胞組成物(以後、組成物2Aと表す)を用いて繰り返した。2羽のウサギの一方が大きなアテロームを有し、他方が数個の小さなアテロームを有するものを組成物2Aおよび組成物1B(コントロール)で画像化した。ウサギは、いずれもコントロールに比較して組成物2Aでかなり大きな超音波コントラスト増強を示したが、小さな斑を有する動物では差は余り顕著でなかった。組織病理学的解析時に、ローダミン-リサミンで標識した小胞を、両動物のマクロファージに加えた。組成物1Bは、いずれのウサギにも加えなかった。

30

#### 【0314】

##### 例3

この例は、本発明の範囲内にある音響活性脂肪球(lipospheres)および生物活性薬の処方物の調製に関する。

#### 【0315】

パクリタキセル(2g)および大豆油(3g)を、渦流ミキサーで攪拌した。この混合物に、70モル%DPPC、10モル%DPPSおよび8モル%DPPE-PEG5000(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)の脂質配合物を加えた。混合物を50 で10分間攪拌した後、規定食塩水(200 mL)+1%Tween-80を入れた容器に移し、Microfluidizer (10X)で16,000psiで乳化した。材料を、1.5mLバイアルに1.0ml分量に小分けした。バイアルを真空にして、頭隙にペルフルオロブタンを満した。生成する生成物を約0.9重量%パクリタキセルを含む油を満した脂肪球中に薬剤を懸濁したものであった。バイアルを密封し、Espe Capmix (Hamburg, Germany)上に置き、2800rpmで2分間攪拌した。最終生成物を濾過して、2 $\mu$ mを上回る粒子の小さなサブグループを除去することができる。

40

#### 【0316】

##### 例4

パクリタキセルの代わりにロバスタチン(2.5 g)を用いることを除き、例を繰り返した。

50

## 【0317】

## 例5

この例は、1,3ジ-(メトキシポリエチレングリコール)<sub>n</sub>-グリセロールホスホセリンであって、本発明の範囲内のペジル化ターゲットングリガンドであるものの調製に関する。

## 【0318】

段階A: 1,3-ジ-(メトキシ-ポリエチレングリコール)<sub>n</sub>-グリセロールホスフェートの調製

2-ホスホグリセロール(Aldrich Chemical, Madison, Wis.)を、ジメチルホルムアミド(Mallinckrodt, St. Louis, Mo.)中のトリ-ブチルアミン(Aldrich, Madison, Wis.) 2当量に加える。次に、溶解した溶液をロータリーエバポレーターおよび真空ポンプで真空濃縮し、油状生成物を得る。油状生成物を次にジメチルホルムアミドに再溶解し、この溶液に1当量のメトキシ-PEG3400-CONHSエステル(Shearwater Polymers, Huntsville, Ala.)を加える。混合物を一晩攪拌する。次に、反応混合物を真空濃縮した後、水に溶解する。次に、混合物を、 $\text{HCO}_3^-$ 型で生成したDEAE-Sephadex G-25アニオン交換カラムに徐々に加える。希薄試料をカラムに載せた後、カラムを蒸留した脱イオン水で洗浄する。次に、カラムを、混合室で0.01Mトリエチルアンモニウム重炭酸塩( $\text{TEA-HCO}_3^-$ )を含んでなる線形グラデーションを用いて展開し、保存室における1.0M  $\text{TEA-HCO}_3^-$ を濃縮する。試料を適当な大きさの分量(管)で集め、希硫酸中のモリブデン酸ナトリウムで試験した;希リン酸指示薬。次に、モリブデン酸塩を加えたときに青色になる適当な画分を集めて、真空で濃縮した。次いで、生成物をメタノールで洗浄し、真空で再濃縮して、白色沈澱を得る。生成物を次に少量のメタノールに溶解した後、飽和の水性ヨウ化ナトリウム(Mallinckrodt, St. Louis, Mo.)を滴加する。次に、沈澱を遠心分離とメタノール傾瀉によって集める。メタノール洗浄に次いで繰り返し遠心分離を行うと、1,3-ジ-(メトキシポリエチレングリコール)<sub>n</sub>-グリセロールホスフェートのナトリウム塩が得られる。

## 【0319】

段階B: 1,3ジ-(メトキシ-ポリエチレングリコール)<sub>n</sub>-グリセロールホスホセリンの調製

段階Aの生成物に、DMF中トリブチルアミン2当量を加えた後、真空濃縮する。次に、油状生成物(1,3ジ-(メトキシ-ポリエチレングリコール)<sub>n</sub>-グリセロールホスフェートのトリブチルアンモニウム塩)を乾燥DMFに溶解し、0℃まで冷却した後、カルボニルジイミダゾール(CDI)(Aldrich, Milwaukee, Wis.) 1当量を加える。溶液を1時間攪拌した後、Fmoc-セリンをDMFに溶解したものの2当量を滴加する。添加の後、溶液を室温まで平衡にし、攪拌を4時間継続する。攪拌後、ピペリジン20容積%(反応混合物5ml毎に1ml)を加え、溶液を更に20分間攪拌する。次に、混合物真空濃縮した後、水に溶解し、アニオン交換クロマトグラフィーにより再度精製する。ホスホセリン類似体の精製は、逆相クロマトグラフィーによって得られる。

## 【0320】

## 例6

この試料は、ターゲットングした生物接合体を含む小胞の調製に関し、これは本発明の範囲内にある。

## 【0321】

アテローム性動脈硬化症斑についてターゲットングした小胞を、DPPSを例5の最終生物接合体生成物に代えることを除き、例2の組成物2Aで用いられる脂質から構成される脂質配合物から調製する。

## 【0322】

## 例7

この例は、本発明の範囲内にあるホスホセリン生物接合体を含む音響活性脂肪球の調製に関する。

## 【0323】

10

20

30

40

50

アテローム性動脈硬化症斑についてターゲティングした小胞を、DPPSを例5の最終生物接合体に代えることを除き、例3で用いられる脂質から構成される脂質配合物から調製する。

【0324】

この文書に引用されまたは記載されたそれぞれの特許明細書、特許出願明細書および特許公表の開示内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

【0325】

本明細書に記載したものの他に、様々な本発明の修正は、上記の説明から当業者には明らかであろう。このような修正も、特許請求の範囲内にあるものと解釈される。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/02024
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A61B 8/00, 10/00; A61K 9/14, 9/16, 9/50		
US CL : 424/9.5, 9.51, 9.52, 9.6, 489, 490, 498, 499, 502.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/9.5, 9.51, 9.52, 9.6, 489, 490, 498, 499, 502.		
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) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,159,445A (KLA VENESS et al) 12 DECEMBER 2000, see the entire document.	1-116
Y	US 5,919,434A (DUGSTAD et al) 06 JULY 1999, see the entire document	1-116
Y	US 2001/00312243A1 (UNGER) 18 OCTOBER 2001, see the entire documents.	1-116
Y	US 6,165,442A (SWAERD-NORDMO et al), 26 DECEMBER 2000, see the entire document.	1-116
Y	US 6,123,923 A (UNGER et al) 26 SEPTEMBER 2000, see the entire document	1-116
Y	US 6,231,834 B1 (UNGER et al) 15 MAY 2001, see the entire document.	1-116
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 21 July 2003 (21.07.2003)		Date of mailing of the international search report 17 SEP 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Shengjun Wang <i>Jamie Ford</i> Telephone No. (703) 305-1235

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/02024

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

MEDLINE, CAS ONLINE search terms: ultrasound, lipid vesicle, phospholipid, perfluorocarbon, polyethylene glycol, vascular plaque, phosphatidyl serine.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 47/06	4 C 0 9 6
A 6 1 K 47/06	A 6 1 K 47/12	4 C 6 0 1
A 6 1 K 47/12	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/14	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/24	A 6 1 K 47/30	
A 6 1 K 47/30	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/34	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 47/44	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 K 51/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 B 5/05	3 8 3
A 6 1 P 35/00	G 0 1 N 24/02	B
G 0 1 R 33/28	A 6 1 K 43/00	
// A 6 1 K 31/337	A 6 1 K 49/02	A
A 6 1 K 31/366	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 49/04	A 6 1 K 31/366	
G 0 1 T 1/161	A 6 1 K 49/04	A
	G 0 1 T 1/161	D

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アンゲル、エヴァン、シー。

アメリカ合衆国、アリゾナ、トウーサン、イー・カミノ ラ セバディラ 1 3 3 6 5

(72) 発明者 マッククリーリィ、トマス、ピー。

アメリカ合衆国、アリゾナ、トウーサン、エヌ・ローズモント ブールバード 1 4 3 0

Fターム(参考) 2G088 EE01 FF04 FF07

4C076 AA19 AA20 AA21 BB11 CC14 CC21 CC27 CC50 DD15 DD34  
DD35 DD41 DD46 DD63 EE01 EE23 EE27 EE41 EE53 EE54  
FF16 FF36  
4C084 AA11 AA12 AA17 MA24 MA65 NA03 NA10 NA13 ZA511 ZA512  
ZB261 ZB262 ZC331 ZC332 ZC781 ZC782  
4C085 HH03 HH07 HH09 JJ05 KA16 KA18 KA19 KB39 KB42 KB60  
KB61 KB72 KB74 KB82 KB93 LL01  
4C086 AA01 AA02 BA02 BA17 MA02 MA05 MA24 MA65 NA03 NA10  
NA13 ZA51 ZB26 ZC33  
4C096 AA11 AB04 FC14  
4C601 DD19 DE07 EE03

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005516033A5</a>	公开(公告)日	2006-03-09
申请号	JP2003561539	申请日	2003-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	李马克斯Therapeutics公司		
[标]发明人	アンゲルエヴァンシー マッククリーリイトマスピー		
发明人	アンゲル、エヴァン、シー、 マッククリーリイ、トマス、ピー、		
IPC分类号	A61K49/00 A61B8/00 A61K9/127 A61K41/00 A61K45/00 A61K47/06 A61K47/12 A61K47/14 A61K47/24 A61K47/30 A61K47/34 A61K47/42 A61K47/44 A61P3/06 A61P7/00 A61P35/00 A61B5/055 G01R33/28 A61K51/00 A61K31/337 A61K31/366 A61K49/04 G01T1/161		
CPC分类号	A61K41/0028 A61K9/0009 A61K9/1271 A61K47/544 A61K47/62 A61K47/6911 A61K47/6925 A61K49/223 A61K49/227		
FI分类号	A61K49/00.C A61B8/00 A61K9/127 A61K41/00 A61K45/00 A61K47/06 A61K47/12 A61K47/14 A61K47/24 A61K47/30 A61K47/34 A61K47/42 A61K47/44 A61P3/06 A61P7/00 A61P35/00 A61B5/05.383 G01N24/02.B A61K43/00 A61K49/02.A A61K31/337 A61K31/366 A61K49/04.A G01T1/161.D		
F-TERM分类号	2G088/EE01 2G088/FF04 2G088/FF07 4C076/AA19 4C076/AA20 4C076/AA21 4C076/BB11 4C076/CC14 4C076/CC21 4C076/CC27 4C076/CC50 4C076/DD15 4C076/DD34 4C076/DD35 4C076/DD41 4C076/DD46 4C076/DD63 4C076/EE01 4C076/EE23 4C076/EE27 4C076/EE41 4C076/EE53 4C076/EE54 4C076/FF16 4C076/FF36 4C084/AA11 4C084/AA12 4C084/AA17 4C084/MA24 4C084/MA65 4C084/NA03 4C084/NA10 4C084/NA13 4C084/ZA511 4C084/ZA512 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC331 4C084/ZC332 4C084/ZC781 4C084/ZC782 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH09 4C085/JJ05 4C085/KA16 4C085/KA18 4C085/KA19 4C085/KB39 4C085/KB42 4C085/KB60 4C085/KB61 4C085/KB72 4C085/KB74 4C085/KB82 4C085/KB93 4C085/LL01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086/BA17 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/MA24 4C086/MA65 4C086/NA03 4C086/NA10 4C086/NA13 4C086/ZA51 4C086/ZB26 4C086/ZC33 4C096/AA11 4C096/AB04 4C096/FC14 4C601/DD19 4C601/DE07 4C601/EE03		
代理人(译)	池田幸		
优先权	10/055772 2002-01-23 US		
其他公开文献	JP2005516033A		

摘要(译)

可用于诊断和治疗应用的新型靶组合物。该组合物可以与诊断成像（例如超声）以及治疗应用（例如治疗性超声）结合使用。

